

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAO A ENZİMİNİN AKTİF BÖLGESİNİN ONIOM
YÖNTEMİ İLE MODELLENMESİ**

Vildan ENİSOĞLU ATALAY

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL 2010

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAO A ENZİMİNİN AKTİF BÖLGESİNİN ONIOM
YÖNTEMİ İLE MODELLENMESİ

Vildan ENİSOĞLU ATALAY
(141202620050008)

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL 2010

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince bilgisi ve birikimiyle çalışmalarımı yönlendiren, her zaman desteğini yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Safiye Erdem'e,

Bu tez çalışmasının ilerleme sürecine değerli fikirleriyle katkıda bulunan tez izleme komite üyelerim Sayın Prof. Dr. Ayşe Ogan'a ve Yrd. Doç. Dr. Aylin Konuklar'a,

Tez çalışmasındaki hesaplamaların daha hızlı bir şekilde ilerlemesine sağladıkları destek sebebiyle Emory Üniversitesi Bilimsel Hesaplama Merkezi'ne ve bizim bu imkanı kullanmamıza vesile olan Sayın Prof. Dr. Dale E. Edmondson'a,

Çalışma konumun bir bölümünü oluşturan Docking hesaplamalarındaki yardımları için Sayın Prof. Dr. Kemal Yelekçi'ye,

Tez çalışmamda destek ve yardımlarını gördüğüm çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Gül Altınbaş Özpınar'a, Mustafa Köktürk'e, Mehmet Ali Akyüz'e, Seyhan Türkkkan'a, Onur Can Aydın'a ve Özlem Sarı'ya,

Doktora sürecim boyunca Yurtiçi Doktora Bursiyeri olarak beni destekledikleri için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Bu tez çalışmasına sağladığı FEN-C-DRP-181208-0279 no'lu proje desteği için Marmara Üniversitesi BAPKO'ya,

Sevgili annem, babam ve kardeşime bugüne kadar olan tüm eğitim hayatım boyunca yanımda oldukları için ve

Değerli hayat arkadaşım İsmail Cem'e gösterdiği ilgi, sabır ve hoşgörüsü için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2010

Vildan ENİSOĞLU ATALAY

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
YENİLİK BEYANI.....	xi
SEMBOLLER.....	xii
KISALTMALAR.....	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar.....	xx
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	5
II.1. ENZİMLER.....	5
II.1.1. Enzimler ve Ko-enzimler.....	5
II.1.1.1. Flavin Ko-enzimleri.....	6
II.1.2. Enzim Katalizli Reaksiyon Kinetiği.....	7
II.1.2.1. Kinetik Parametrelerin Ölçülmesi.....	9
II.1.2.2. Enzim Kataliz Mekanizmaları.....	9
II.1.2.3. Enzim İnhibisyonu.....	10
II.2. MONOAMİN OKSİDAZ	11
II.2.1. Aromatik Kafes.....	15
II. 3. MAO AMİN OKSİTLEME MEKANİZMALARI.....	16
II. 3. 1. Tek Elektron Transferli Mekanizma.....	17

II. 3. 2. Hidrür Transfer Mekanizma.....	18
II. 3. 3. Polar Nükleofilik Mekanizma.....	19
BÖLÜM III. YÖNTEM.....	22
III.1. KULLANILAN HESAPSAL YÖNTEMLER.....	22
III.1.1. Moleküler Mekanik.....	22
III.1.2. Kuantum Mekaniği.....	23
III.1.2.1. Hartree-Fock Modelleri.....	24
III.1.3. Yoğunluk Fonksiyonu Teorisi.....	26
III.1.2.4. Ab Initio Moleküler Orbital Teorisi.....	29
III.1.4. Temel Kümeler.....	29
III.1.4.1. Minimal Basis Set.....	31
III.1.4.2. Bölünmüş Valans Temel Kümesi.....	31
III.1.4.3. Polarizasyon Fonksiyonları.....	32
III.1.4.4. Difüzyon Fonksiyonları.....	33
III.1.5. Semi-Empirik(Yarı Deneysel) Yöntemler.....	33
III.1.6. Hibrit Yöntemler (QM/MM).....	34
III.1.6.1. ONIOM.....	35
III.1.6.2. Docking (Kenetlenme)	
Yöntemi.....	38
III.2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	39
III.2.1. Doğal Enzim Optimizasyonları.....	39
III.2.1.1. Aktif Bölgenin Seçilmesi.....	39
III.2.1.2. Çalışılan Substratlar.....	40
III.2.1.3. Optimizasyonlarda Enzim Koordinatlarının Dondurulması.....	41
III.2.1.4. Doğal Enzim Optimizasyonlarındaki Reaksiyon Yolu.....	43

III.2.1.5. Çalışma Yönteminin Seçilmesi.....	44
III.2.1.6. Optimize Yapıların Elde Edilmesi.....	45
III.2.1.7. Aromatik Kafesin Öneminin Araştırılması.....	46
III.2.1.8. Tyr407 Ve Tyr444 Aminoasitlerinin Aromatik Kafesteki Görevlerinin Karşılaştırılması.....	47
III.3. AROMATİK AMİNOASİTLERİN MUTASYON ÇALIŞMALARI.....	48
III.4. AMİN OKSİTLEME MEKANİZMALARININ MODELLENMESİ.....	50
III.4.1. Aktif Bölge İçinde Polar Nükleofilik Mekanizmanın Modellenmesi.....	51
III.4.1.1. ONIOM(PM3:UFF) Yöntemi İle Yapılan Mekanizma Çalışmaları..	51
III.4.1.2. ONIOM(PM6:UFF) Yöntemi İle Yapılan Mekanizma Çalışmaları..	52
III.4.1.3. ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması.....	52
III.4.1.4. PM3 Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması.....	53
III.4.2. Model Yapılar İle Mekanizma Modellenmesi.....	54
III.4.2.1. PM3 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar.....	54
III.4.2.2. PM6 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar.....	59
III.4.2.3. HF Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar.....	59
III.4.2.4. DFT Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar.....	60
III.4.2.5. MP2 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar.....	60
III.4.3. H ₂ O'lu Polar Nükleofilik Mekanizmanın Önerilmesi ve Modellenmesi.....	60
III.4.4. Küçük Model Yapılar İle Önerilen Mekanizmaların Karşılaştırılması.....	64
III.4.4.1. 17 ve 20 Atomlu Modeller İle Mekanizmaların Karşılaştırılması....	64
III. 5. KARBONİL MEKANİZMANIN ÖNERİLMESİ.....	65
III. 6. P-SÜBSTİTÜE BENZİLAMİN TÜREVLERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR VE YAPI AKTİVİTE İLİŞKİLERİ.....	68
III. 6. 1. Flavin + Benzilamin Modeli.....	69
III. 6. 2. Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 Modeli.....	69

III. 6. 3. Aktif Bölgenin İçine P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin Yerleştirilmesi.	70
III. 6. 4. P-Süstitüe Benzilamin Türevleri İle Yapılan Docking Çalışmaları.....	71
BÖLÜM IV. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	72
IV.1. DOĞAL ENZİM HESAPLAMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR..	72
IV.1.1. Aromatik Kafesin Amin Azotu Üzerindeki Etkisi.....	75
IV.2. MUTASYON ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	78
IV.3. MEKANİZMA MODELLENMESİNDEN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	82
IV.3.1. ONIOM(HF:PM3:UFF) Sonuçlarının Polar Nükleofilik Mekanizma İle İlişkisi.....	82
IV.3.2. Aktif Bölge İçinde Polar Nükleofilik Mekanizmanın Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar.....	84
IV.3.2.1. ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranmasından Elde Edilen Sonuçlar.....	85
IV.3.2.2. PM3 Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranmasından Elde Edilen Sonuçlar.....	86
IV.3.3. Model Yapılar İle Mekanizma Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar.....	87
IV. 3. 3. 1. PM3 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar....	87
IV. 3. 3. 2. PM6 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar...	89
IV. 3. 4. Küçük Model Yapılar İle Önerilen Mekanizmaların Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar.....	94
IV.3. 4. 1. 17 ve 20 Atomlu Modeller İle Mekanizmaların Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar.....	95
IV.3.4.2. Flavın ve Benzilamin Modeli İle Mekanizmaların Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar.....	105

IV.4. KARBONİL MEKANİZMA ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	111
IV.5. P-SÜBSTİTÜE BENZİLAMİN TÜREVLERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALARDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	115
IV. 5. 1. Flavin + Benzilamin Modelinden Elde Edilen Sonuçlar.....	115
IV. 5. 2. Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 Modelinden Elde Edilen Sonuçlar.....	119
IV.5.3. Aktif Bölgenin İçine P-Sübstitüe Benzilamin Türevlerinin Yerleştirilmesinden Elde Edilen Sonuçlar.....	121
IV. 5. 4. Docking Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar.....	125
 BÖLÜM V. DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA.....	127
KAYNAKLAR.....	131
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

MAO A ENZİMİNİN AKTİF BÖLGESİNİN ONIOM YÖNTEMİ İLE MODELLENMESİ

Monoamin Oksidaz biyolojik aminleri oksitleyen bir flavo enzimdir. MAO A ve MAO B olmak üzere %70 benzerliğe sahip, substrat ve inhibitör seçiciliklerinde farklılıklar gösteren iki izomer yapıya sahiptir. Bu iki izomer enzimin inhibitör bileşiklerinin Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılması ve anti-depresyon etkiye sahip olmaları sebebiyle 20000'e yakın literatür çalışmasına sahiptirler. Ancak söz konusu enzimlerin amin oksitleme mekanizmalarına ait bine yakın makale bulunmasına rağmen oksitleme mekanizmasının hangi yolu izlediğine dair net bir delil bulunmamaktadır.

Flavo enzim ailesinde önemli bir yere sahip olan MAO A ve MAO B nin yakın tarihlerde x-ışını yapılarının aydınlatılması enzim üzerindeki gerçeğe daha yakın hesapsal çalışmaların önünü açmıştır. Enzimi oluşturan aminoasit konformasyonlarının öneminin araştırılmasına ve amin oksitleme mekanizmalarının hesapsal yollarla çalışılmasına fırsat vermiştir.

Bu tez çalışılmasında MAO A izomeri temel alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Bunun yanısıra, MAO B ve flavo enzim ailesindeki diğer enzimlerin katalizleme mekanizmalarına ışık tutabilecek küçük model yapılar modellenmiştir. Yapılan çalışmalar genel olarak beş başlık altında toparlanabilir:

1. Doğal enzimin aktif bölge yapısı kullanılarak yapılan hesaplamalar
2. Aromatik aminoasitlerin mutantlarının aktif bölge yapısı üzerine yapılan hesaplamalar
3. Önerilen amin oksitleme mekanizmalarının incelenmesi
4. Yeni amin oksitleme mekanizmalarının önerilmesi
5. p-Süstitüe benzilamin türevleri ile yapılan QSAR çalışmaları

Aktif bölgenin tamamının dahil edildiği hesaplamalar ONIOM yöntemi ile, mekanizmaların modellenmesine yönelik hesaplamalar ise PM3, PM6, HF/6-31G*, B3LYP/6-

31G*, CAM/6-31G*, WB97XD/6-31G*, MP2, gibi çeşitli seviyelerde kuantum kimya yöntemleri ile yapılmıştır.

Doğal enzim ve mutant enzimlerin aktif bölgeleri kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda aktif bölgedeki aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerinin substratın amin azotunun elektron yoğunluğunu arttırdığı ve bu artışta Tyr407 nin daha büyük katkısı olduğu görülmüştür. Amin oksitleme mekanizmasını araştırmaya yönelik hesaplamalar, polar nükleofilik mekanizmanın haricinde hidrür mekanizmasının ve yeni önerdiğimiz karbonil mekanizmasının da dikkate alınması gerektiği sonucunu ortaya koymuştur.

MODELLING OF THE ACTIVE SITE OF MAO A ENZYME BY ONIOM METHOD

Monoamin Oxidase is a flavo-enzyme which oxidizes biological amines. It exists as two distinct isoenzymic structures called as MAO A and MAO B that exhibit around %70 similarities but having differences in their substrate and inhibitor selectivities. There exist approximately 20000 research papers in the literature on inhibitor compounds for these two isomer enzymes as they are effectively used in the treatment of Parkinson disease and possess anti-depressant properties. However, despite the presence of around 1000 published papers concerning amine oxidation mechanisms of aforementioned enzymes, there is no concrete proof or evidence on which path this oxidation mechanism follows.

Recent elucidation of X-ray structures for MAO A and MAO B created new prospects for more realistic computational analysis and modelling on this enzyme. These developments also opened new research possibilities towards understanding the importance of aminoacid conformations that make up the enzyme and analyzing amine oxidation mechanisms through computational methods.

In this thesis, the computational work has been concentrated on MAO A isomer. As complementary work, small model structures that might shed light on the catalysis mechanisms of MAO B and other enzymes in flavoenzyme family have been constructed and then modeled accordingly. The thesis work could be summarized under five broad headings:

The computations carried out by using active site of the natural enzyme.

The computations implemented on the active site structure of the mutant aromatic aminoacids

Investigation and evaluation of already proposed amine oxidation mechanisms.

Proposing new amine oxidation mechanisms

QSAR work with p-substitute benzilamine derivatives

The computations into which the whole active region has been included have been carried out with ONIOM method. Whereas the computational work towards modelling mechanisms is pursued through quantum chemical methods with varying degrees such as PM3, PM6, HF/6-31G*, B3LYP/6-31G*, CAM/6-31G*, WB97XD/6-31G* and MP2

Resulting from the computational work carried out by utilizing active sites of natural and mutant enzymes, it has been observed that Tyr407 and Tyr444 aminoacids constituting active site's aromatic cage, increase the electron density of amine nitrogen of substrate. Contribution of Tyr407 to this increase is more substantial. Computational studies towards exploring amine oxidation mechanisms revealed that hydride and newly proposed carbonyl mechanisms should also be taken into consideration in addition to polar nucleophilic mechanism.

YENİLİK BEYANI

MAO A ENZİMİNİN AKTİF BÖLGESİNİN ONIOM YÖNTEMİ İLE MODELLENMESİ

Monoamin Oksidaz biyolojik aminleri oksitleyen bir flavo enzimdir. MAO A ve MAO B olmak üzere %70 benzerliğe sahip, substrat ve inhibitör seçiciliklerinde farklılıklar gösteren iki izomer yapıya sahiptir. Bu iki izomer enzimin inhibitör bileşiklerinin Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılması ve anti-depresyon etkiye sahip olmaları sebebiyle 20000'e yakın literatür çalışmasına sahiptirler. Ancak söz konusu enzimlerin amin oksitleme mekanizmalarına ait bine yakın makale bulunmasına rağmen oksitleme mekanizmasının hangi yolu izlediğine dair net bir delil bulunmamaktadır.

MAO enzimi ile yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu deneysel çalışmalara aittir. Enzimin x-ışını yapısının aydınlatılması hesapsal modellemelerin gerçeğe daha yakın yapılar üzerinde çalışılmasının önüne açmıştır. X-ışını yapısı incelendiğinde daha önce literatürde yer almayan farklı iki mekanizma daha çalışmalarımıza dahil edilerek modellenmiştir. Literatürde yer almayan Karbonil Mekanizma yeni bir amin oksitleme mekanizma önerisi olarak sunulmuştur. Ayrıca, bu tez çalışmasında dispersiyon etkisinin hesaplamalara dahil edildiği yeni DFT yöntemleri ilk kez çalışılan mekanizmalara uygulanmıştır. Bunlara ilave olarak x-ışını yapısının aydınlatılması, hesaplamalarımızı önceki çalışmalarımızda model yapılara uyguladığımız kuantum modellemeleri yanında enzimin aktif bölgesine farklı hesapsal yöntemleri de uygulama imkanı sağlamıştır.

Grubumuz tarafından daha önce çalışılan MAO B izomeri için enzim mutasyonu, p-sübstitüe aminlerin kataliz reaksiyonundaki etkileri, reaksiyon gerçekleştiği bölge amino asitlerinin konformasyonlarının önemi MAO A izomeri için çalışılmıştır. Böylelikle kataliz için önemli olan amino asitlerin ve substrat bileşiğinin konformasyonel ve elektronik yapılarının kataliz için önemi araştırılmıştır.

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
H	: Hamiltonyen
Ψ	: Dalga Fonksiyonu
E	: Enerji
h	: Planck Sabiti
m_e	: Elektron kütlesi
M_i	: Çekirdek kütlesi
N_e	: Elektron sayısı
Σ	: Toplam sembolü
Z	: Atom numarası
r	: Elektron konumu
R	: Çekirdek konumu
Φ	: Atomik orbital
V_{ext}	: Dış potansiyel
ρ	: Yoğunluk
T	: Kinetik enerji
E_{xc}	: Değiş-tokuş enerjisi
E_{nu}	: Çekirdeğin enerjisi
E_{ee}	: Elektron-elektron etkileşim enerjisi
V_{xc}	: Değiş-tokuş potansiyeli
V_{H}	: Hartree potansiyeli
K	: Kelvin
kkal	: Kilokalori
VdW	: Van der Waals
E_s	: Taft Sterik Parametresi
Π	: Lipofilik Katkı
σ	: Sübstitüent Sabiti

KISALTMALAR

ONIOM	: Our Own N-Layered Integrated MO and MM method
QM	: Kuantum Mekanik
MM	: Moleküler Mekanik
HF	: Hartree Fock
B3LYP	: Becke3-Lee-Yang-Parr
DFT	: Density functional theory
LCAO	: Lineer Combination of atomic orbitals
MP2	: Moller Plesset 2
AO	: Atomik orbital
MO	: Moleküler orbital
STQN	: Synehronous Transit-Quasi Newton
STO	: Slater tipi orbital
GTO	: Gaussian tipi orbital
PES	: Potential energy surface
AM1	: Austin Model 1
PM3	: Parametrized Model 3
PM6	: Parametrized Model 6
UFF	: Universal Force Field
IRC	: Instrinsic Reaction Coordinate
TS	: Geçiş konumu (Transition State)
RC	: Reaktant kompleks
PC	: Ürün kompleks
ADD	: Ara ürün (Adduct)
SP	: Single point
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
MAO	: Monoamin Oksidaz
Tyr	: Tirozin

Leu	: Lösin
Trp	: Triptofan
His	: Histidin
Ile	: İzolösin
Cys	: Sistein
Phe	: Fenilalanin

ŞEKİLLER

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil I.1 Polar Nükleofilik Mekanizma	2
Şekil I.2 İnsan MAO'sunun Aktif Bölgesinin Kristal Yapısı	2
Şekil I.3 Aromatik Kafes	3
Şekil II.1 Riboflavin Vitaminin Yapısı.....	6
Şekil II.2 Flavin Koenziminin Farklı Oksidasyon Dereceleri	7
Şekil II.3 Enzim-katalizli Reaksiyonlar.....	8
Şekil II.4 Enzim-katalizli Reaksiyonların Substrat Konsantrasyonuna [S] Bağlı Hız Değişimi.....	8
Şekil II.5 'Lineweaver-Burk Double-reciprocal' Grafiği.....	9
Şekil II.6 MAO'nun Seçici Substrat ve İnhibitörleri	12
Şekil II.7 İnsan ve Sıçan MAO A'sının, İnsan MAO B'sinin Kristal Yapıları.....	12
Şekil II.8 MAO A'nın, MAO B'nin Aktif Bölge Boşlukları.....	13
Şekil II.9 MAO A'nın, (b) MAO B'nin Aktif Bölge Boşluklarındaki Farklılıklar	14
Şekil II.10 MAO'nun Aktif Bölgesindeki FAD'nin Yapı Formülü.....	15
Şekil II.11 MAO Katalizli Deaminasyon Mekanizması.....	16
Şekil II.12 Tek Elektron Transfer Mekanizma	17
Şekil II.13 Modifiye Radikal Mekanizma	18
Şekil II.14 Hidrür Mekanizma	19
Şekil II.15 Polar Nükleofilik Mekanizma A.....	20
Şekil II.16 Polar Nükleofilik Mekanizma B	21
Şekil III.1 Gaussian Tipi Fonksiyon (GTF) ve Slater Tipi Orbital (STO)	30
Şekil III.2 Double Zeta Basis Set	32
Şekil III.3 Polarizasyon Fonksiyonu	32
Şekil III.4 Hidrojen İçin Polarizasyon Fonksiyonu	33
Şekil III.5 Büyük Moleküllerde QM/MM Seviyelerinin Ayrımı	35

Şekil III.6 ONIOM Seviyelerinin Tanımlanması	36
Şekil III.7 ONIOM'la Enerji Hesabı	36
Şekil III.8 ONIOM Yöntemi ile İki ve Üç Tabakalı Sistemlerde Enerji Hesabı.....	37
Şekil III.9 Link Atom Tekniği ile Tabakalar Arası Bağlantı Mesafesinin Hesaplanması...	38
Şekil III.10 (a) MAO A Enzimi (b) MAO A Enziminin Hesaplamalarda Kullanılan Aktif Bölgesi	40
Şekil III.11 Benzilaminin (a) Dik (b) Planar Konformasyonları; p-NO ₂ Benzilaminin (c) Dik (d) Planar Konformasyonları.....	41
Şekil III.12 Optimizasyonlarda Dondurulan Atomlar	42
Şekil III.13 Tirozinlerin Konformasyonel Serbestliğe Sahip Oldukları Durumlardaki Duruşları	43
Şekil III.14 Doğal Enzim Optimizasyonlarındaki Reaksiyon Yolu	44
Şekil III.15 Aktif Bölgedeki ONIOM Seviyeleri	45
Şekil III.16 (a) Doğal Enzimin Aktif Bölgesinin Bir Kesiti (b) Aromatik Kafesin N Yüğü Üzerindeki Etkisini İncelemek İçin Hazırlanan Referans Yapı.....	46
Şekil III.17 (a) Enzimin Aktif Bölgesi (b) Tyr407'nin Etkisini İncelemek İçin Hazırlanan Model (c) Tyr444'ün Etkisini İncelemek İçin Hazırlanan Model.	47
Şekil III.18 Mutant Aminoasitleri	48
Şekil III.19 (a) Doğal Enzimin, (b) Triptofan Mutant Enziminin Aktif Bölgesi	49
Şekil III.20 Polar Nükleofilik Mekanizmanın ONIOM(PM3:UFF) Yöntemi İle Modellenmesinde Seçilen Seviyeler.....	52
Şekil III.21 Polar Nükleofilik Mekanizmanın ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Modellenmesinde Seviyeler.....	53
Şekil III.22 PM3 ile Polar Nükleofilik Mekanizma Çalışmasındaki Model Yapılar	55
Şekil III.23 PM3 ile Polar Nükleofilik Mekanizma Çalışmasındaki Model Yapılar	56
Şekil III.24 PM3 ile Polar Nükleofilik Mekanizma Çalışmasındaki Model Yapılar	57
Şekil III.25 PM3 Yöntemi ile Çalışılan Büyük Modellerde Koordinatları Dondurulan Atomlar	58
Şekil III.26 79 Ağır Atom + 8 H ₂ O Molekülünden Oluşan Model Yapı	59
Şekil III.27 H ₂ O Üzerinden Yürüyen Polar Nükleofilik Mekanizma	61
Şekil III.28 12 Atomun Koordinatının Dondurulduğu Flavın + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + H ₂ O Model Yapısı	62
Şekil III.29 Tek Seviye PM3 Yöntemi ile H ₂ O'lu Polar Nükleofilik Mekanizma	

Çalışmasındaki Model Yapılar	63
Şekil III.30 PM3 Yöntemi ile H ₂ O İlave Edilerek Atom Sayısı Azaltılmış Model	
Çalışmaları İçin Düzenlenen Aktif Bölge Yapıları.....	64
Şekil III.31 Mekanizmaların Karşılaştırılmasında Kullanılan Model Yapılar	65
Şekil III.32 Flavin Üzerindeki Mulliken Yük Dağılımı	66
Şekil III.33.a Karbonil Mekanizma A	66
Şekil III.33.b Karbonil Mekanizma B	67
Şekil III.34.a H ₂ O'lu Karbonil Mekanizma A	67
Şekil III.34. b H ₂ O'lu Karbonil Mekanizma	68
Şekil III.35 P-Süstitüe Benzilamin Türevleri İle Yapılan Çalışmada Oluşturulan Model	
Yapı.....	69
Şekil IV.1 Opt(1) Ve Opt(2) Optimizasyonlarında Enerji Değişimi	72
Şekil IV.2 Opt(1) ve Opt(2) Optimizasyonlarında Benzilamin Azotunun Elektron	
Yoğunluğunun Karşılaştırılması	73
Şekil IV.3 Planar veya Dik Benzilamin İçeren MAO A Enziminin Benzilamin α C-	
Flavin N(5) Reaksiyon Yolu Boyunca Olan Enerji Değişimi.....	74
Şekil IV.4 Planar ve Dik Benzilamin İçeren MAO A Enziminin Benzilamin N-Flavin	
C(4a) Reaksiyon Yolu Boyunca Olan Enerji Değişimi	75
Şekil IV.5 Benzilamin Azotu Üzerindeki Net Yük Yoğunluğu	76
Şekil IV.6 p-NO ₂ Benzilamin Ve Benzilamin Substratlarının Yük Yoğunluklarının	
Karşılaştırılması	76
Şekil IV.7 Benzilamin N'u üzerindeki Net Yük Değişimi	77
Şekil IV.8 Benzilamin N'u Üzerindeki Yüklerin Kıyaslanması.....	78
Şekil IV.9 İnsan MAO A'sının Aktif Bölgesinde Doğal Enzim ve Tyr444 Mutant	
Enzimlerinin Benzilaminin Planar Konformasyonu İçin Enerji Değişimi	79
Şekil IV.10 İnsan MAO A'sının Aktif Bölgesinde Doğal Enzim ve Tyr444 Mutant	
Enzimlerinin Benzilaminin Planar Konformasyonu İçin Enerji Değişimi	79
Şekil IV.11 Tyr444 Mutant Enzimlerinde Amin Azotundaki Mulliken Yükü	80
Şekil IV.12 Tyr407Leu ve Tyr407Phe Mutasyonlarında Benzilamin N'undaki Yük	
Değişimleri.....	81
Şekil IV.13 Lösin ve Fenilalanin İle Yapılan Mutasyonlarda Tyr444, Tyr407 ve Doğal	
Enzimdeki Amin N'undaki Yük Değişimlerinin Karşılaştırılması.....	82
Şekil IV.14 Amin α C-flavin N(5) Doğrultusunda a) Benzilamin N, b) Flavin C(4a),	
c) N(5) ve d) Pro-R α -H Yük Yoğunlukları.....	84

Şekil IV.15 Amin N-flavin C(4a) Doğrultusunda a) Benzilamin N, b) Flavin C(4a), c) N(5) ve d) Pro-R α -H Yük Yoğunlukları.....	85
Şekil IV.16 ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması	86
Şekil IV.17 PM3 Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması	87
Şekil IV.18 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model A İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları.....	96
Şekil IV.19 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model A İçin Reaksiyon Koordinatı	97
Şekil IV.20 Sulu Polar Mekanizmanın Model A İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları	97
Şekil IV.21 Sulu Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model A İçin Reaksiyon Koordinatı..	98
Şekil IV.22 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model B İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları.....	99
Şekil IV.23 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model B İçin Reaksiyon Koordinatı.....	100
Şekil IV.24 Sulu Polar Mekanizmanın Model B İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları	101
Şekil IV.25 Sulu Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model B İçin Reaksiyon Koordinatı .	101
Şekil IV.26 Hidrür Mekanizmanın Model B İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları	102
Şekil IV.27 Hidrür Mekanizmanın Model B İçin Reaksiyon Koordinatı	103
Şekil IV.28 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları.....	106
Şekil IV.29 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model C İçin Reaksiyon Koordinatı.....	106
Şekil IV.30 Sulu Polar Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları	107
Şekil IV.31 Sulu Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model C İçin Reaksiyon Koordinatı..	108
Şekil IV.32 Hidrür Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları	108
Şekil IV.33 Hidrür Mekanizmanın Model C İçin Reaksiyon Koordinatı	109
Şekil IV. 34 Karbonil Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları.....	113
Şekil IV.35 P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin (a)ZPE'li $\Delta H_1^\ddagger$ ve (b) $\Delta G_1^\ddagger$ Değerlerinin Süstitüent Etkisine (σ) Karşı Grafikleri	118

Şekil IV.36 Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 Model Yapılı P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin ZPE'li $\Delta H_1^\ddagger$ ve $\Delta G_1^\ddagger$ Değerlerinin Süstitüent Etkisine (σ) Karşı Grafikleri	120
Şekil IV.37 Aktif Bölge İçinde P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin Optmizasyon Çalışmalarından Çizilen Grafikler	123
Şekil IV. 38 P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin AutoDock Hesaplamalarından Elde Edilen Bağlanma Enerjilerine Karşı Elektronik Süstitüent Etkisi Grafiği	126
Şekil IV. 39 P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin AutoDock Hesaplamalarından Elde Edilen Bağlanma Enerjilerine Karşı Van der Waals Hacmi Grafiği.....	126

TABLÖLAR

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo III.1 Tyr407 ve Tyr444'teki Konformasyonel Serbestliğin Etkisi	43
Tablo IV.1 ONIOM(PM3:UFF) ve ONIOM(PM6:UFF) Yöntemleri İle Reaksiyon Yolu Taranarak Elde Edilen Aktivasyon Enerjileri85	
Tablo IV.2 ONIOM(HF:PM3) ve Tek Seviye PM3 Yöntemi ile Hesaplanan Polar Nükleofilik Mekanizma'ya ait Akt. En. 1 değerleri.....	87
Tablo IV.3 Polar Nükleofilik Mekanizmanın PM3 İle Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar.....	89
Tablo IV.4 Polar Nükleofilik Mekanizmanın PM3 Yöntemi İle 79 ve 140 Atomlu Model Yapılarından Elde Edilen Sonuçlar.....	90
Tablo IV.5 Polar Nükleofilik Mekanizmanın PM6 ile Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar.....	91
Tablo IV.6 PM3 Yöntemi İle Optimizasyonu Yapılan H ₂ O'lu Polar Nükleofilik Mekanizma İçin Elde Edilen E+ZPE Değerleri.....	93
Tablo IV.7 PM3 Yöntemi İle Optimizasyonu Yapılan H ₂ O'lu Polar Nükleofilik Mekanizma İçin Elde Edilen ΔG Değerleri.....	94
Tablo IV.8 Model A İçin Elde Edilen Gibbs Serbest Enerji.....	98
Tablo IV.9 Model B İçin Elde Edilen Gibbs Serbest Enerji.....	104
Tablo IV.10 Model C İçin Elde Edilen Gibbs Serbest Enerji.....	110
Tablo IV.11 Model C İçin Mekanizma Karşılaştırılmalarında Tek Nokta Enerji Değerleri.....	111
Tablo IV.12 Model C İçin Mekanizma Karşılaştırılmalarında Suyun Çözücü Etkisi.....	111
Tablo IV.13 PM3 Yöntemi İle Hesaplanan Karbonil Mekanizmaya Ait Enerji Değerleri	114
Tablo IV.14 PM6 Yöntemi İle Hesaplanan Karbonil Mekanizmaya Ait Enerji Değerleri	114
Tablo IV.15 P-Süstitüe Benzilamin Substratları İçin PM6 Yöntemi İle Modellenen Polar Nükleofilik Mekanizmaya ait ZPE Katılmış Enerji ve σ Süstitüent SabitiDeğerleri.....	116
Tablo IV.16 P-Süstitüe Benzilamin Substratlarının PM6 Yöntemi İle Modellenen Polar Nükleofilik Mekanizmaya ait ΔG Enerjileri ve σ Süstitüent Sabiti Değerleri.....	117

Tablo IV.17 p-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin 1. Aktivasyon Değeri Üzerindeki Etkisi.....	119
Tablo IV.18 Aktif Bölgede PM3 İle Yöntemi Yapılan p-Süstitüe Benzilamin Çalışmalarından Elde Edilen Değerler.....	124
Tablo IV.19 Docking İşlemi İle elde edilen Ki ve Bağlanma Enerjileri.....	125

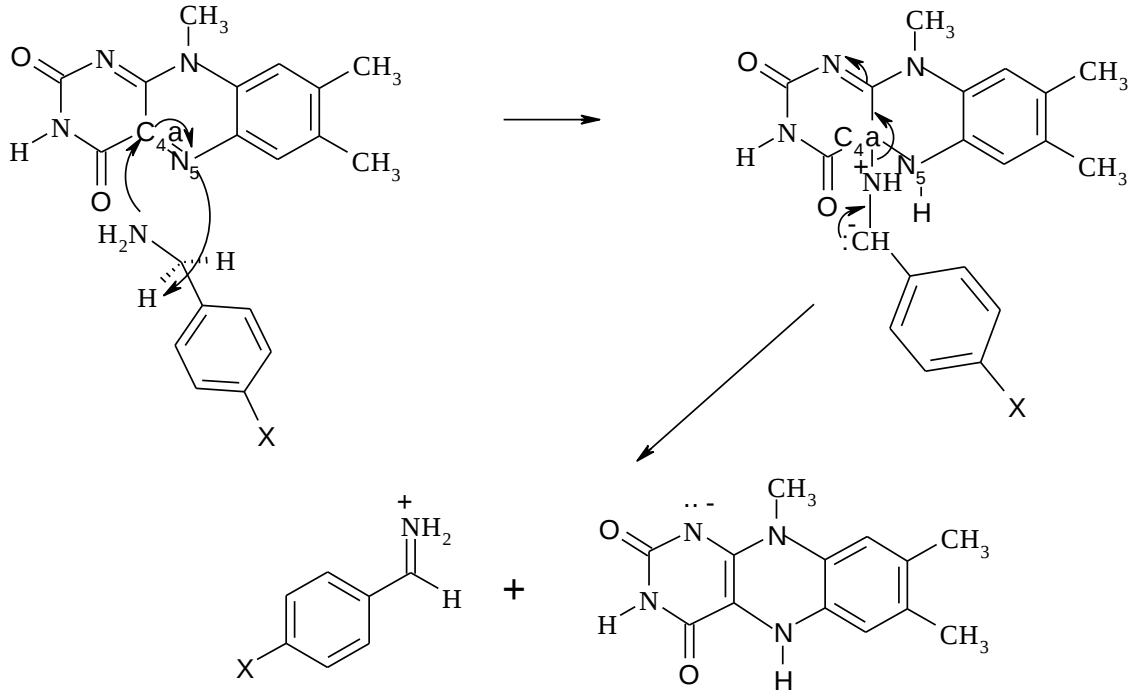
BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1.GİRİŞ

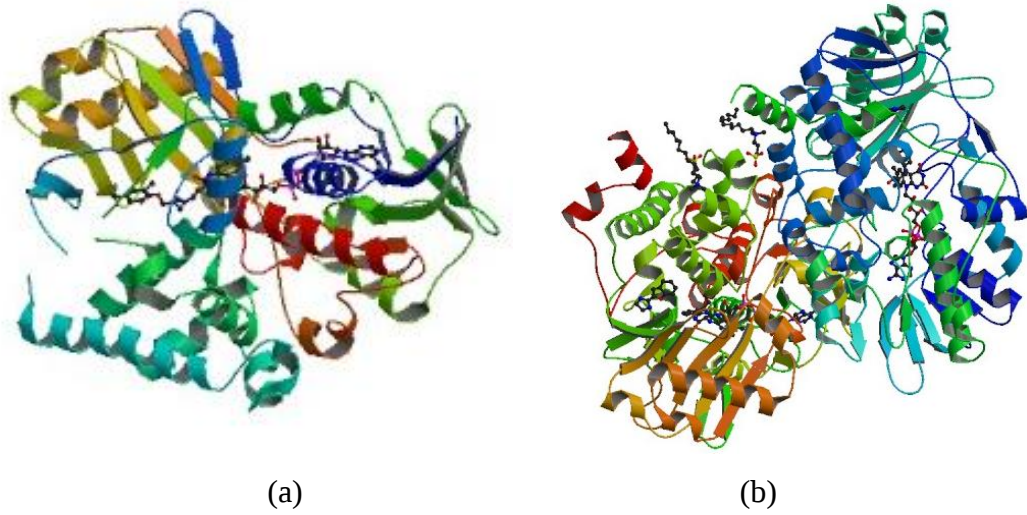
Monoamin Oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO) biyolojik aminleri oksitleyen bir flavo enzimdir. MAO A ve MAO B olmak üzere %70 oranında birbirine benzeyen iki izo enzimi bulunmaktadır[1]. MAO serotonin, dopamin, norepinefrin, epinefrin gibi amin nörotransmitterlerin oksidasyonunda ve hücre içi konsantrasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Depresyon durumunda beyindeki epinefrin ve serotonin, Parkinson hastalığında ise dopamin miktarı önemli ölçüde azalır [2]. Son çalışmalarda agresif davranış örneklerinde bu enzim seviyesinde düşme tespit edilmiştir [3, 4]. MAO A ve MAO B'nin inhibisyonu bu aminlerin yıkımını engelleyerek antidepresan [4-6] ve anti-Parkinson etkisi sağlar [7, 8]

MAO A ve MAO B inhibitör ve substrat seçiciliklerinde farklılıklar göstermelerine rağmen aynı amin oksitleme mekanizmasına sahip oldukları düşünülmektedir. Literatürde önerilen mekanizmalardan hiçbiri tam olarak kanıtlanamamış, herbir mekanizma için destekleyici ve karşıt deliller elde edilmiştir [2, 9, 10]. D. E. Edmondson ve grubunun önerdiği Polar Nükleofilik Mekanizma [10, 11] (Şekil I.1), p-süstitüe benzilamin analoglarının yapı-aktivite ilişkileri ile desteklenmektedir. Flavinin indirgenme hızı (k_{red}), benzilaminin para pozisyonundaki grubun elektron çekme gücü ile doğru orantılı olarak bulunmuştur. Ayrıca p-süstitüe benzilaminlerin van der Waals hacmi (V_w) ile MAO B'nin ayrışma sabitleri (K_d) arasında iyi bir korelasyon görülmüştür; daha büyük hacimli süstitüentlerin daha sıkı bağlandıkları bulunmuştur [12].



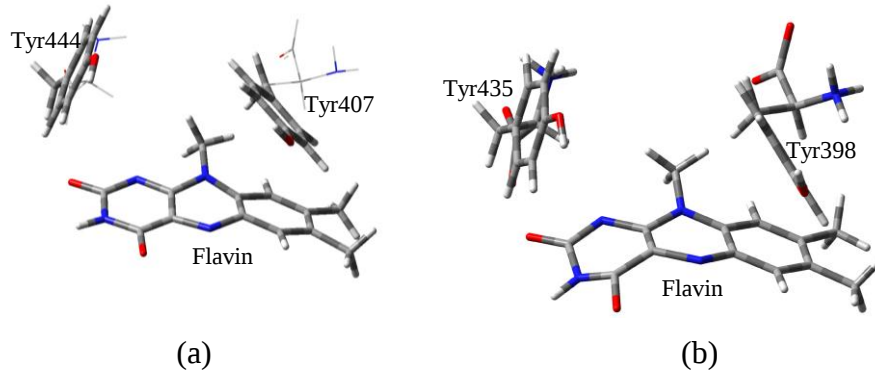
Şekil I.1 Polar Nükleofilik Mekanizma (İki basamakta gerçekleşen bu mekanizmanın birinci basamağında benzilaminin amin N’u nükleofilik olarak flavin C(4a)’ ya saldırır ve kovalent bağlı bir ara ürün oluşur, ikinci basamakta ise oluşan ara ürün aktif enzim ve iminyum katyonuna dönüşmektedir.)

Son yıllarda MAO A [3] ve MAO B [13] enzimlerinin x-ışını (Şekil I. 2) ile yapılarının aydınlatılması çok önemli yeni ipuçları sağlamıştır.



Şekil I. 2 İnsan MAO’sunun Aktif Bölgesinin Kristal Yapısı. (a) MAOA (2BXR pdb kodlu), (b) MAOB (2XCG pdb kodlu)

Her iki enzimde de flavin halkasının *re*-yüzünde ve flavine yaklaşık olarak dik konumda aromatik tirozin amino asitleri (MAO A’da Tyr407 ve Tyr444, MAO B’de Tyr398 ve Tyr435) olduğu D. E. Edmondson tarafından farkedilmiş ve “aromatik kafes” olarak adlandırılmıştır (Şekil I. 3). Yapılan deneysel çalışmalar sonucu, bu aromatik kafesin MAO’daki amin substratının nükleofililiğini arttırabileceği ve bağlanmada sterik bir role sahip olabileceği rapor edilmiştir. MAO A’da Tyr444 ve MAO B’de Tyr435 mutantları ile yapılmış kinetik çalışmalar, mutant enzimlerin aktivitelerinin doğal enzimlerin aktivitesinden daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, aromatik kafesin Şekil I.1’deki mekanizma gözönüne alınarak amin nükleofililiğini güçlendirme olasılığına bağlanmaktadır [14].



Şekil I. 3. Aromatik Kafes: (a) MAO A’daki, (b) MAO B’deki

Yukarıda anlatılanlara ek olarak MAO mekanizması ile ilgili literatürde bine yakın çalışma mevcuttur. Ancak bunların tamamına yakını deneysel verilere dayanmaktadır. Hesaplamalı çalışmalar ise S. S. Erdem ve grubu tarafından başlatılmış [9, 15, 16] ve halen devam etmektedir. Çok yakın bir zamanda MAO A ve MAO B’nin kristal yapılarına ait koordinatların tespit edilmiş olması bu konuda yapılabilecek daha gerçekçi hesaplamaların önünü açmıştır. Böylece, farmakolojik öneme sahip olan bu enzimlerin oksitleme ve inaktivasyon mekanizmalarının incelenmesinde, yalnızca model moleküller yerine, enzimin aktif bölgesi de dahil edilebilmektedir. S. S. Erdem ve grubu [15] tarafından MAO B’nin aktif bölgesindeki aromatik kafesin işlevi ONIOM [17] yöntemi ile araştırılmıştır.

Bu tez çalışmanın amacı;

- MAO A enziminin aktif bölgesinin substrat geometrisi ve elektronik özelliklerine etkisini incelemek;
- Substratı aktif bölge içinde farklı mesafelerde optimize ederek, reaksiyon yolu boyunca konformasyonun değişimini izlemek;
- Flavın halkasının *re*-yüzündeki aromatik kafesin enzim aktivitesindeki önemini araştırmak;
- Aromatik kafesin enzim aktivitesindeki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için 4 farklı aminoasit ile aromatik Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerini mutasyona uğratarak hesaplamalar yapmak;
- Enzimin katalizleme mekanizmasını modeller yardımıyla aydınlatıcı veriler elde etmek;
- Polar Nükleofilik Mekanizmayı H₂O üzerinden yürüyebilecek şekilde düzenlemek ve reaksiyon mekanizmasını incelemek;
- Flavın koenzimindeki karbonil grubu üzerinden yürüyebilecek yeni bir oksidasyon mekanizması önermek ve modellemek;
- p-substitüe benzilamin türevlerini aktif bölge içinde ve dışında optimize ederek bağlanma enerjisini kuantum kimyasal yollar ile hesaplamak; para-sübstitüentin van der Waals hacmi (V_w) ile bağlanma enerjisi (E_b) arasındaki ilişkiyi araştırmak; hesaplanmış bağlanma enerjileri ile deneysel olarak ölçülmüş ayrışma sabitleri (K_d) arasındaki korelasyonunu incelemek;
- p-substitüe benzilamin türevlerinin aktif bölge içinde docking işlemi ile bağlanma enerjisini ve K_i değerlerini hesaplamak; elde edilen değerler ile deneysel ve kuantum kimyasal yollarla hesaplanan değerleri karşılaştırmak;
- p-substitüe benzilamin türevleri ile enzim arasındaki tepkimenin aktivasyon enerjilerini ($\Delta E^\ddagger$) hesaplamak ve bu enerjilerin enzimdeki flavın için ölçülmüş indirgenme hızı (k_{red}) ile olan korelasyonunu incelemektir.

Bu çalışmanın sonuçları Monoamin oksidaz enziminin aminleri oksitleme mekanizmasını aydınlatmada önemli ipuçları verebileceği gibi birçok aromatik kafese sahip diğer flavo enzimlerin reaksiyon mekanizması hakkında da önemli bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca depresyon ve Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere ileride yapılabilecek ilaç geliştirme çalışmalarına ışık tutacaktır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. ENZİMLER

II.1.1. Enzimler ve Ko-enzimler [18-22]

Enzimler biyolojik reaksiyonlarda katalizör görevi gören proteinlerdir. Vücuttaki tüm reaksiyonlar enzimler tarafından yürütülürler. Enzimler bir reaksiyonun hızını arttıran ve katalizledikleri reaksiyon sırasında tüketilmeyen protein katalizörlerdir.

Katalizörler, hız belirleyici basamağın aktivasyon enerjisini katalizörsüz reaksiyondan daha küçük bir değere sahip olabilecek şekilde yeni bir reaksiyon adımı sağlayarak reaksiyonu kolaylaştırırlar. Enzimler bunu birçok yoldan yapabilirler. Örneğin enzim-substrat kompleksinin enerjisini artırmakla, geçiş konumunu daha kararlı yaparak veya ara ürünlerin enerjisini artırarak hız belirleyici adımın aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar. Sonuç olarak düşük aktivasyon enerjili ve birden çok basamaklı daha hızlı bir reaksiyon oluşur.

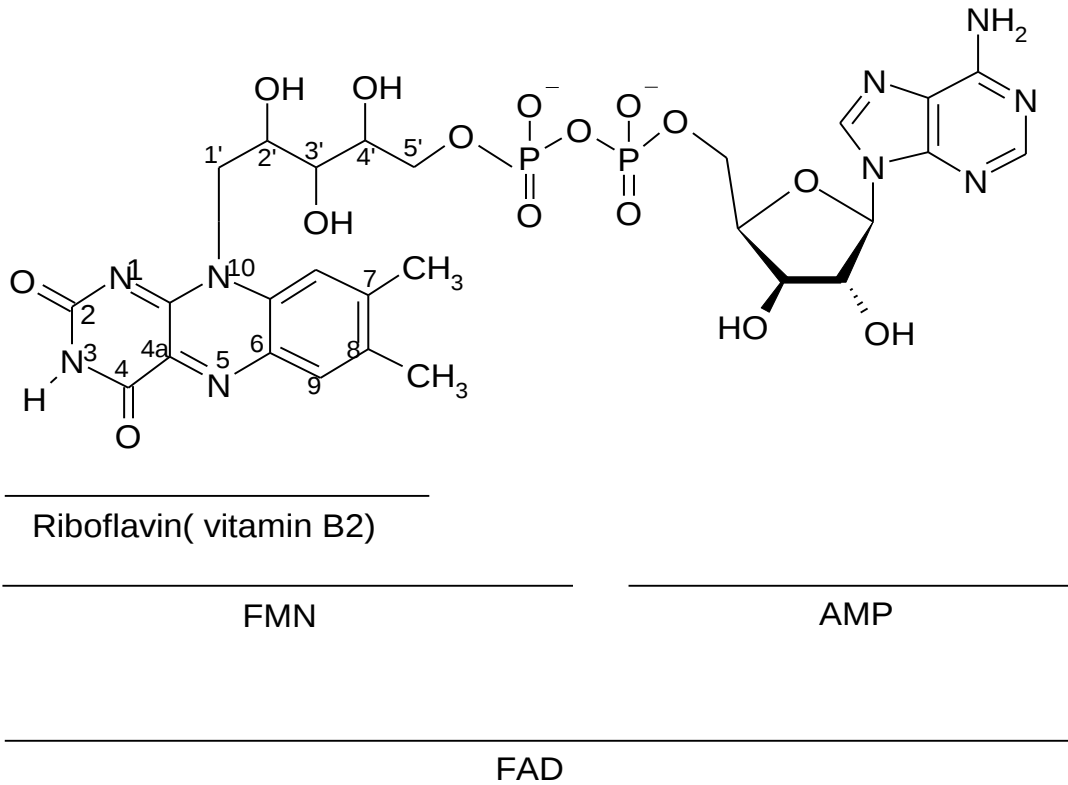
Proteinler tarafından katalizlenebilen reaksiyonların kimyası aminoasitlerin yan zincirlerinde bulunan fonksiyonel grupların özellikleri tarafından belirlenir. Bunlar histidinin imidazol halkası, glutamat ve aspartatın karboksil grubu, serin, teronin ve tirozinin hidroksil grubu, lizinin amino grubu, arjininin guanidinyum grubu ve sisteinin sulfidril grubudur. Ayrıca bu gruplara ilave olarak bu tez çalışmasının da kapsamında olan aromatik amino asitlerin enzim aktivitesindeki önemi literatürde yer almaktadır [3, 15]. Bu gruplar proton transferlerinde asit, baz veya nükleofil gibi davranıp katalizör görevi görürler. Bununla birlikte, çoğu metabolik reaksiyonda

meydana gelen kimyasal değişiklikler tek başına enzimlerin aminoasit zincirlerindeki fonksiyonel gruplar tarafından yapılamaz. Bu reaksiyonların katalizlenmesinde enzimler, ko-enzim denilen özel kimyasal reaktiviteye sahip küçük organik moleküllerle veya metal katyonlarla birlikte hareket etmek zorundadır. Ko-enzimlerin çoğu suda çözünebilen vitamin türevleridir. Fakat bir kısmı vücutta sentezlenebilir. Her bir ko-enzimin hücre içinde özel bir fonksiyonu vardır. Enzimlerin etki edebilmeleri için öncelikle substratlar ve ko-enzimler üzerindeki bazı yapısal özellikleri tanımaları gereklidir.

Bu tez çalışmasının konusunu oluşturan MAO enzimi ko-enzim olarak flavin halkasına sahiptir.

II.1.1.1. Flavin Ko-enzimleri

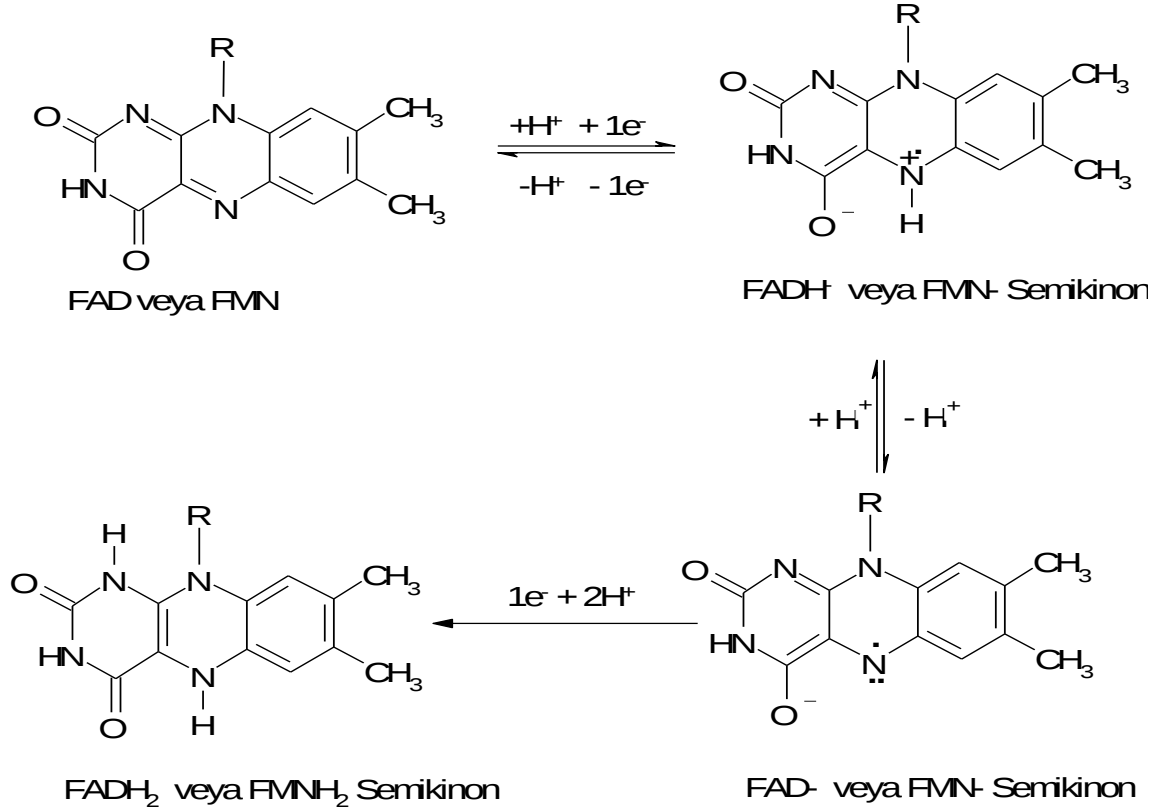
Flavin, ko-enzim olarak oksijenle birlikte bazı redoks reaksiyonlarına katılır. Flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mono nükleotid (FMN) B₂ vitaminin ve riboflavinin aktif koenzimleridir (Şekil II.1).



Şekil II.1 Riboflavin Vitaminin Yapısı

Riboflavin FAD'nin N¹⁰-ribitilizoalloksazin kısmıdır. Bu kısım enzimatik bir şekilde önce ribitil C5'hidroksi grubunun fosforilasyonu sonra adenilasyonu ile FAD'ye çevrilir. FAD ve FMN fonksiyonel olarak eş koenzimleridir. Katalitik fonksiyonel bölge izoalloksazin (flavin) halkasıdır. N5 ve C(4a) pozisyonlarının kataliz reaksiyonlarında merkez oldukları düşünülmektedir.

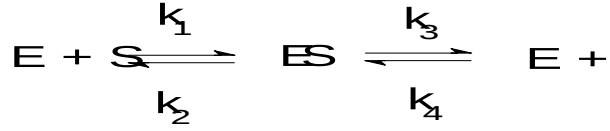
Flavin koenzimi spektroskopiyle tespit edilebilen 4 ayrı oksidasyon derecesine sahiptir (Şekil II.2) [22]. Yükseltgenmiş, bir elektronla indirgenmiş ve iki elektronla indirgenmiş formları vardır.



Şekil II.2 Flavin Koenziminin Farklı Oksidasyon Dereceleri

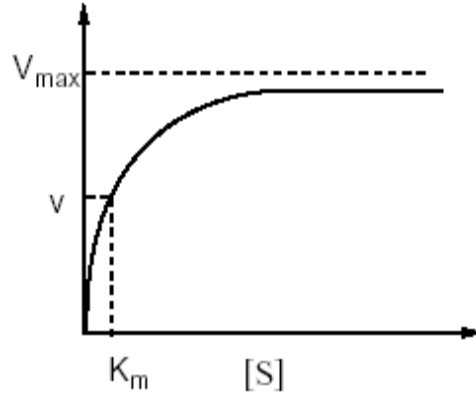
II.1.2. Enzim Katalizli Reaksiyon Kinetiği

Enzimlerin belirli katalitik bölgeleri vardır. Substratlar (S) enzimlerin (E) aktif bölgelerine bağlanarak enzim-substrat (ES) kompleksleri oluştururlar. Daha sonraki aşamalarda bağlanmış substrat ürünlere (P) dönüşür ve enzim tekrar aktif formuna döner (Şekil II.3).



Şekil II.3 Enzim-katalizli Reaksiyonlar

Reaksiyonun toplam hızı ES konsantrasyonuna bağlıdır. Durağan Hal yasasına göre, enzim ve substrat karıştırıldıktan kısa süre sonra [ES] yaklaşık olarak sabit kalır. Durağan hal durumunda reaksiyonun hızı (v) substrat konsantrasyonuna hiperbolik olarak bağlıdır. Hız düşük konsantrasyonda [S]'ye bağlıdır, fakat enzim tamamen substratla kaplandığında hız maksimuma (V_{max}) ulaşır (Şekil II.4).

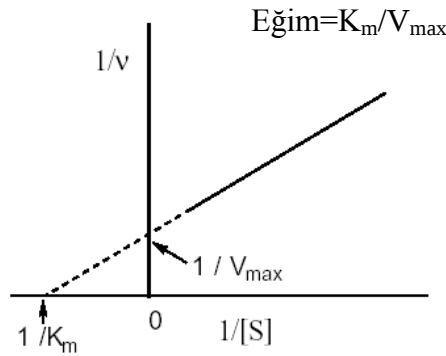


Şekil II.4 Enzim-katalizli Reaksiyonların Substrat Konsantrasyonuna [S] Bağlı Hız Değişimi

Bütün enzim enzim-substrat kompleksine çevrildiği zaman reaksiyon maksimum hıza ulaşır. K_m (Michaelis sabiti) reaksiyon hızı $V_{max}/2$ iken substrat konsantrasyonuna eşittir. Eğer ES serbest enzim ve substratla denge durumundaysa K_m , ES kompleksinin disosiasyon sabitine (K_d) eşittir. Genelde K_m en az üç hız sabitine bağlıdır ve K_d 'den büyüktür. k_{cat} (dönüm sayısı), birim zamanda bir aktif bölgede ürünlere çevrilebilen maksimum substrat molekül sayısıdır ve V_{max} 'in toplam enzim konsantrasyonuna oranıdır. k_{cat}/K_m (belirlilik sabiti), düşük substrat konsantrasyonunda enzimin ne kadar hızlı çalışacağını bir göstergesidir. Bu sabit aynı enzim için birden fazla bileşiğin substrat olarak göreceli reaktivliklerini gösterir. Büyük değer daha iyi bir substrat olduğunu gösterir.

II.1.2.1. Kinetik Parametrelerin Ölçülmesi

Kinetik parametreler ilk reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna bağlı fonksiyonunun ölçülmesiyle tespit edilir. Enzimatik reaksiyon hızı genel olarak enzimle substratın karıştırılıp çok az bir miktarda ürün oluştuğu zaman veya substratın konsantrasyonu ilk değerine çok yakın olduğu bir zamanda, ürün oluşumu veya substratın kaybolma süresinin gözlenmesiyle ölçülür. Ölçümler genel olarak değişik substrat konsantrasyonlarında tekrar yapılır ve konsantrasyonun ilk hızı nasıl değiştirdiği gözlemlenir. $1/[S]$ 'nin $1/v$ 'ye göre grafiğinden K_m ve V_{max} değerleri bulunabilir (Şekil II.5).



Şekil II.5 ‘Lineweaver-Burk Double-reciprocal’ Grafiği.

Substrat veya ürün konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi genellikle spektrofotometrik tekniklerle ölçülür.

II.1.2.2. Enzim Kataliz Mekanizmaları

Enzim mekanizmasını açıklamaya çalışırken bazı faktörler göz önüne alınır. Bunlar genel olarak; (1) yakınlık etkisi, (2) elektrostatik etkiler, (3) asit-baz katalizörlüğü (4) nükleofilik-elektrofilik katalizörlük ve (5) yapısal esnekliktir.

Temelde yakınlık etkisi, molekül içi ve moleküller arası reaksiyonlar arasındaki entropi farkıyla açıklanır. Moleküller arası reaksiyonları katalizleyen enzimler yakınlık etkisiyle reaktantları aktif bölgeye yakın bir bölgede tutup reaktif grupları reaksiyon için uygun geometriye sokar. Substrat enzime yakın bir noktaya geldiğinde bir sonraki adımda reaksiyon kinetik olarak molekül içi bir reaksiyon gibi davranır. Böylelikle sadece geçiş konumunda meydana gelen entropi azalması daha

erken bir adımda, yani enzim-substrat kompleksinde meydana gelmiştir. Bu basamak genelde enzim ve substrattaki polar grupların elektrostatik etkileşimi ve bunun sonucunda entalpinin düşmesiyle tetiklenir.

Elektrostatik etkileşimler geçiş konumunun oluşumuna neden olabilirler. Enzimin yüklü veya polar grupları geçiş konumunda yüklerin yeniden dağılımını sağlamak için uygun konuma gelirler. Enzim-substrat kompleksi ile geçiş konumunun enerji farkı proteinin yapısına bağlıdır.

Genel asit-baz katalizörleri, reaksiyon için gerekli oldukça yüksek veya düşük pH ortamını sağlar. Katalizörün görevi reaktif grubun elektrofilik veya nükleofilik özelliğini artırarak reaktivitesini artırmaktır. Birçok durumda bu durum proton alıp vermekle sağlanır.

Enzimatik fonksiyonel gruplar nükleofilik veya elektrofilik katalizör olarak çalışabilirler. Bu katalizörlerin temel özellikleri substratla kovalent bağlı ara ürünler oluşturabilmeleridir.

Yapısal esneklik enzimin substratı çözücü ortamdan ayırıp bir cep içerisinde belli bir yakınlıkta ve diğer etkilerden uzak tutup hızlı bir şekilde reaksiyona girmesini sağlar.

II.1.2.3. Enzim İnhibisyonu

Bazı bileşikler substratın enzime bağlanmasını veya ES kompleksinin ürünlere dönüşmesini engelleyerek enzimi inhibe edebilirler. İki çeşit inhibitör vardır: tersinir inhibitörler ve tersinmez inhibitörler.

Tersinir inhibisyon herhangi bir kovalent etkileşim içermez. Tersinir inhibitörler ‘competitive’, ‘un-competitive’ ve ‘non-competitive’ olmak üzere üç gruba ayrılırlar:

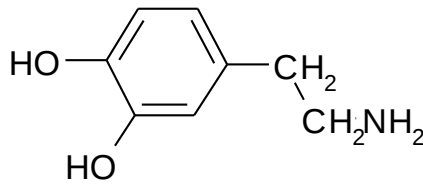
- ‘Competitive’ inhibitör substrat ile aktif bölgeye bağlanmak için yarışır. Sonuçta yüksek substrat konsantrasyonları bu inhibitörlerin etkisini elimine edebilir. ‘Un-competitive’ inhibitörler başka bir bölgeye bağlanarak aktif bölgenin substrat ile bağlı olup olmamasından etkilenmeyerek reaksiyonu bloke edebilirler.
- ‘Un-competitive’ inhibitörler K_m değerini değiştirmeden enzimatik reaksiyon hızını düşürürler. Bu tür inhibitörler substrat miktarına bağlı olmaksızın belli bir enzim miktarını işlem dışı bırakırlar.

- ‘Non-competative’ inhibitörler diğerlerinden farklı olarak serbest enzime değil de enzim substrat kompleksine bağlanırlar. Bu üç türlü inhibisyon, hızın substrat ve inhibitör konsantrasyonuna bağlı fonksiyonuyla ayırt edilebilir.

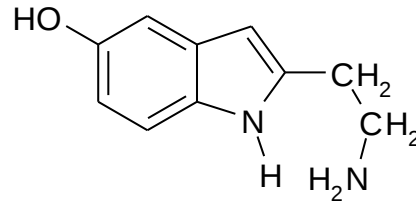
Tersinmez inhibitörler (inaktive ediciler) enzimleri geri dönüşümsüz inaktive ederler. Bu tür inhibitörler aktif bölge ile karakterize edilebilen kovalent bağlı kompleksler oluşturarak aktif bölgenin yapısı hakkında bilgi verebilirler.

II.2. MONOAMİN OKSİDAZ

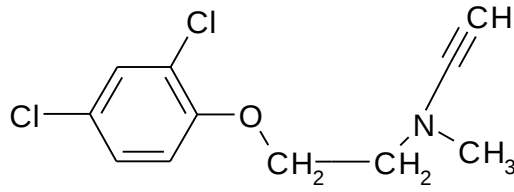
Mitokondrial monoamin oksidaz (EC 1.4.3.4; MAO) flavin içeren, mitokondri zarının dışında bulunan bir enzimdir [23]. 1968’de MAO’nun iki farklı izo enziminin var olduğu bulunmuş ve bu izo enzimlere MAO A ve MAO B isimleri verilmiştir. İnsan beynindeki MAO’nun %80’i MAO B’dir. Trombositlerde bu oran %98’dir. MAO A ise karaciğer ve bağırsak çeperlerine yerleşmiştir. İki izo enzim farklı genlerden sentezlenmesine rağmen %72 oranında gen dizilimleri benzerdir[3, 24, 25]. Her iki izo enzim de substrat tercihleri, inhibitör özgünlüğü, doku dağılımları, immünolojik özellikleri ve aminoasit dizimleri bakımından ayırt edilebilirler[23]. MAO A, seçici olarak epinefrin ve serotonini oksitler ve yaygın olarak kullanılan inhibitörü klogilindir [20] . MAO B’nin ise seçici substratı dopamin, inhibitörü (R)-deprenildir [7] (Şekil II.6). MAO A’nın inhibe edilmesi beyindeki noradrenalin ve serotonin miktarını arttırırken depresyon durumunda bu aminlerin miktarı önemli ölçüde azalır. MAO B’nin inhibisyonu ise dopamin deaminasyonunu azaltırken Parkinson hastalığında beyindeki dopamin miktarı önemli ölçüde azdır [26].



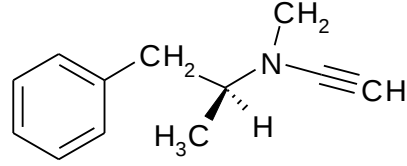
Dopamin



Serotonin



Klorgilin

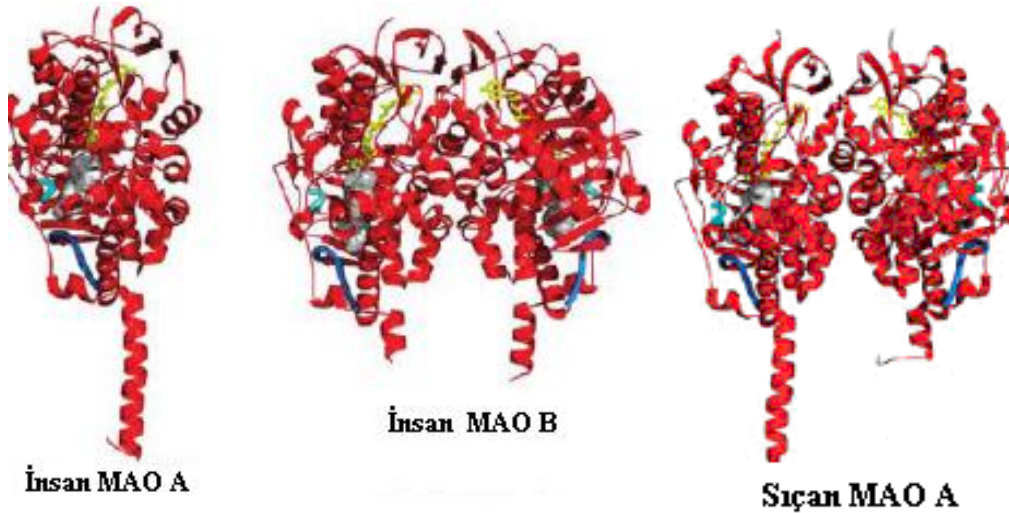


L-Deprenil

Şekil II.6 MAO'nun Seçici Substrat ve İnhibitörleri

Bu aminler metabolizmada canlılık, sıcaklık düzeni, yeme davranışları, saldırganlık, cinsellik, uyku ve hipofizin düzenlenmesi gibi temel işlevlere etki ederler. Yapılan tıbbi çalışmalarda dopaminin Parkinson hastalarında, serotoninin ise depresyon hastalarında önemli oranda azaldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle MAO enzimini inaktive eden bileşikler antidepresif ve antiparkinson gibi farmakolojik özelliklere sahiptir.

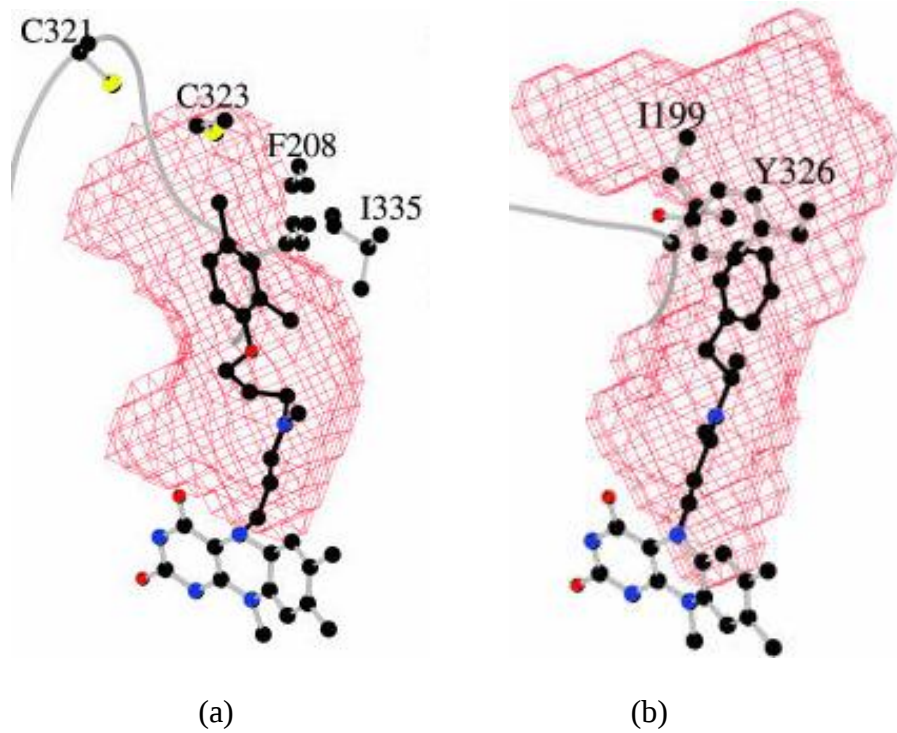
MAO A ve MAO B'nin sahip oldukları yapısal farklılıkların temelinde insan MAO A'sının monomer şeklinde kristallenmesine karşın sıçan MAO A'sı ve insan MAO B'si monomerlerinin arasında toplam yüzeylerinin %15'ine sahip bir alan etkileşimi ile dimer olarak kristallenmesi vardır (Şekil II.7).



Şekil II.7 İnsan ve Sıçan MAO A'sının, İnsan MAO B'sinin Kristal Yapıları

İnsan MAO A ve MAO B'sinin aktif bölge boşluklarının temel yapısal benzer özelliklerinin başında hidrofobik bir boşluğa, flavin yapısı ve flavinin *re*- yüzündeki tirozin amino asitlerinden oluşan aromatik kafese sahip olmalarını söyleyebiliriz [3].

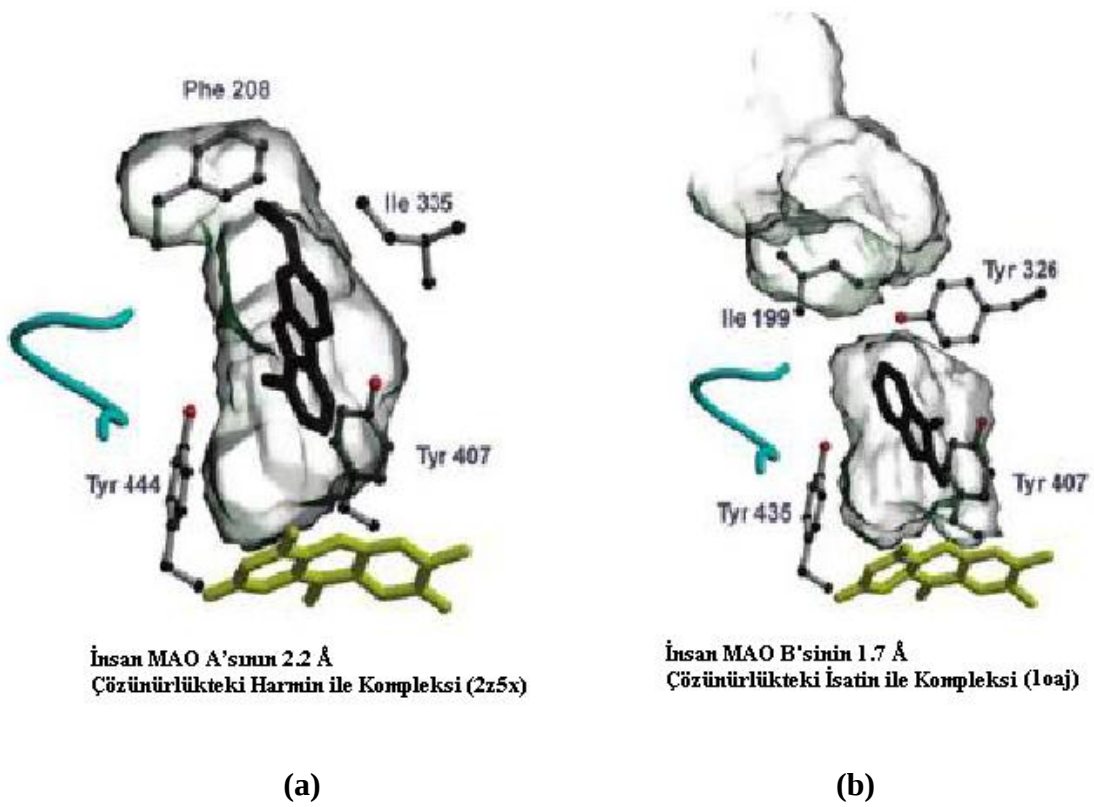
Bu sebeple her iki enzimin aynı kataliz mekanizmasını izledikleri ileri sürülmektedir[10]. Aktif bölge yapılarındaki farklılıklara gelince insan MAO A'sı yaklaşık 550 Å³'lük kısa ve geniş bir substrat boşluğuna sahip iken MAO B'nin substrat boşluğu ise dar ve uzun olmasının yanında 700 Å³'lük bir hacme sahiptir (Şekil II.8). Bu farklılığın izo enzimler olan MAO A ve MAO B'nin substrat ve inhibitör seçiminde de etkili olduğu düşünülmektedir. MAO A ve MAO B aktif bölgeleri 20 şer adet amino asit içerirken bu aminoasitlerden sadece 7 tanesi farklılık göstermektedir.



Şekil II. 8 (a) MAO A'nın, (b) MAO B'nin Aktif Bölge Boşlukları

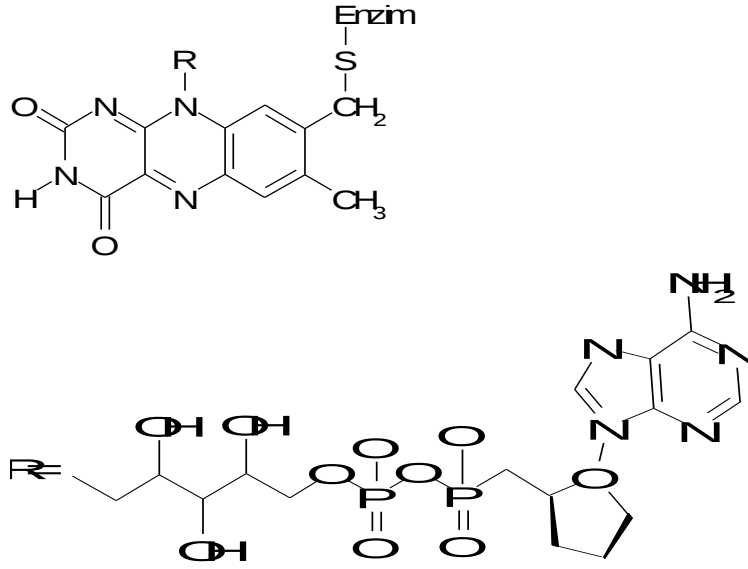
Yukarıda Şekil II.8'de görüldüğü gibi aktif bölgelerinde hacim farklılıkları taşımalarının yanında başka farklılıklar da içermektedirler. MAO A'nın son dönem rapor edilen 2.2 Å çözünürlüklü harminli kompleksinin kristal yapısı iki enzim arasındaki farklılıkları çok daha detaylı bir şekilde sunmaktadır. Örneğin iki izo enzimin aktif bölgelerin hacim farklılıklarının yanında MAO A'nın aktif bölgesinin tek loptan oluşmasına karşılık MAO B'nin aktif bölgesi yaklaşık 300 Å³'lük bir giriş lobu ve yaklaşık 400 Å³'lük substrat lobu olmak üzere iki ayrı lobtan oluşmaktadır (Şekil II. 9). MAO B'nin aktif bölgesinin büyük bir tek boşluk ya da iki boşluklu olup olmayacağı Ile199'un konformasyonu tarafından belirlenmektedir. Söz konusu yan zincir aminoasidinin açık ya da kapalı konformasyonu flavine bağlı olan ligandın

yapısına bağlıdır [13]. İnsan MAO A'sında karşılık gelen Phe208 amino asidi bir kapı olarak fonksiyona sahip değildir. Şöyle ki MAO B'de Ile199Phe mutasyon deneyleri 199 pozisyonunda Ile olmasından daha iyi sonuçlar vermiştir [27]. MAO A ve MAO B yapıları arasındaki diğer bir farklılık MAO B'deki aktif bölgenin ikiye ayrılmasından dolayı olarak sorumlu olan Tyr326 yan zincir aminoasidi MAO A'da aynı pozisyona karşılık gelen Ile335 aminoasidine göre daha sınırlayıcı bir etkiye sahiptir. Sonuç olarak MAO A'da Phe208-Ile335 ve MAO B'de Ile199-Tyr326 amino asit çiftleri iki iz enzim arasındaki inhibitör ve substrat seçimlerindeki farklılıkta temel belirleyici neden olduğu görülmektedir [28].



Şekil II. 9 (a) MAO A'nın, (b) MAO B'nin Aktif Bölge Boşluklarındaki Farklılıklar

MAO'nun aktif bölgesinde oksidasyon reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlayan FAD vardır. FAD her iki enzimde FAD 8- α pozisyonundan MAO A için Cys406, MAO B için ise Cys397'nin yan grubuna kovalent bağlıdır [29](Şekil II.10).



Şekil II.10 MAO'nun Aktif Bölgesindeki FAD'nin Yapı Formülü

II.2.1. Aromatik Kafes

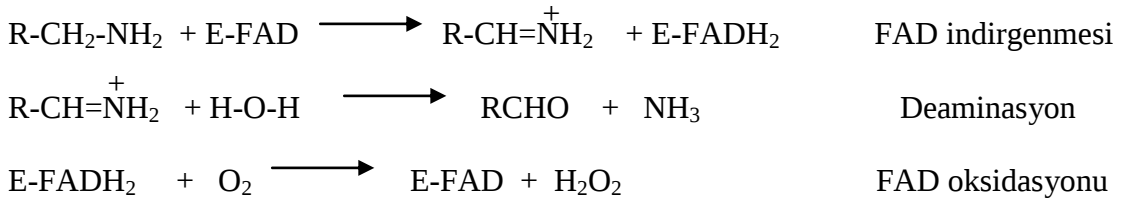
Flavo enzimlerin bazılarında substratın flavine yaklaştığı ön bölgesinde aromatik amino asitler birbirine yaklaşık paralel, flavine ise yaklaşık dik durumda bulunmaktadır. Bu yapı Edmondson tarafından “aromatik kafes” olarak adlandırılmıştır [30]. MAO da aromatik kafes birbirine yaklaşık 7.8Å mesafede bulunan iki tirozin amino asidi (MAO-A; Tyr407-Tyr444, MAO-B; Tyr398- Tyr435) ile oluşturulmuştur [3] (Şekil I.3). Aromatik kafes amin oksidasyonunda görevli başka bazı flavo enzimlerde de bulunmaktadır. Poliaminoksidazda birbirine 8.2Å mesafede bulunan Phe403-Tyr439, bakteriyel trimetilaminoksidazda 8.5Å mesafede Tyr64-Trp264 ile oluşturulmaktadır[31]. Özellikle flavin koenzimine sahip amin oksidazlarda aromatik kafes benzeri yapıların bulunması aromatik amino asitlerin amin bileşikleri ile etkileşiminin bu tür reaksiyonlarda önemli olduğuna işaret etmektedir.

Aromatik kafesi oluşturan tirozil yan zincirlerinin olası fonksiyonlarını araştırmak amacıyla Edmondson ve ekibi MAO B'deki Tyr435, MAO A'da ki Tyr444 amino asidini mutasyona uğratarak aktivasyon ölçümleri yapmıştır [14]. Bu araştırmanın sonucu olarak aromatik kafesin fonksiyonlarından birinin amin substratını daha polarize hale getirerek Polar Nükleofilik Mekanizma için daha etkili bir nükleofil haline getirdiğini ileri sürmektedir. Diğer bir rolünün ise amin substratının flavin halkasında reaksiyona gireceği pozisyona kadar reaksiyon yolunun belirlenmesinde rehberlik yapması olduğu literatürdeki çalışma sonuçları

arasındadır[32]. Erdem ve grubu tarafından yapılan aromatik kafesin önemi hakkındaki teorik çalışma da deneysel bulgular ile örtüşmektedir[15].

II. 3. MAO AMİN OKSİTLEME MEKANİZMALARI

MAO nörotransmitter aminleri oksidatif deaminasyonla iminlere dönüştürür. Oluşan bu iminler daha sonra enzimatik olmayan bir şekilde hidroliz olup aldehit ve amonyağa parçalanır[20]. İndirgenmiş FAD ise moleküler oksijenle yükseltgenerek yeniden reaksiyon için hazır hale gelir. Deaminasyonda her iki izoenzim için de üç kademe vardır ve basamakları Şekil II.11'deki gibidir;



Şekil II.11 MAO Katalizli Deaminasyon Mekanizması

İkinci basamakta oluşan aldehit ürünü hızlı bir şekilde aldehit redüktaz enzimiyle alkole indirgenebilir veya aldehit dehidrogenaz enzimiyle karboksilik aside yükseltgenebilir. Enzimatik reaksiyonda moleküler oksijen vasıtasıyla indirgenmiş flavin tekrar yükseltgenir ve ortamda hidrojen peroksit oluşur. Bir hipoteze göre farklı patolojik dönemlerde farklı özel koşullar altında beyindeki dopamin tüketiminin artması hidrojen peroksidin artmasına neden olmaktadır. Bu durum sitotoksit OH[•] radikalinin oluşmasına neden olmakta ve sinirlere oksidatif baskı yaparak hücre ölümüne neden olmaktadır, Parkinson hastalığına da bu radikalik baskıyla gerçekleşen sinir hücresi ölümünün sebep olduğu düşünülmektedir[26].

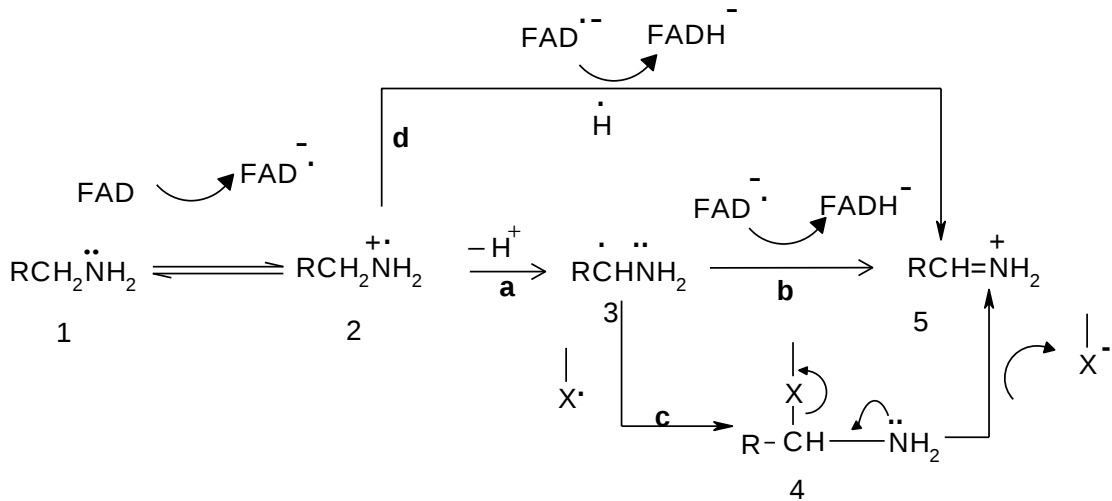
Şimdiye kadar Mono amin oksidaz için bir çok amin oksitleme mekanizması önerilmiştir. Bu mekanizmalardan en önemlileri

1. Tek Elektron Transferli Mekanizma (SET mekanizması)
2. Hidrür Transferi Mekanizması
3. Polar Nükleofilik (katılma ayrılma) Mekanizmalarıdır.

Literatürdeki bir çok çalışma sonucunda dolaylı yollardan her bir mekanizmayı destekleyici deliller elde edilmesine karşın bu mekanizmalara karşıt delillere de ulaşılmıştır.

II. 3. 1. Tek Elektron Transferli Mekanizma

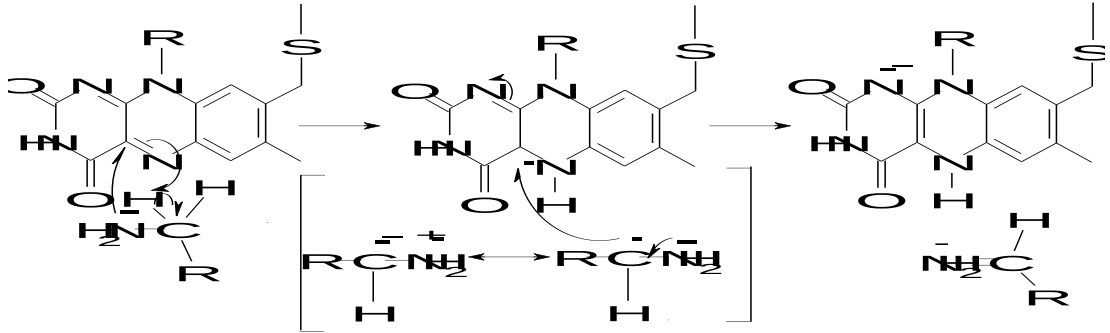
Silverman ve grubunun desteklediği radikal mekanizma (Şekil II.12) ilk olarak substratın amin azotundaki eşleşmemiş elektron çiftinden tek bir elektronun okside flavine transferi ile başlar [22]; amin radikal katyonu ve flavin semikinon oluşur ($FAD^{\cdot-}$). (2)'nin α -karbonunun deprotona olmasıyla α -amino radikal (a yolu) oluşur. (3) ikinci elektronunu semikinona transfer edip indirgenmiş $FADH^-$ ve iminyum iyonu (b yolu) oluşturur veya aktif bölgedeki başka bir amino asit (-X) ile (c yolu) radikalik birleşmeyle kovalent bağlı bir bileşik oluşturur. (4) daha sonra β -eliminasyonu ile iminyum iyonuna dönüşür. α -amino radikal oluşumuna alternatif bir yolla yani hidrojen atomu transferiyle (d yolu) α -amino radikali oluşmadan da iminyum iyonu oluşabilir. (2)'nin amin α -hidrojeninin pKa değeri yaklaşık 10 dur ve kolayca bu hidrojen proton olarak ayrılabilir (Şekil II. 12).



Şekil II. 12 Tek Elektron Transfer Mekanizma (SET)

SET mekanizması bazı inaktivasyon çalışmalarıyla desteklenmesine rağmen bazı deneyler mekanizmaya karşı kanıtlar sunmuştur. Karşıt fikirlerden ilki, yapılan incelemelerde aktif bölgede radikal flavin türünün tespit edilememesidir [33, 34]. İkinci karşıt delil ise amin substratından flavine tek bir elektron transferi termodinamik açıdan mümkün görülmemektedir [34]. Diğer bir kanıt ise bazı 1-

siklopropil-4-substitüe-1,2,3,6-tetrahidropiridinler MAO için çok iyi substratlarken SET mekanizmasına göre ise iyi mekanizma bazlı inaktivatör olmaları gerekmektedir [35]. Bu karşıt deliller bu mekanizmanın modifiye edilmesini gerekli kılmıştır. Şekil II.13'te verilen yeni mekanizma önerisine göre elektron flavine aktarılır.

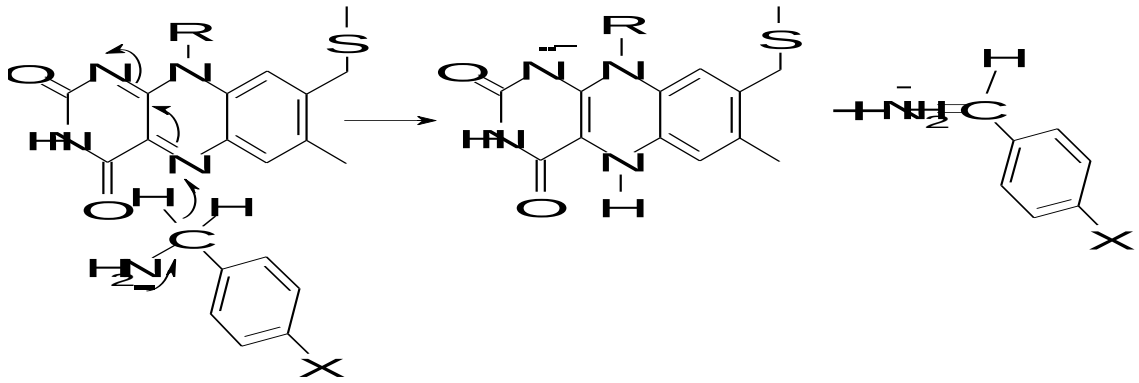


Şekil II.13 Modifiye Radikal Mekanizma

Bu mekanizma halka açılması gibi deneysel ve model çalışmalarla MAO B için incelenmiştir [32]. Tek elektron transferinin gerçekleşmesinin termodinamik olarak zor olması karşıt delil olarak öne sürülmektedir. Ancak, Silvestreman'a göre gergin bağlanmalar, moleküllerin bükülmesi gibi durumlar elektron aktarımının indirgenme yükseltgenme potansiyelini düşürebilir. Birçok yayın bu türden yüksek enerjili reaksiyonların enzim aktif bölgesinde gerçekleşebileceğini göstermiştir [36]. Burada tek elektron transferini izleyen ikinci adım proR-hidrojenin flavine aktarılması şeklinde gerçekleşir.

II. 3. 2. Hidrür Transfer Mekanizma

Bu mekanizmaya göre amin α -hidrojeni hidrür (H^-) olarak flavine aktarılır [37, 38]. Böylelikle tek adımda iki elektron ve bir proton flavine aktarılarak amin iminyum katyonuna oksitlenir (Şekil II.14). Ancak, önceleri hidrür transferinin yüksek enerji gerektirmesi bu mekanizmanın pek olası olmadığını düşündürmüştür.



Şekil II.14 Hidrür Mekanizma

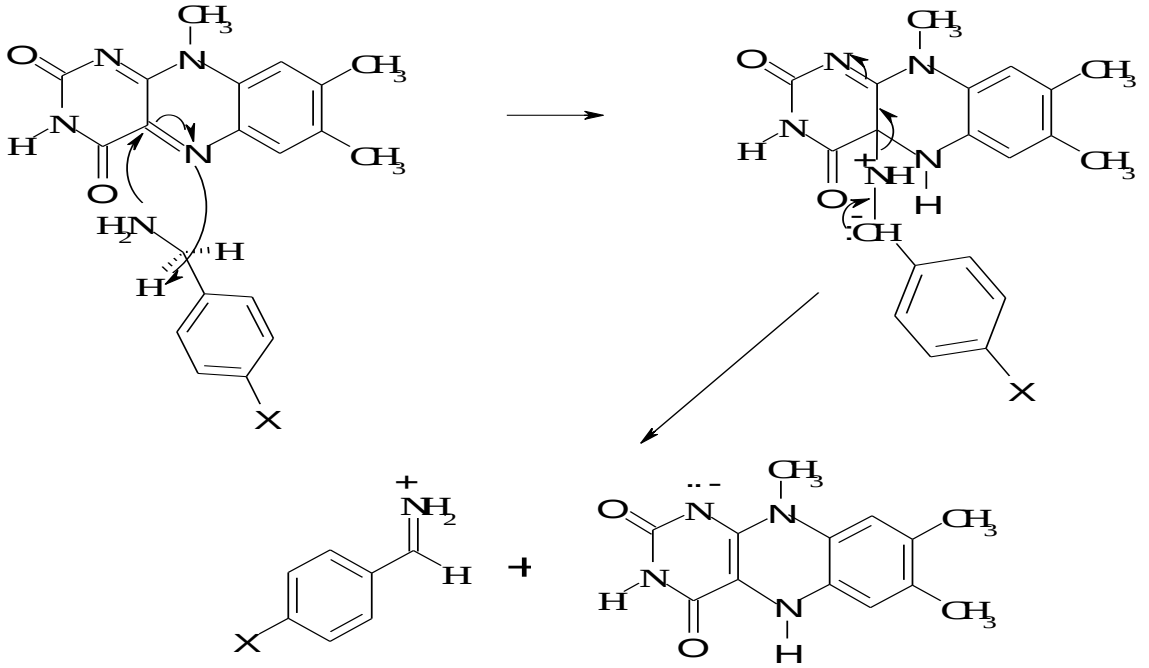
II. 3. 3. Polar Nükleofilik Mekanizma

Polar Nükleofilik Mekanizma primer ve sekonder aminlerin kimyasal model çalışmalarıyla önerilmiştir [39, 40] Bazı koşullarda benzilaminin, flavin modeli olan 3-methylumiflavin varlığında benzaldehide okside olduğu tespit edilmiştir [41]. Edmondson tarafından önerilen nükleofilik (katılma-ayırılma) mekanizmaya göre; amin azotu flavin üzerinde bulunan C2, C(4a), N(5) gibi elektrofilik bölgelerden birine nükleofilik saldırıda bulunarak kovalent bağ oluşturur. Ardından α -hidrojeni bir aktif bölge bazı tarafından kapılır [42]. Mekanizma önerildikten bir süre sonra MAO B kristal yapısı x-ışını ile aydınlatılmış ancak aktif bölgede protonu kapabilecek bir amino asit ucuna rastlanmadığı için mekanizma için modifiye edilmiştir. Buna göre amino azotu flavine nükleofilik saldırıda bulunur ve kovalent bağlı bir ara ürün oluşur (Şekil II.15). Ardından amin α -hidrojeni flavin N5 azotuna aktarılır. Bu sırada α -karbon üzerinde oluşan yük birikmesi amino azotuna doğru aktarılarak ara ürün iminyum ve indirgenmiş flavine dönüşür. Bu mekanizmayı destekleyen çalışmalar p-süstitüe benzilamin analoglarının MAO A ile inkübasyonları sonucu ortaya çıkmıştır[12]. α -karbonunda hidrojen yerine döteryum kullanılması kinetik parametreleri çok fazla değiştirmiştir. Kinetik izotop etkisi önerilen proton koparma basamağının hız belirleme basamağı olduğunu belirlemektedir. Bu basamakta ara üründe benzilaminin α -karbonunda negatif yük birikmesi olmaktadır. Bu yükü dağıtan etkiler geçiş konumunun enerjisini düşürüp reaksiyonu hızlandırmalıdır. P-süstitüe benzilamin analogları kullanarak yapılan deneylerde flavinin indirgenme hızı benzilaminin para pozisyonundaki grubun elektron çekme

gücüyle orantılıdır. Bu QSAR incelemeleri Şekil II.15'deki mekanizma ile uyumludur. Ancak spektroskopik olarak herhangi bir ara ürün gözlenememiştir.

Polar Nükleofilik Mekanizma proton transferini iki farklı şekilde yapabilir:

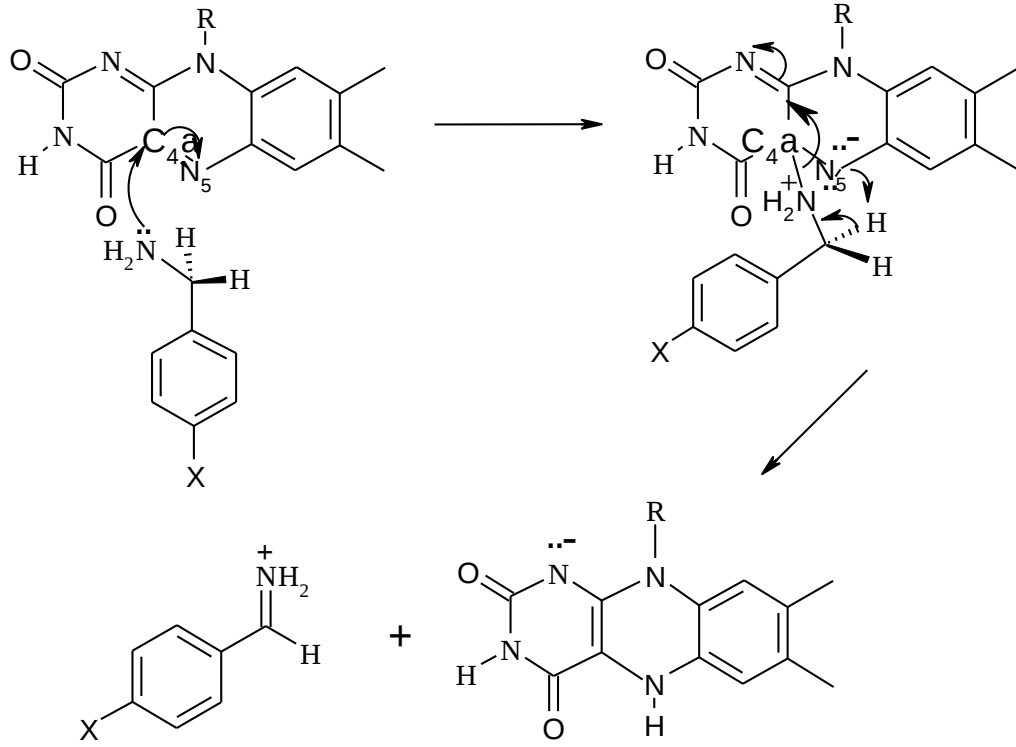
Mekanizma A olarak tanımlanan yolda birinci basamakta H atomu flavine transfer olur (Şekil II. 15). İki basamakta gerçekleşen bu mekanizmanın birinci basamağında benzilaminin amin azotu nükleofilik olarak flavin C4a'ya saldırır ve kovalent bağlı bir ara ürün oluştururken aynı basamakta N5 benzilamin substratının proR H'ini almaktadır. İkinci basamakta ise oluşan ara ürün ayrışarak indirgenmiş flavin ve iminyum katyonuna dönüşmektedir (nükleofilik katılma ve proton transferi aynı basamakta gerçekleşir).



Şekil II.15 Polar Nükleofilik Mekanizma A

Mekanizma B olarak tanımlanan yolda ise H atomu ikinci basamakta flavine transfer olmaktadır (Şekil II. 16). Benzilaminin amin azotu nükleofilik olarak flavin C(4a)' ya saldırır ve kovalent bağlı bir ara ürün oluştururken C(4a)-N(5) arasında çift bağ elektronları N5 üzerine açılarak N5'i negatif yüklü hale getirmektedir. İkinci basamak ise N5 benzilamin substratının proR H'ini almakta ve benzilamin azotu ile C(4a) arasındaki bağ C(4a) ile C10a arasındaki çifte bağ oluşturarak N11'i negatif

yüklü hale getirerek indirgenmiş flavin ile iminyum katyonunu oluşturmaktadır (nükleofilik katılma ve proton transferi farklı iki basamakta gerçekleşir).



Şekil II.16 Polar Nükleofilik Mekanizma B

Polar Nükleofilik Mekanizmaya göre benzilamin α C'u üzerinde oluşan yük yoğunluğunu azaltacak grupların enzim aktivitesini artırtması beklenir. Bu amaçla para süstitüe benzilamin türleri ile yapılan kinetik ölçümler [12] MAO A da mekanizma ile oldukça uyumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca, gaz fazında yapılan hesapsal çalışmalar da bu çalışmaları desteklemiştir [9]. Ancak, MAO B de benzer sonuç elde edilememiştir. Örneğin, MAO A için benzilaminden çok daha iyi substrat olan elektron çekici gruba sahip p-nitrobenzilamin MAO B için zamana bağlı inhibitör gibi davranmaktadır. Polar Nükleofilik Mekanizma için de bazı karşıt deliller öne sürülmüştür. Silverman polar mekanizmanın mikro reversibiliteye ters düştüğünü öne sürmüştür. Ayrıca, sterik olarak ara ürün oluşturamayacak ikincil ve üçüncül aminler MAO için substrat olabilmektedir.

BÖLÜM III

YÖNTEM

III.1. KULLANILAN HESAPSAL YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında kullanılan hesapsal yöntemleri üç grupta toplayabiliriz:

1. Moleküler Mekanik (MM)
2. Kuantum Mekaniği (QM)
 - a. Semi-empirik (Yarı Deneysel)
 - b. Ab Initio
 - c. DFT (Yoğunluk Fonksiyon Teorisi)
3. Hibrit Yöntemler (QMMM)

III.1.1. Moleküler Mekanik

Moleküllerin geometrilerini hesaplariken klasik mekanik yöntemleri kullanır. Sistemin enerjisi çekirdeklerin pozisyonlarına göre hesaplanarak elektron hareketleri ihmal edilir. Her bir atomun çevresinde kuvvet alanları hesaplanır ve diğer atomlarla etkileşim bu kuvvet alanları ile hesaplanır. Her bir moleküler mekanik yöntem farklı kuvvet alanları kullanır. Her bir kuvvet alanı aşağıdaki parçalardan oluşur:

- a. Moleküllerin potansiyel enerjilerinin molekülü oluşturan atomların yerlerine göre değişimini veren denklemler kümesi.
- b. Aynı elementin değişik kimyasal ortamlarda özelliklerini içeren bilgiler.
- c. Denklemlere ve atom çeşitlerine uyan deneysel parametreler. Bağ uzunlukları, bağ açıları gibi.

Bir sistemin potansiyel enerjisi bazı etkileşimlerin enerjilerinin sisteme katkısı olarak hesaplanır. Sistemin enerjisini veren matematiksel denklemde:

$$V = V_{\text{gerilme}} + V_{\theta} + V_{\text{vdw}} + V_{\text{es}} + V_{\text{w}} \quad [\text{III. 1}]$$

5 katkıya göre hesaplanır.

V_{gerilme} : Bağların esneyip gerilmesinden

V_{θ} : Bağların bükülmesinden

V_{vdw} : Van der Waals etkileşimlerinden

V_{es} : Elektrostatik etkileşimden

V_w : Molekül içindeki tekli bağların dönmesinden (internal rotation) kaynaklanan terimlerdir.

Bu etkileşimler deneysel verilerle parametrize edilmiştir. Bu sayede önemli sayıda atom içeren moleküllerin hesaplamaları çok kısa sürede yapılabilir. Ancak, elektronik etkileri de parametrelerle hesaplamalara dahil etmesinden dolayı elektronik etkilerin ağır bastığı özelliklerin açıklanmasında yetersizdirler[43].

Moleküler mekanik yöntemlerin fazlasıyla parametrize olması parametrelerin önerilen sisteme uygun olmadığı durumlarda hata oranının yüksek olmasına sebep olur. Son zamanlarda moleküler mekanik ve moleküler dinamik yöntemler ileri kuantum mekanik yöntemlerle parametrize edilebilmektedir. Bu sayede proteinler ve çözücü sistemleri gibi büyük sistemler için ileri kuantum mekanik yöntemlere yakın hassasiyette sonuçlar elde edilebilmektedir.

Bu tez çalışmasında UFF (Universal Force Field) Moleküler Mekanik yöntemi kullanılmıştır. Kullanımı oldukça yaygın olan bu yöntem Gaussian 98W, 03W ve 09W moleküler modelleme programlarında hazır olarak bulunmaktadır.

III.1.2. Kuantum Mekaniği

Kuantum mekaniğinin temelleri 1925’de Heisenberg, Born, Jordon ve 1926’da Schrodinger tarafından atılmıştır. Kuantum mekaniği hesaplamalarında klasik fizik kanunlarından faydalanmaz, elektron ve çekirdekler arası etkileşimler aracılığı ile molekülleri ve moleküler geometriyi tanımlar. Moleküller moleküler orbitaller ve bu orbitallere ait dalga fonksiyonları şeklinde ifade edilirler. Schrodinger tarafından aşağıdaki denklem çıkarılmıştır. Doğru sonucun çıkartılabilmesi için moleküler orbitale ait dalga fonksiyonunun doğru tahmin edilebilmesi gerekmektedir.

$$H\psi=E\psi$$

[III.2]

H: Hamilton Operatörü

E: Enerji ψ : Dalga Fonksiyonu

Hamilton operatörü moleküldeki bütün parçacıkların kinetik ve potansiyel enerji terimlerini ve bütün parçacıklar arasındaki elektrostatik etkileşimlerini simgeler. Operatörün molekülün dalga fonksiyonuna etkisi sistemin enerjisini verir. Bu operatör bir sistemdeki bütün elektron ve çekirdeklerin kinetik ve potansiyel enerjilerine ait terimleri içerir. Etkileşen çekirdek ve elektronlardan oluşan bir sistem için hamiltonyen genel olarak aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 - k \sum_{i,I} \frac{Z_I e^2}{|\vec{r}_i - \vec{R}_I|} + \frac{1}{2} k \sum_{i \neq j} \frac{e^2}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} - \sum_I \frac{\hbar^2}{2M_I} \nabla_I^2 + \frac{1}{2} k \sum_{I \neq J} \frac{Z_I Z_J e^2}{|\vec{R}_I - \vec{R}_J|} \quad [\text{III.3}]$$

III.3'te verilen denklemde çekirdekler küçük harfli indislerle, M_I kütlelerine ve Z_I atom numarasına sahip olan çekirdekler de büyük harfli indislerle gösterilir. Birinci ve dördüncü terimler sırasıyla; elektron ve çekirdeğin kinetik enerjileri, ikinci terim; çekirdek ve elektronlar arasındaki Coulomb çekim etkileşimi, üçüncü terim elektronlar arasındaki ve beşinci terim de çekirdekler arasındaki Coulomb etki etkileşimidir. Yukarıda tanımlanan sistem çok parçacık problemidir ve zamandan bağımsız Schrödinger denkleminin çözümüyle belirlenir [43-45]. Bu problemin çözümü oldukça zordur. Bütün denklemin çözümü sadece tek elektronlu sistem olan hidrojen atomu için tam olarak çözülebilmektedir. Denklemin çok elektronlu sistemler için kullanılabilir hale getirilebilmesi için Born-Oppenheimer, Hartree-Fock ve Lineer Combination of Atomic Orbital (LCAO) yaklaşımları kullanılmaktadır, bu yaklaşımları kullanan modellere 'Hartree-Fock' modelleri denir.

III.1.2.1. Hartree-Fock Modelleri

A. Born-Oppenheimer Yaklaşımı:

Elektron ve çekirdek hareketlerinin ayrı ayrı incelenmesi ilkesine dayanır. Bu yaklaşım, kuantum kimyasının yeni keşfedilmeye başlandığı yıllarda Born ve Oppenheimer tarafından önerilmiştir ve hala kullanılmaktadır. Born-Oppenheimer yaklaşımına göre, çekirdeğin kütlesi, elektronun kütlelerinden çok daha ağır olduğundan dolayı çekirdeğin hareketi elektronun hareketine göre ihmal edilebilecek kadar yavaş olduğunu ifade etmektedir. Bu yüzden Schrödinger denklemini yazarken

çekirdeğin kinetik katkısını almaz, sadece çekirdeklerin kendi aralarındaki itmeden kaynaklanan potansiyel enerjilerini sabit bir terim olarak alır. Bu arada elektron-çekirdek etkileşimleri ihmal edilmez ve elektronlar boşlukta kesin bir yerde sabitlenmiş çekirdeğin Colulomb potansiyelini hissederler. Schrödinger denkleminin kütleden bağımsız bu yeni şekline *elektronik Schrödinger* denklemi denir.

$$H_e \psi_e(\{\vec{r}_i\}, \{\vec{R}_I\}) = E_e(\{\vec{R}_I\}) \psi_e(\{\vec{r}_i\}, \{\vec{R}_I\}) \quad [\text{III.4}]$$

Born-Oppenheimer yaklaşımı günümüzde halen yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, elektron ile çekirdeğin hareketinin birbirinden ayıramadığı durumlarda geçersizdir. Örneğin uyarılmış moleküllerde çekirdek çok hızlı hareket etmektedir. III.4 denkleminde tanımlanan elektronik yapının çözümü için de yaklaşım kullanılır[44, 45].

B. Hartree-Fock (HF) Yaklaşımı:

Atomların dalga fonksiyonlarını türetmek için 1928 yılında Hartree tarafından önerilmiştir. Bu yaklaşımda sistemin dalga fonksiyonu N_e adet elektronun her biri için tek elektron fonksiyonlarının çarpımı şeklinde aşağıdaki gibi ifade ediliştir.

$$\psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots) = \Phi_1(\vec{r}_1) \Phi_2(\vec{r}_1) \dots \Phi_{N_e}(\vec{r}_{N_e}) \quad [\text{III.5}]$$

Bu yaklaşım elektronların birbirinden bağımsız olarak hareket ettiğini, ancak her bir elektronun sadece diğer elektronların ortalama alanı ile etkileşimde olduğunu söyler. Bu gerçek sistemler için doğru değildir. Çünkü Coulomb etkileşmesinden dolayı elektronların hareketleri aslında birbirine bağlıdır. Ayrıca, bu fonksiyon parçacık indislerinin değiş-tokuşunda simetri özelliğine sahip değildir. Halbuki çok elektron dalga fonksiyonu komşu indislerin değiş-tokuşuna göre antisimetrik olmalıdır.

Bu metoda 1930 yılında Fock ve Slater tarafından sistemin dalga fonksiyonuna antisimetri özelliği katılmasını sağlayan değişiklik önerilmiştir.

$$\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots) = \frac{1}{(N_e!)^{1/2}} \begin{vmatrix} \phi_1(\vec{r}_1) & \phi_1(\vec{r}_2) & \cdots & \phi_1(\vec{r}_{N_e}) \\ \phi_2(\vec{r}_1) & \phi_2(\vec{r}_2) & \cdots & \phi_2(\vec{r}_{N_e}) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_{N_e}(\vec{r}_1) & \phi_{N_e}(\vec{r}_2) & \cdots & \phi_{N_e}(\vec{r}_{N_e}) \end{vmatrix} \quad [\text{III.6}]$$

Bu yaklaşımın avantajı da tek elektron dalga fonksiyonu içeren [III.6]'daki gibi bir Slater determinantı kullanılması, varyasyonel olması ve toplam enerjiyi minimize eden bir deneme dalga fonksiyonu kullanmasıdır. Fakat Hartree-Fock metodu elektronlar arasındaki korelasyonu göz önüne almaz. Ayrıca bazı geometri optimizasyonlarında başarılı iken, bağ oluşumu ve kırılmasında başarısızdır. Bu yüzden elektron sistemlerinin tanımlanmasında dalga fonksiyonları yerine elektron yoğunluğu kullanan yöntemler daha fazla tercih edilmektedir [45, 46]

III.1.3. Yoğunluk Fonksiyonu Teorisi (DFT, Density Functional Theory)

DFT, toplam elektronik enerji ile toplam elektronik yoğunluk arasında bir ilişkinin var olduğu fikrinden hareketle ortaya çıkmış bir yöntemdir. N sayıda elektron içeren bir sistemi komplike bir dalga fonksiyonunu $\Psi(r_1, r_2 \dots r_N)$ ile ifade etmek yerine çok daha basit bir biçimde elektron yoğunluğu ile $\rho(r)$ ile ifade etmeyi önermektedir [47]. Bu teorinin oldukça uzun bir geçmişi vardır ve temeli Thomas ve Fermi'nin 1920'lerde yaptıkları çalışmalara dayanır. 1980'lerin sonlarına doğru ve 1990'larda çok ilgi görmeye başlamış ve önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Ab Initio yönteminde kullanılan enerji ifadesini hesaplamaları zorlaştırmayacak şekilde biraz değiştirerek HF yönteminin eksikliklerini gidermeye çalışır. Bu teorinin HF yaklaşımından farkı şudur: HF teorisinde çok-elektronlu dalga fonksiyonu Slater determinantı ile ifade edilir. Slater determinantı tek-elektronlu N tane dalga fonksiyonunu kapsayacak şekilde kurulur (N=moleküldeki elektron sayısı) ve N-elektronlu dalga fonksiyonu hesaplanır. DFT yaklaşımı da tek-elektronlu dalga fonksiyonlarını kullanır. Ancak, yalnızca toplam elektronik enerjiyi ve elektronik yoğunluk dağılımını hesaplamaya çalışır. DFT'nin temelindeki fikir, toplam elektronik enerji ile toplam elektronik yoğunluk arasında bir ilişkinin var olduğudur. 1964'te Hohenberg ve Kohn bir sistemin temel durum enerjisi ve diğer özelliklerinin

elektron yoğunluğu ile tanımlanabileceğini gösterdiler. Yani enerji, E , elektron yoğunluğunun $\rho(r)$ tek bir fonksiyoneliidir.

Bu teoriyi, diğer teorilerden çekici yapan nedenler kısaca maddeler halinde özetlenebilir:

1. DFT yöntemini çekici kılan en önemli özellik, hesaplamalarına elektron korelasyonunu dahil etmiş olmasıdır. Elektron korelasyonu, bir moleküler sistemde, elektronların birbirlerinin hareketinden etkilenecek birbirlerinden uzak durma eğiliminde olmaları gerçeğidir.
2. DFT yöntemleri HF yöntemleri ile hemen hemen aynı sürede ve elektron korelasyonunu da hesaba katan sonuçlar verdiği için geleneksel ab initio yöntemlerinden daha üstündür.
3. 3-boyutlu elektronik yoğunluk dağılımının, 3N-boyutlu dalga fonksiyonuna göre daha kolay ele alınabilir olmasıdır.
4. Sonsuz boyutlu periyodik sistemlerin yanı sıra çok sayıda atom içeren ve periyodik olmayan sistemler için de ele alınabilir olmasıdır[48, 49].

DFT’de temel değişken olarak bir sistemin temel haldeki elektron yoğunluğu dikkate alınmaktadır. Sistemin temel halinin özelliklerini belirleyen en önemli karakteristikler, temel halin elektron yoğunluğu ve E toplam enerjisidir. Böylece, yaklaşımda sistemin diğer bütün temel durum özellikleri, Hartree-Fock teorisinde kullanılan tek elektron dalga fonksiyonunun yerine temel durum elektron yoğunluğunun fonksiyoneli olarak ifade edilir. Diğer bir deyişle, Hamiltonyeni $\rho(r)$ belirlediğine göre Hamiltonyenden türetilen her özelliği de $\rho(r)$ belirlemiş olur. Teorinin formülasyonu Hohenberg ve Kohn ve Kohn-Sham tarafından geliştirilmiştir[48]. DFT parçacıklar ve elektronlar arasındaki etkileşme ve korelasyon etkilerini de içeren pratik ve kullanışlı bir yöntemdir.

Günümüzde DFT metotları elektronik enerjiyi birkaç terimin toplamı olarak tanımlarlar.

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad [III.7]$$

E^T = Elektronların hareketinden ortaya çıkan kinetik enerjiye ait terim

E^V = Çekirdek-elektron çekimlerine ve çekirdek çiftlerinin itmesine ait potansiyel enerjiyi tanımlayan terimleri içerir.

E^J = Elektron-elektron itmesine ait terim

E^{XC} = Geriye kalan diğer elektron-elektron etkileşimlerini kapsar. Kısaca değişim-korelasyon terimi olarak adlandırılır. E^{XC} terimi genellikle “değişim” ve “korelasyon” olarak iki kısma ayrılır. Bu fonksiyonlara “density functionals” yoğunluk fonksiyonelleri denir.

$$E_{DFT} = \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} H_{\mu\nu} + \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} P_{\lambda\sigma} J_{\mu\nu\lambda\sigma} + E_x(\rho) + E_c(\rho) + V \quad [III.8]$$

$E_x(\rho)$: Değişim terimi “Exchange term”

$E_c(\rho)$: Korelasyon terimi “Correlation term”

$$E^{XC}(\rho) = E^X(\rho) + E^C(\rho) \quad [III.9]$$

III.9 denklemindeki her terim yine birer fonksiyoneldir. $E^X(\rho)$ değişim fonksiyoneli, $E^C(\rho)$ ise korelasyon fonksiyonelidir. Bu fonksiyonellerin iki çeşidi vardır.

1. Lokal fonksiyoneller: Bunlar yalnızca elektron yoğunluğuna, ρ , bağlıdırlar.
2. Gradient-düzeltilmiş fonksiyoneller: Bunlar hem ρ , hem de onun gradientine, $\nabla\rho$, bağımlıdırlar. Non-lokal fonksiyoneller olarak da adlandırılırlar. Yukarıdaki gibi, bir değişim fonksiyoneli korelasyon fonksiyoneli ile çiftleştiren yaklaşımlar saf DFT yöntemleridir. Örneğin, çok yaygın bilinen BLYP fonksiyoneli, Becke’nin gradient-düzeltilmiş değişim fonksiyoneli, Lee, Yang ve Parr’ın gradient- düzeltilmiş korelasyon fonksiyoneli ile çiftleştirmiştir [48, 49].

Hibrit Fonksiyoneller

Son yıllarda Becke, Hartree-Fock ve DFT değişim terimlerinin karışımından yeni bir değişim terimi formüle edilmiştir.

$$E^{XC}_{Hibrit} = C_{HF} E^X_{HF} + C_{DFT} E^X_{DFT} \quad [III.10]$$

Bunlara hibrit fonksiyonelleri denilmektedir. Hibrit fonksiyonelleri, değişim fonksiyonellerini HF, lokal ve gradient-düzeltilmiş değişim terimlerinin lineer kombinasyonları olarak tanımlarlar. Bu yolla elde edilen değişim fonksiyoneli daha sonra lokal ve/veya gradient-düzeltilmiş korelasyon fonksiyoneli ile birleştirilir.

Hibrit fonksiyonellerinden en iyi sonuçlar veren ve yaygın olarak kullanılan Becke'nin üç parametrelili formülasyonlarıdır ki, kısaca B3LYP ve B3PW91 olarak bilinirler. Becke tarzı hibrit fonksiyonellerin saf DFT yöntemlerine göre üstün oldukları ve daha hassas sonuçlar verdikleri görülmüştür. B3LYP modelinde bir molekülün toplam elektronik enerji ifadesi;

$$E_{B3LYP} = E^T + E^V + E^J + E^{XC}_{B3LYP} \quad [III.11]$$

olarak elde edilir. Bu modeller incelendiğinde değiş-tokuş ve korelasyon enerjileri için ilgili ifadeler iyi sonuçlar vermesine rağmen sonuçlar tam değildir. Bu enerjiler ile ilgili olarak DFT modelinde atomik ve moleküler sistemler için daha iyi sonuç verecek fonksiyon çalışmaları literatürde yoğun olarak devam etmektedir [43, 48, 50].

III.1.2.4. Ab Initio Moleküler Orbital Teorisi

Ab initio moleküler orbital teorisi kuantum prensiplerinin direkt olarak uygulandığı hesapsal bir yöntemdir. Bununla birlikte hesaplamalarda bazı yaklaşımlar kullanarak işlemler basitleştirilmiştir. Yine de diğer moleküler orbital yöntemler ile kıyaslandığında Moleküler Orbital Teorisi prensiplerinin tamamına yakınının uygulandığı, çok hassas hesapların yapıldığı bir yöntemdir. Fakat hesaplama zamanı olarak pahalı bir yöntemdir, çok büyük moleküllere uygulanması zordur. Moleküldeki tanecik sayısı arttıkça hesaplamalar güçleşmektedir. Bu teori hesaplama yöntemleri bakımından farklı seviyelere sahiptir. Seviyeler arttıkça hesaplamalar daha hassas yapılır ve daha güvenli hale gelir. Büyük moleküllerde ise sadece düşük seviyeli yöntemler kullanılabilir. Bilgisayar alanındaki ilerlemelere paralel olarak bu yöntemin uygulanabilirliği artmaktadır.

Ab initio hesapları yapabilen bilgisayar programları HF_SCF teorisini kullanarak Schrödinger denklemini çözerler.

III.1.4. Temel Kümeler (Basis Set) [43, 51]

Temel küme ifadesi atomik orbitallerin matematiksel tanımıdır. Bir molekül aynı veya ayrı cins atomların bir araya gelmesi ile oluşur. Bu oluşan molekül orbitallerinde farklı cins atomlar moleküler yapıda benzer özellikler gösterir. Bu nedenle moleküler orbitaller atomik orbitallerin lineer toplamı olarak yazılabilir

1951 yılında Roothan HF orbitallerinin, bilinen bazı fonksiyon kümelerinin lineer kombinasyonları şeklinde yazılabileceğini önerdi. Örneğin Li için HF 1s ve 2s orbitalleri şöyle yazılabilir.

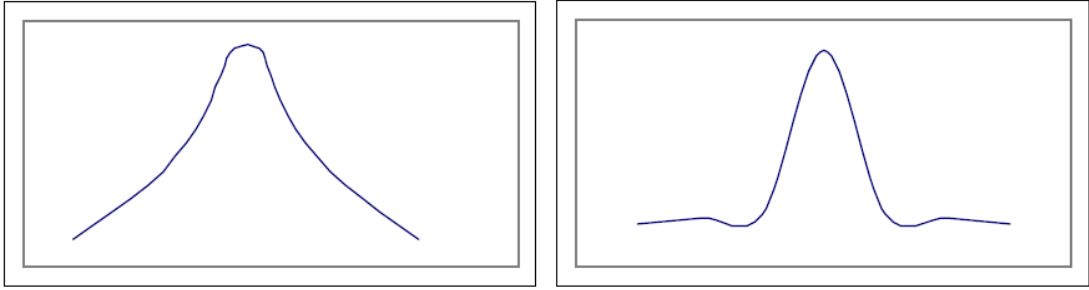
$$f = \sum_i a_i . x_i \quad g = \sum_i b_i . x_i \quad [\text{III.12}]$$

a_i ve b_i katsayılarıdır ve X_i fonksiyon kümeleridir.

Bu fonksiyon kümelerine temel fonksiyonlar “basis functions” veya temel kümeler “basis sets” denir. 2 fonksiyon çeşidi vardır.

1- Slater tipi

2- Gaussian tipi



$$\text{GTF} = \text{polinom} . e^{-ar^2}$$

$$\text{STO} = \text{polinom} . e^{-\zeta r}$$

Şekil III.1 Gaussian Tipi Fonksiyon (GTF) ve Slater Tipi Orbital (STO)

GTF ile integraller daha hızlı hesaplanabildiği için bu tip fonksiyonlar daha popüler olarak kullanılmaktadır.

Molekül hesaplamalarında bu atomik orbital (AO) temel kümeleri optimize edilmelidirler. Bu elektronik enerjinin varyasyon yöntemine göre minimize edilmesi ile sağlanır. Moleküler orbitaller (MO) bu AO'lerin yani temel fonksiyonların lineer kombinasyonlarından elde edilir. Basit HF modelinde, her atom üzerindeki basis fonksiyonları mümkün olan en az sayıda, ama var olan bütün elektronları bulundurabilecek ve küresel simetriyi de sağlayabilecek kadardır. Yani MO'lerin esnekliği minimum seviyededir. Eğer daha büyük temel kümeler kullanılırsa varyasyonla enerji minimizasyonu esnasındaki bulunacak uygun katsayıların sayısı

artacağından moleküler orbitaller daha iyi tarif edilebilecektir. Böylece temel kümeler genişletilerek moleküle daha çok esneklik kazandırılabilir ve daha doğru sonuçlar elde edilebilir [44].

Dört seviye temel küme vardır:

- 1- “Minimal Basis Set” (STO-nG) : STO-3G, STO-4G gibi.
- 2- “Split-Valence Basis Set” : 4-21G, 6-31G gibi.
- 3- “Polarization Basis Set” : 6-31G*, 6-31G** gibi.
- 4- Difüzyon Fonksiyonları : 6-31+G*, 6-31+G** gibi.

III.1.4.1. Minimal Basis Set (STO-nG)

En basit temel küme çeşididir. Slater ve gaussian karışımıdır. Aşağıdaki şekilde sembolleştirilir:

STO-nG

STO: Slater tipi orbitali,

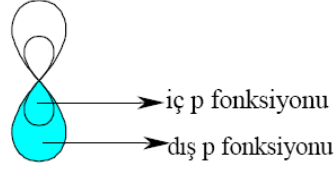
n: Kaç tane gaussian fonksiyonu olduğunu, G: gaussianı sembolize eder.

En çok kullanılanı STO-3G olmuştur. Slater tipi orbitallerin her birinin üç Gaussian tipi orbitalden oluştuğunu gösterir. Buna “minimal basis set” denir. Çünkü elektronların hepsini bulundurabilecek, küresel simetriyi de sağlayabilecek minimum sayıda orbital kullanır. Elektron bulundurma bile p orbitallerinin hepsi dahil edilir, çünkü bu küresel simetriyi sağlamak için gereklidir.

III.1.4.2. Bölünmüş Valans Temel Kümesi (Split-Valence Basis Set)

Başlangıçta uzun süre STO-3G standart temel küme olarak kullanılmasına rağmen şimdi onun yerine bölünmüş valans temel kümesi kullanılmaktadır. Minimal temel küme çeşitlerinin en önemli eksiği, çevresel koşullara uydurabilmek için, molekülün orbitallerini kolayca genişletebilme ve daraltabilme esnekliğinin olmayışıdır. Örneğin H₂O molekülünün bağ yapmamış elektron çiftlerine ait orbitali OH bağı yapmış orbitalden daha geniş olmalıdır. Halbu ki minimal temel küme hesaplarında her iki çeşit MO için de aynı atomik orbitaller kullanılır. Bu eksikliği gidermek için bölünmüş valans temel kümesi tercih edilir. Bu yöntemde atomik orbitaller aşağıda gösterildiği gibi iç ve dış kısım olmak üzere ikiye bölünürler. İç

kısım sıkıştırılmış, dış kısım ise daha gevşektir (Şekil III.2). Böylece moleküler orbitali oluşturan atomik orbitallerin büyüklüğü bu limitler arasında değiştirilerek moleküle esneklik kazandırılır. “Split-valence basis set” yalnızca valans orbitallerini bu şekilde böler. “Double zeta basis set” ise iç kabuktaki orbitalleri de böler.

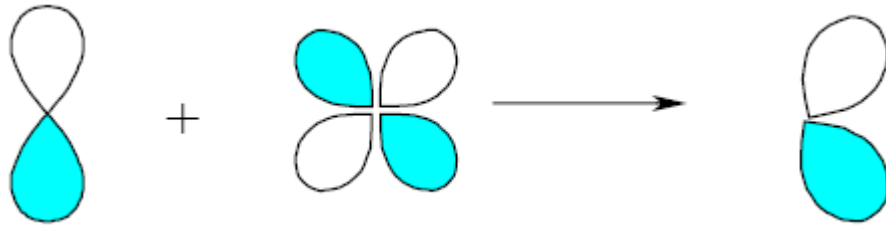


Şekil III.2 Double Zeta Basis Set

Bu temel kümenin de birçok seviyesi vardır. Başlangıçta en çok kullanılanı 4-31 G idi. Yani iç yörüngedeki orbitaller 4 Gaussian fonksiyonundan, valans yörüngesindekilerin ise iç p-fonksiyonu 3, dış p-fonksiyonu ise 1 Gaussian fonksiyonundan oluşmuş demektir. Sonraları 3-21G temel kümesi daha çok tercih edilir oldu. Özellikle başlangıç geometrisi bulunurken STO-3G nin yerine 3-21G kullanılmaya başlandı. Aynı zamanda daha ileri seviyeli hesapları yapmadan önce iyi bir başlangıç noktası bulmak için de kullanılır.

III.1.4.3. Polarizasyon Fonksiyonları

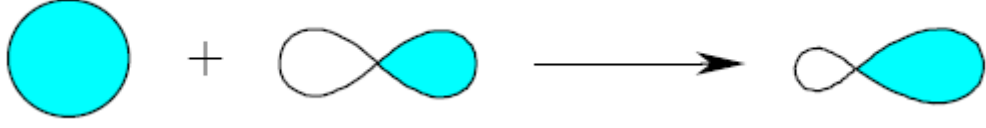
Temel kümeyi daha da geliştirmek için hidrojen hariç bütün atomlara d ve f orbitalleri eklenir ve p orbitalleri ile karıştırılır. Sonunda bir polarizasyon oluşur ve aşağıdaki gibi yeni meydana gelen orbital başka bir yöne doğru bakar (Şekil III.3).



Şekil III. 3 Polarizasyon Fonksiyonu

En çok kullanılan polarizasyon temel kümesi 6-31G*’dir. 6 tane d fonksiyonundan oluşur. 6-31G**’de ise 6-31G*’e göre elde edilmiş her hidrojene p fonksiyonları eklenir. Aşağıda Şekil III.4’te görüldüğü gibi bu p fonksiyonları

hidrojenin s orbitali için, d fonksiyonlarının p'lere eklenmesiyle doğan esnekliğin benzerini sağlar.



Şekil III. 4 Hidrojen İçin Polarizasyon Fonksiyonu

III.1.4.4. Difüzyon Fonksiyonları

Bunlar geniş s ve p tipi fonksiyonlardır. Boş elektron çiftleri bulunduran, özellikle anyonlar ve uyarılmış sistemlerin daha iyi tarif edilebilmesi için kullanılır. Bir temel kümeye difüzyon fonksiyonları eklenmişse aşağıdaki gibi + işareti ile gösterilir.

6-31+G: 6-31G'ye difüzyon fonksiyonu eklenmiş demektir.

III.1.5. Semi-Empirik(Yarı Deneysel) Yöntemler [43, 52]

Yarı deneysel yöntemler PMO (Perturbation of Molekular Orbital) teorisi ve Hückel teorisini temel alan yöntemlerdir. Schrödinger denklemini çözerken çok fazla yaklaşım kullanır. Schrödinger denkleminde hesaplanması güç denklemleri çözerken bazılarını ihmal eder, bazılarını da yaklaşımlar uygulayarak çözer. İçteki orbitallere ait integrallerin yerine parametreler kullanır. Bu parametrelerin belirlenmesinde atomik spektra, iyonlaşma enerjileri gibi deneysel bilgilerden yararlanır. İlk geliştirilen yarı deneysel yöntemler CNDO, INDO, ve NDDO'dur. Bu yöntemler molekül geometrilerini doğru hesaplayabilmiş ama bağlanma enerjilerini yeterince iyi hesaplayamamışlardır. Bu yöntemler daha sonra modifiye edilerek daha iyi yöntemler geliştirilmiştir. Daha sonra geliştirilen yöntemler MINDO, MNDO, AM1(Austin Method 1) ve PM3 (Parametric Method 3) tür. MINDO 1969 yılında Dewar ve grubu tarafından bağlanma enerjilerini hassas hesaplayabilmek için geliştirilen bir yöntemdir. Hesaplanan oluşma ısısını deneysel verilere uyduracak şekilde parametreler kullandılar. Oluşum ısılarının hesaplamaları yeterince iyiydi ancak molekül geometrileri yeterince hassas hesaplanamıyordu. Bunlardan PM3 hidrojen bağı içeren sistemlerin tarifinde ve temel durum yapı tespitinde MNDO ve AM1'dan daha başarılıdır. Ancak parametrizasyonlarının iyi yapılmadığı sistemlerde

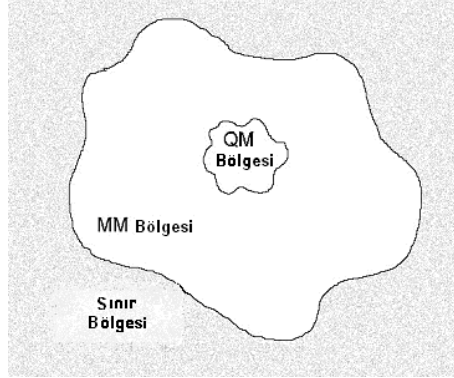
her üç yöntem de başarısızdır. En son 2007 yılında geliştirilen yarı deneysel yöntem PM6 (Parametric Method 6) metodudur [53, 54]. PM3 ve AM1'daki hataların büyük bölümü PM6 yöntemi ile giderilmiştir. 1985 yılında geliştirilen AM1 yöntemi için yaklaşık 200, 1989 yılında geliştirilen PM3 yöntemi için yaklaşık 500 deneysel parametre ile optimizasyonlar yapılırken PM6 yöntemi için ise 9000'den fazla deneysel ve DFT yöntemi ile tayin edilmiş parametere yöntemde dahil edilmiştir. Bunun sonucu olarak H köprü bağlarının tespit edilmesi, oluşum ısılarının ve keto-enol tautomerlerindeki serbest enerji değişimlerinin çok daha hassas hesaplanması, daha doğru geometrilerin bulunması ve bu çalışma için oldukça önemli olan çok sayıda atom içeren kuantum kimyasal yollarla modellenmesi imkansız olan protein yapıları modelleyebilmektedir.

Hızlı olması, iyi parametrize edildiğinde doğru sonuçlar vermesi hesapsal çalışmaların yapılmaya başlandığı dönemlerde çok tercih edilmesini ve kabul görmesini sağlamıştır. Ancak, bağısız etkileşimler gibi parametrize edilmesi zor olan etkileşimleri tespit etmekte yetersiz olmaları güvenilirliklerini azaltmıştır. Günümüzde ileri hesaplamalardan önce başlangıç geometrilerinin tespitinde, bilgisayar olanaklarının sınırlı olduğu ve çok sayıda atom içeren sistemlerde kullanımı hala yaygındır. Bu tez çalışmasındaki enzim aktif bölge ve model molekül optimizasyonlarında yarı deneysel yöntemler kullanılmıştır.

III. 1. 6. Hibrit Yöntemler (QM/MM)

Hesapsal çalışmalarda gerçek sistemin çok büyük olduğu durumlarda bilgisayar zamanından tasarruf edebilmek için yapılabilecek ilk şey sistemi en iyi tanımlayan model sistemi kullanmaktır. Ancak, model sistem kullanılması ile bu kısım haricindeki sistemin geri kalanının incelenen özelliğe etkisi tamamen ihmal edilmiş olur. QM/MM yöntemi özellikle enzimler gibi çok sayıda atomun sistem için önemli olduğu durumlarda kullanışlıdır. Bu yöntem ile iki temel yöntemin avantajları birleştirilmiş olur. Moleküler mekanik çok büyük molekülleri hızlı bir şekilde modelleyebilir, kuantum mekaniği ise birçok elektronik özelliği ve model kimyasal reaksiyonları modelleyebilir. Bu iki metot çok büyük sistemlerde aynı hesaplamada birleştirebilir. Molekülün büyük bir kısmı moleküler mekanikle, küçük bir kısmı ise kuantum mekanikle hesaplanır. Böylece çok büyük sistemler kısa zamanda modellenenebilir. Kuantum mekanik yöntemin kullanıldığı bölge genelde reaksiyonun meydana geldiği veya molekülün elektronik özelliklerini en fazla etkileyen bölgedir.

Geri kalan kısım ise molekülün reaksiyona girmeyen çevre kısmı veya çözücü fazı olabilir [55] (Şekil III. 5).



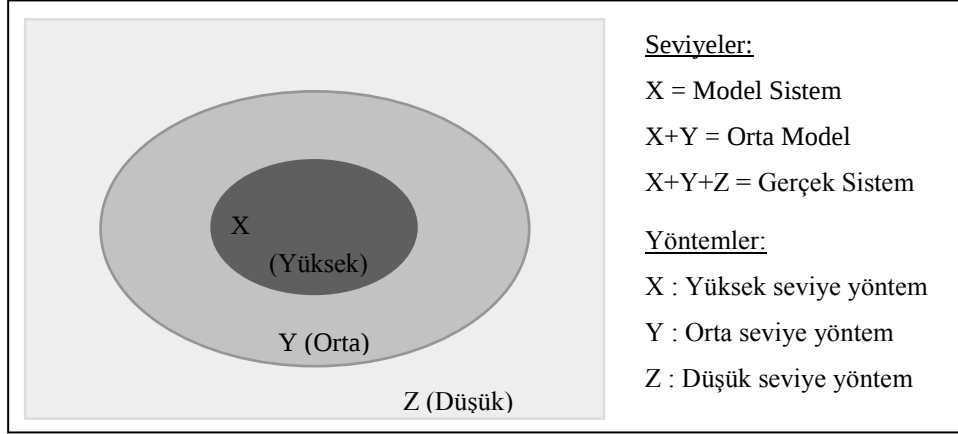
Şekil III. 5 Büyük Moleküllerde QM/MM Seviyelerinin Ayrımı

Morokuma ve ekibi ONIOM yöntemini geliştirerek bu tekniği bir çok farklı ihtiyacı da karşılayabilir bir hale getirmişlerdir.

III.1.6.1. ONIOM

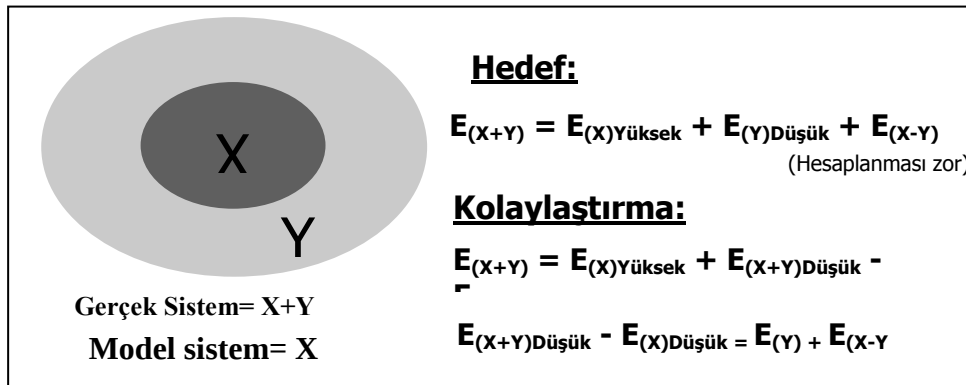
ONIOM yöntemi oldukça fazla sayıda atomun bulunduğu sistemler için veya az sayıda atom bulunduran sistemleri ileri yöntemlerle incelemek [17, 56] için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan sistem önem derecesine göre Şekil III.6'de görüldüğü gibi iki veya daha fazla kısma ayrılabilir.

Bu kısımların her birine Kuantum Mekanik yöntemler uygulanabileceği gibi ($MO + MO = IMOMO$) en önemli kısımlara Kuantum Mekanik diğer kısımlara ise Moleküler Mekanik yöntemler uygulanabilir ($MO + MM = IMOMM$). Morokuma ve ekibinin bu iki sistemi birden kullandığı yöntem ONIOM (Our Own N-layered Integrated MO and MM metod) adını almıştır. Seviyeler arası bağlantı link atom tekniğini ile sağlanır.



Şekil III. 6 ONIOM Seviyelerinin Tanımlanması

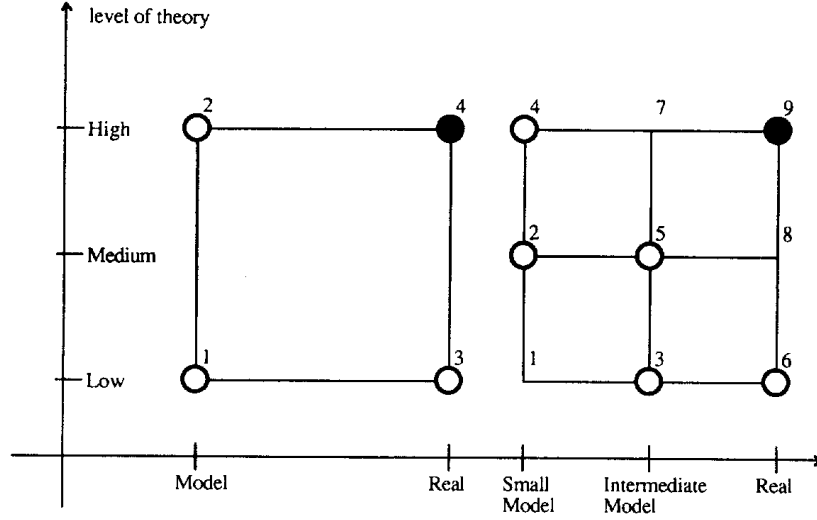
ONIOM çalışma sistemini daha kolay anlayabilmek için önem derecesine göre iki kısma ayrılmış Şekil III.7. sistemi kullanılabilir. Burada X seviyesi sistemin en önemli yani enerjisini en çok etkileyen kısımdır. ONIOM'un temel amacı bu en önemli kısmı en iyi şekilde incelemektir. Y kısmı ise sistme kısmen elektronik kısmen sterik katkı sağlayan ikincil öncelikteki kısmı temsil etmektedir. Burada şekildeki gibi X kısmı içeride, Y kısmı ise onu çevreleyecek şekilde dışarıda olmak zorunda değildir. Sistem sadece önem derecesine göre kısımlara ayrılır.



Şekil III. 7 ONIOM'la Enerji Hesabı

Şekil III. 7'de görüldüğü gibi sistemin enerjisi, X kısmının enerjisi, Y kısmının enerjisi ve iki kısmın etkileşim enerjisi olarak tanımlanabilir. Ancak etkileşim enerjisini yalnız başına hesaplamak mümkün değildir. Bunun için bir yaklaşım kullanılır. Bu yaklaşıma göre; ilk olarak tüm sistemin enerjisi düşük seviye yöntemle hesaplanır. Bu enerjiden model sistemin düşük seviye yöntemle hesaplanan enerjisi

çıkarılır ve farka model sistemin yüksek seviye yöntemle elde edilmiş enerjisi eklenir. Sonuçta seviyeler arası etkileşim düşük seviye yöntemle de olsa hesaplanabilmiş olur. Bu işlem üç seviyeye ayrılmış sistemler içinde benzer şekilde (Şekil III. 8) uygulanabilir.



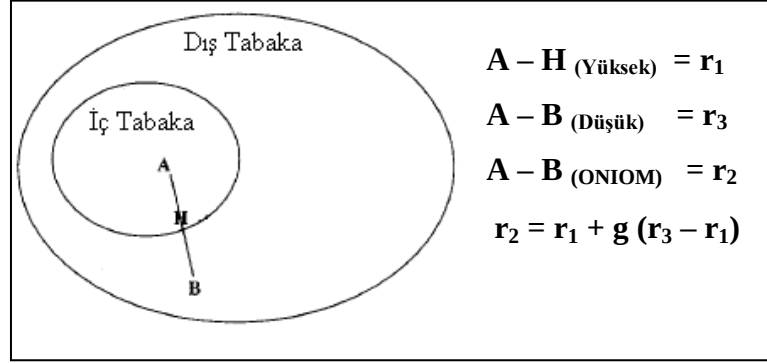
İki seviyeli sistemler için: $E_{\text{ONIOM}} = E_4 = (E_3 - E_1) + E_2$

Üç seviyeli sistemler için: $E_{\text{ONIOM}} = E_9 = \{(E_6 - E_3) + E_5\} + \{(E_5 - E_2)\} + E_4$

Şekil III. 8 ONIOM Yöntemi ile İki ve Üç Tabakalı Sistemlerde Enerji Hesabı

Eğer sistemler arası etkileşim kovalent bağ şeklinde ise model sistemin yüksek seviye ve düşük seviye yöntemlerle enerjisinin hesaplanması sırasında bağlantı kısımları problemi ortaya çıkacaktır. Bu probleme farklı QM/MM yöntemlerinde farklı çözümler getirilmiştir. ONIOM'da bu problem link atom tekniği ile aşılmıştır [17]. Bu teknikte model sistemin dış seviye ile bağlantısında dış seviyede kalan atom yerine hidrojen atomu koyularak hesaplamalar yapılır. Ayrıca, sistemin dış kısmında kuvvetli elektron çekici grupların bulunması halinde isteğe bağlı olarak elektron çekme etkisini karşılayacak halojen gibi herhangi bir element hidrojen yerine kullanılabilir. Bunun yanında seviye ayrımı ikili bağdan yapılmışsa yine isteğe bağlı olarak oksijen veya kükürt gibi ikili bağ yapabilen atomlar da kullanılabilir. Seviyeler arası bağlantı kovalent olmak zorunda da değildir. Yani birbirine bağlı olmayan yapılarda hesaplamalarda kullanılabilir. Bu durumlarda atomların etkileşim yarıçapları dikkate alınır.

Link atom olarak hidrojenin kullanıldığı durumda bağ uzunlukları şekil III.6’da görüldüğü gibi hesaplanmaktadır.



Şekil III. 9 Link Atom Tekniği ile Tabakalar Arası Bağlantı Mesafesinin Hesaplanması

Gerçek sistemde bulunan A–B bağı model sistemde A–H bağı olarak hesaplanmaktadır. Bu mesafeye “ r_1 ”, düşük seviye yöntemle hesaplanmış A–B bağı uzunluğu “ r_3 ”, ONIOM yöntemine göre hesaplanmış A–B bağı uzunluğuna ise “ r_2 ” denebilir. Bu uzunluk Şekil III.9’da görülen formül ile elde edilir. Ayrıca bağı diğer atomlarla yaptığı açılar düşük seviye yöntemle hesaplanan gerçek sisteminki ile yaklaşık aynı hizaya getirilir. Görüldüğü gibi link atomun bağ uzunluğunun doğru hesaplanmasında seviyelerin hangi yöntemlerle hesaplandığı önemlidir.

Formülde kullanılan “ g ” faktörü bağı hangi atomlar arasında olduğuna bağlı olarak parametrize edilmiştir. Ancak istenildiği takdirde parametreler değiştirilebilir[17].

III.1.6.2. Docking (Kenetlenme) Yöntemi

Docking kısaca üç boyutlu ligand ve protein yapılarının birbirleri ile kenetlenme sürecinin adıdır. 1990 yılında Arthur J. Olson’un laboratuvarında David S. Goodsell tarafından AutoDock programı ilaç adayı küçük ligandların proteinlerin hedef bölgelerine kenetlenmelerini moleküler mekanik yöntemlere göre tasarlamak üzere yazılmıştır [57]. Dockingin en sık kullanım alanı ligand molekülünün kenetleneceği proteine olan ilgisini ve aktivitesini tahmin ederek ilaç adayı olabilecek küçük moleküllerin bağlanma oryantasyonlarını tespit edebilmektir. Bu sebeple ilaç

dizaynlarında farmolojik ve biyolojik veriler sunması sebebiyle önemli rol oynamaktadır[58, 59]

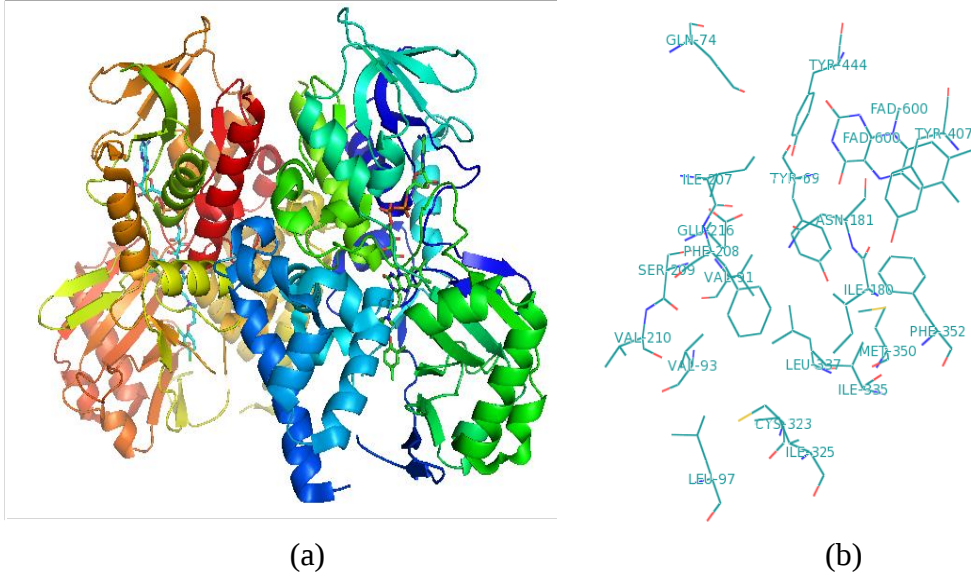
Küçük ligand moleküllerinin büyük enzim yapılarının içinde bir kompleks oluşturacak şekilde tutunması kompleks ve güç bir iştir. Bu uygulama için CDOCKER, LibDock ve LigandFit gibi farklı algoritmaları içeren birçok yardımcı protokol geliştirilmiştir. Docking işleminde enzim ve ligandın etkileşimi anahtar-kilit prensibine dayanır. Enzim ve ligand farklı şekillerde etkileşime sokulabilir. Örneğin en basit yol olan enzim ve ligandın her ikisinin konformasyonlarını sabitleyerek docking işlemini yapabilirken aynı zamanda enzim ve ligandın her ikisinin de konformasyonunu esnek yaparak ta docking işlemini yapılabilir. Buradaki seçim ligandın ve enzimin katılacak esneklik sonucu konformasyonel değişime uğrayacak olan bağlarının sayısıdır. Bunun sonucu olarak çok fazla miktarda CPU zamanı harcanarak daha fazla sayıda veri üretilir. Docking için en yaygın uygulam şekli ise protein yapısının konformasyonunun sabit tutulduğu, ligandın ise konformasyon dizisi ile ayrı ayrı protein içine docking edilmesi ile bir sonuç elde etmeye dayanır[60-62].

III.2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

III. 2. 1. Doğal Enzim Optimizasyonları

III.2.1.1. Aktif Bölgenin Seçilmesi

MAO A enziminin (H atomları dahil yaklaşık 14000 atom) pdb dosyasındaki (başlangıç çalışmalarında 2BXR, 3Å çözünürlüklü) aktif bölgesini oluşturan aminoasitler literatürde belirtildiği şekilde seçildi. Enzimin aktif bölgesi Tyr69, Gln74, Val91, Val93, Leu97, Ile180, Asn181, Ile207, Phe208, Ser209, Val210, Glu216, Cys323, Ile325, Ile335, Leu337, Met350, Phe352, Tyr407 ve Tyr444 amino asitlerinden (H atomları dahil 353 atom) oluşmaktadır [3]. Aktif bölge yapısı elde edilirken aktif bölge aminoasitlerinin dışındaki tüm aminoasitler ve inhibitör molekül olan klorgilin pdb dosyasından silindi (Şekil III. 10). Elde edilen aktif bölge yapısı flavin yapısından yaklaşık 10Å uzaklığa kadar olan amino asitlerdir.

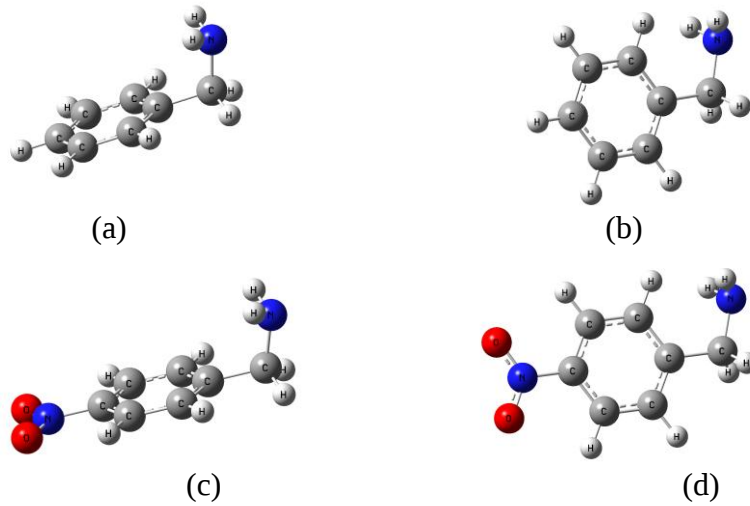


Şekil III. 10 (a) MAO A Enzimi (b) MAO A Enziminin Hesaplamalarda Kullanılan Aktif Bölgesi

Özellikle başlangıç çalışmalarımızdaki pdb yapısının çözünürlüğünün düşük ve inhibitörün flavine bağlı olması flavinin oksidasyon basamağının düzenlenmesini gerektirmiştir. Aktif bölge yapısı elde edildikten sonra flavin geometrik parametreleri değiştirilerek okside haline getirildi ve çalışmalarımız okside flavin ile yapıldı.

III. 2.1. 2. Çalışılan Substratlar:

Doğal enzim için yapılan optimizasyonlarda substrat olarak benzilamin ve p-NO₂ benzilamin kullanıldı (Şekil III. 11).



Şekil III. 11 Benzilaminin (a) Dik (b) Planar Konformasyonları; p-NO₂ Benzilaminin (c) Dik (d) Planar Konformasyonları

Sözkonusu substratlar Şekil III. 10. b’de gösterilen aktif bölgede flavinin *re*-yüzüne sırasıyla dik ve planar olmak üzere iki farklı konformasyonda belirli noktalara yerleştirildi. Benzilamin her iki reaksiyon yolu için, p-NO₂ benzilamin ise sadece α C-flavin N(5) arasındaki reaksiyon yolu için substrat olarak kullanıldı.

III.2.1.3. Optimizasyonlarda Enzim Koordinatlarının Dondurulması

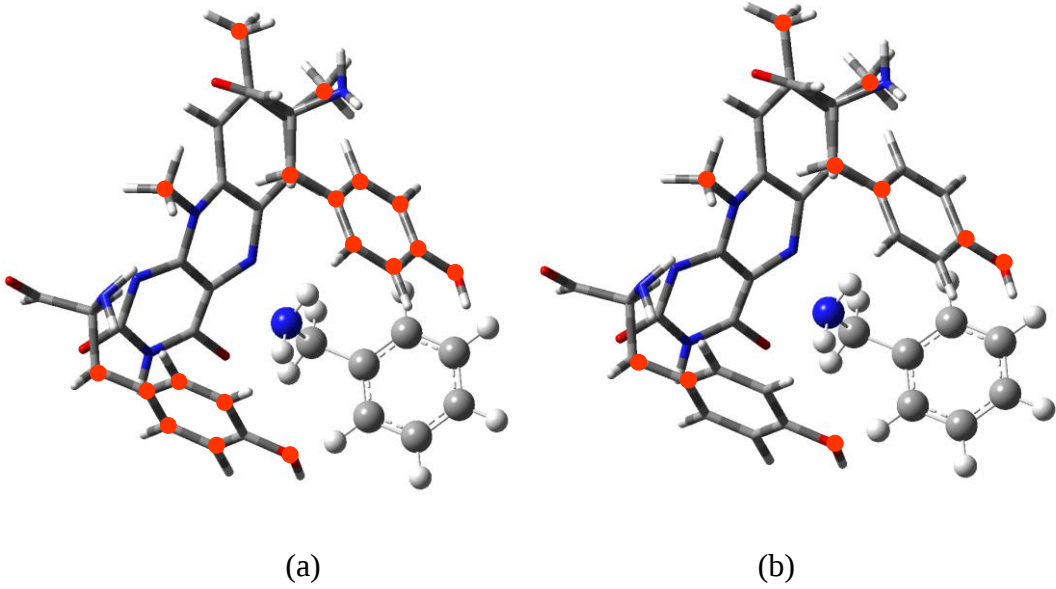
Çalışmalarımızda aktif bölge ve model yapılar temel alınmıştır. Bu nedenle enzimin aktif bölgesi dışında kalan kısım temizlendiğinden aktif bölgeyi oluşturan aminoasitlerin x-ışını koordinatlarının bozulmasını engellemek için aminoasitlerin x-ışını geometrisinde sabitlenmesi gerekmiştir. Bunun için kullanılan hesapsal programda iki farklı teknik ile atomlar veya mesafeler sabitlenmektedir. Atomların yalnızca kartezyen koordinat sisteminin değişmemesini istediğimiz durumlarda (freeze) atom sabitleme işlemi Gaussview 03 [63] ve 09 [64] görüntüleme programında “Atom List Editor” menüsü kullanılır. Burada ONIOM seçeneklerinden “freeze” kolonunda sabitlenecek atoma ait “0” değeri “-1” olarak değiştirildi. Böylelikle program dondurulan atomun kartezyen koordinat sistemindeki yerini hesaplama yapmadan optimize kabul etti. Bu yöntem yalnızca ONIOM hesaplaması kullanıldığı durumlarda kullanılabilir.

Diğer bir genel sabitleme(constrain) yöntemi Redundant Coordinate Editor menüsüdür. Bu menüde bir atomun kartezyen koordinat sistemindeki yerini sabitlemek, iki atom arası bağı yada mesafeyi, iki atom arası dihedral açığı, üç atom arası açığı sabitlemek gibi farklı işlemler gerçekleştirilebilir. Bu yöntem kullanılırken opt=modredundant anahtar kelimesi kullanılmalıdır. Ancak bu yöntem Gaussian 98 ile birlikte kullanılamaz. Yalnızca Gaussview 03W ve 09W programı kullanılmadan sistem Gaussian 98 programına “Z-Matrix” şeklinde tanıtıldığında istenen atomlarla ilişkili değerlerin yanına optimize et anlamına gelen “1” değeri “-1” veya atomun koordinatları sabitlenmek istendiğinde “0” ile değiştirilerek yapılabilir.

Bu sabitleme tekniklerinin hepsinde de sabitlenmiş atom, mesafe ya da açı değerleri program tarafından optimize kabul edilir ve sistemin geri kalan kısmı bu değerlere göre optimize edilir.

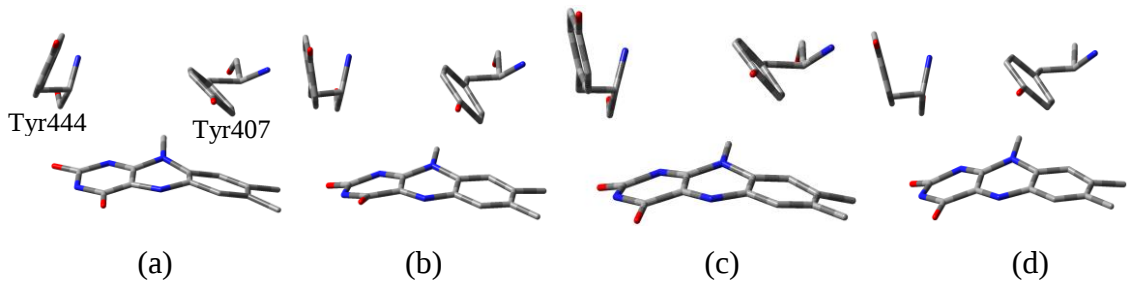
Optimizasyonlar yapılırken doğal enzim iki farklı şekilde donduruldu:

- a) Pdb yapısının bozulmaması için flavinin üç metil karbon atomunun ve aktif bölgeyi oluşturan aminoasitlerin ağır atomlarının tamamının koordinatları donduruldu (Şekil III. 12. a).
- b) Atomların ikinci dondurulma işleminde ise başlangıçta yapılan işlem ile aynı şekilde flavinin üç metil karbon atomunun ve aktif bölgeyi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 dışındaki diğer aminoasitlerin ağır atomlarının tamamının koordinatları donduruldu. İlk dondurma işleminde farklı olarak aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444'deki fenol halkalarının para karbon atomları ve zincir atomlarının koordinatları donduruldu (Şekil III. 12. b). Böylece, yapılan ikinci dondurma işlemi ile Tyr407 ve Tyr444 halkalarına konformasyonel serbestlik verildi. Bu serbestlik aromatik halkayı oluşturan tirosinlerin fenol halkalarının konformasyonunun substrat üzerindeki sterik etkisinin ve substratın flavine doğru hareketi sırasındaki konformasyonel değişiminin incelenmesine olanak verdi.



Şekil III. 12 Optimizasyonlarda Dondurulan Atomlar (Aktif bölgedeki diğer atomlar yapılan işlemin daha net anlaşılması için verilmemiştir) a) Flavın kısmen, aromatik kafes ve aktif bölgedeki atomlar tamamen dondurulmuş, b) Flavın kısmen, aromatik kafes para pozisyonlarından ve aktif bölgedeki atomlar tamamen dondurulmuş (Koordinatları dondurulan atomlar kırmızı nokta ile işaretlendi).

Aşağıda Şekil III.13'te aromatik kafesi oluşturan aminoasitlerin koordinatlarının dondurulmasında benzen halkasının konformasyonel serbestlik verildiğindeki durum görülmektedir. X ışını yapısındaki, substratsız optimizasyondaki, dik benzilamin ve planar benzilamin varlığındaki optimizasyonlardaki konformasyonel değişim görüntüleri Şekil III. 13'de, sayısal değerleri ise Tablo IV.1'de verilmiştir.



Şekil III. 13 Tirozinlerin Konformasyonel Serbestliğe Sahip Oldukları Durumlardaki Duruşları: (a) X-ışını yapısındaki, (b) Substratsız optimizasyondaki, (c) Dik benzilaminli optimizasyonda, (d) Planar benzilaminli optimizasyonda

Tablo III. 1 Tyr407 ve Tyr444'teki Konformasyonel Serbestliğin Etkisi

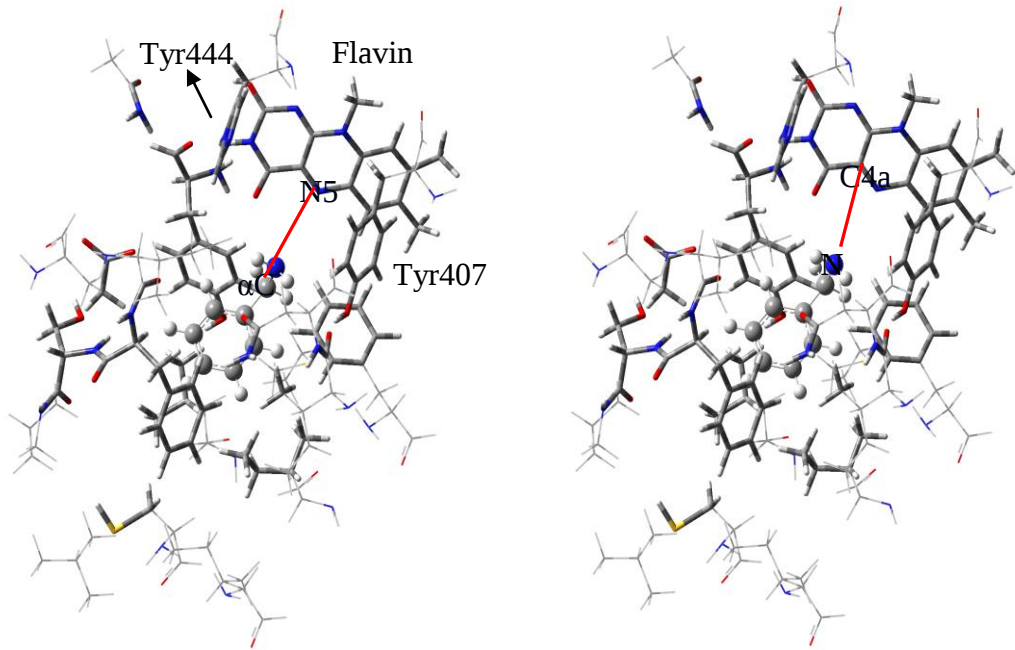
	Dönme Açıları		
	b	c	d
Tyr444	37°	44°	42°
Tyr407	2°	3°	4°

Tablo IV. 1'deki değerler incelendiğinde Tyr444 aminoasidindeki dönme açısı 37°-44°, Tyr407 aminoasidindeki ise 2°-4° arasında değişmektedir. Tyr444 aminoasidindeki dönme açısının belirgin bir şekilde fazla olması tirozinlere verilen konformasyonel serbestliğin Tyr444'ün konformasyonunda daha etkili olduğunu göstermektedir.

III.2.1.4. Doğal Enzim Optimizasyonlarındaki Reaksiyon Yolu

Doğal enzim optimizasyonlarında iki farklı reaksiyon yolu izlenmiştir: benzilamin α C-flavin N(5) ve benzilamin N-flavin C(4a) (Şekil III. 14). α C-flavin N(5) yolu için yapılan optimizasyonlar anlatımda Opt(1), benzilamin N-flavin C(4a)

optimizasyonlar Opt(2) olarak isimlendirilecektir. Opt(1) optimizasyonları benzilamin ve p-NO₂ benzilamin substratlarının dik ve planar konformasyonları için α C-flavin N(5) arasındaki 2.5-6Å'luk yolun 0.5Å'luk adımlarla sabitlenerek 9 farklı nokta için yapılmıştır. Benzilamin N-flavin C(4a) reaksiyon yolu için yapılan optimizasyonlar ise 1.6-6 Å'luk mesafe için belirli aralıklarla sabitlenerek 15 farklı nokta için yapılmıştır.

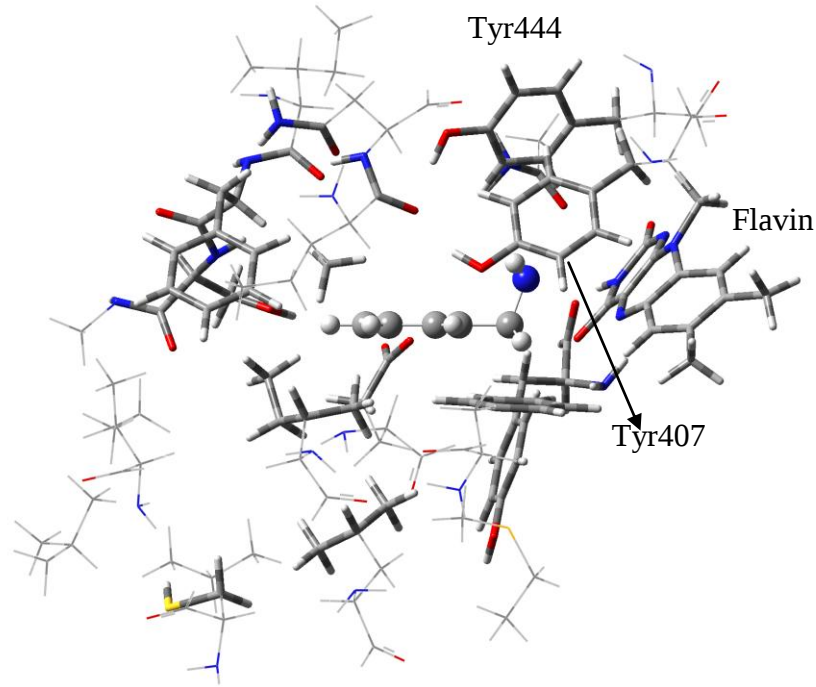


Şekil III. 14 Doğal Enzim Optimizasyonlarındaki Reaksiyon Yolu. a) Benzilamin α C-flavin N(5) b) Benzilamin N-flavin C(4a).

III.2.1.5. Çalışma Yönteminin Seçilmesi

Çok sayıda atom içeren, enzimler gibi büyük yapıların kuantum kimyasal yollarla modellenmesi bilgisayar zamanı açısından oldukça uzun ve güç bir süreçtir. Bu sebeple MAO A enziminin aktif bölgesinin tamamının kuantum kimyasal yollarla modellenmesi ONIOM yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem ile aktif bölgeyi oluşturan amino asitler ve substrat arasındaki olabilecek etkileşimleri gözetilerek yapı üç farklı seviyeye ayrıldı ONIOM(HF/6-31G*:PM3:UFF). Aktif bölgenin ONIOM yöntemi için seviyelendirilmesinde substrat yüksek seviye (HF yöntemi); flavin, aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444'ün fenol grupları ve benzilaminin flavine doğru hareketi boyunca etkileşebileceği Gln74, İle180, Asn181, İle207, Phe208, Ser209, Val210, Glu216, Cys323, İle335, Leu337 ve Phe352 kısmen orta seviye (PM3

yöntemi); bu aminoasitlerin orta seviye seçilen atomlarının geri kalanları ve aktif bölgeyi oluşturan diğer aminoasitlerin tamamı düşük seviye olarak seçildi (UFF yöntemi) (Şekil III. 15).



Şekil III.15 Aktif Bölgedeki ONIOM Seviyeleri (Top model: yüksek seviye, Kalın çubuk: orta seviye ve İnce çubuk: düşük seviyeleri temsil etmektedir.)

Mekanizma modellemelerinde ise aktif bölgeden indirgenerek elde edilen yapılara ONIOM, PM3, PM6, HF, DFT, MP2 gibi yöntemler çeşitli temel kümeler ile çalışılmıştır.

III.2.1.6. Optimize Yapıların Elde Edilmesi

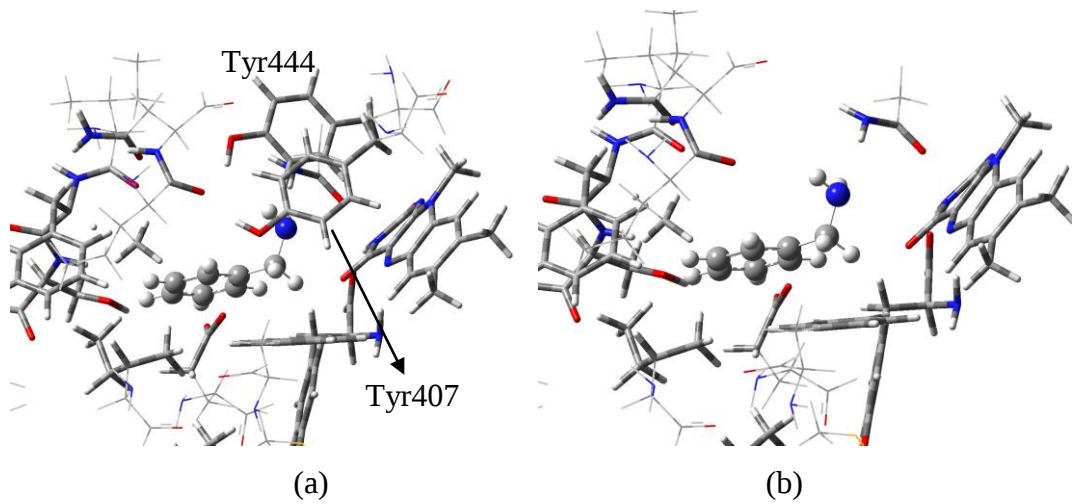
Aktif bölgesine indirgenmiş yapıya dondurma işlemi yapıp, substratı ilave edildikten ve ONIOM seviyelendirmeleri yapıldıktan sonra elde edilen input dosyaları Gaussian98, 03 ve son dönem çalışmalarımızda ise Gaussian09 paket programları ile tespit edilmiş olan yöntem ve temel küme ile çalıştırıldı. Her bir optimizasyon işlemi çalıştırılan bilgisayarın performansına bağlı olarak yaklaşık 3-4 gün sürerken, yüksek seviye çalışmalarımızda ise bu süre 22 güne kadar devam etti.

III.2.1.7. Aromatik Kafesin Öneminin Araştırılması

ONIOM yöntemi ile yapılan optimizasyonlardan elde edilen her bir optimize yapıya HF/6-31G* yöntemi ile enerji hesabı yaptırıldı. Böylece substratın flavine doğru hareketi boyunca olan enerji değişimi ve en kararlı olduğu aralık tespit edildi. Tek nokta enerji hesabı ile aynı zamanda optimize yapıdaki atomların herbirinin Mulliken yükleri de hesaplanmaktadır. Böylece substratın flavine doğru hareketinde aromatik amino asitlerin arasından geçerken amin azotunun elektron yoğunluğundaki değişim (nükleofilik karakteri) izlenebildi. Amin azotundaki söz konusu bir yük değişimi aromatik kafesi oluşturan aminoasitler ile benzilaminin amin azotu arasında bir etkileşimin olduğu anlamına gelmektedir. Bu etkileşimi, miktarını ve aromatik aminoasitlerin aktivitedeki önemini net olarak tespit etmek amacıyla aktif bölgeyi oluşturan amino asitlerden Tyr444 ve Tyr407 çıkartılarak bir referans yapı oluşturuldu (Şekil III. 16). Her bir optimizasyon için oluşturulan referans yapıya HF/6-31G* yöntemi ile tek nokta enerji hesabı yaptırılarak amin azotunun elektron yoğunluğundaki değişim izlendi. Oluşturulan referans yapı ve aşağıdaki eşitlik (III.11) yardımıyla aromatik kafesin enzim aktivitesindeki net etkisi tespit edildi (Şekil III.16).

$$\text{Net etki} = \text{Doğal enzimdeki N yükü} - \text{Referans yapıdaki N yükü} \quad [\text{III.11}]$$

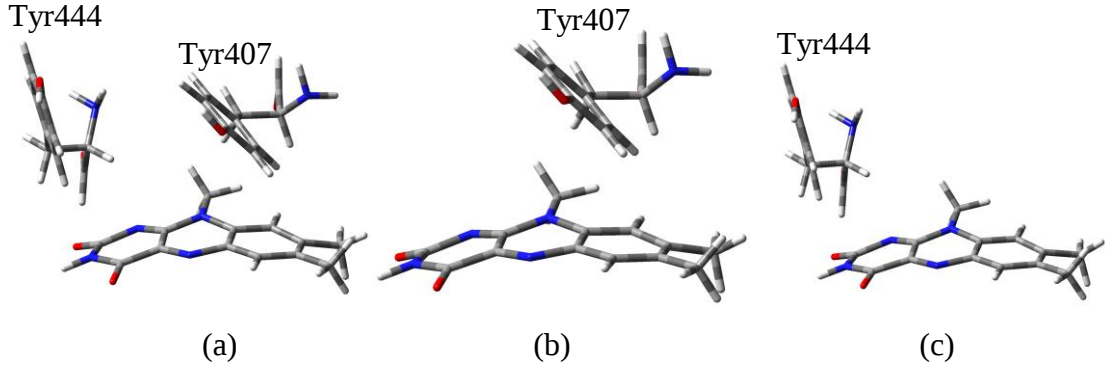
Referans yapı ve bu eşitlik ‘Aromatik kafesin varlığında ve yokluğundaki amin azotu yükündeki değişiklik aromatik kafesten kaynaklanmaktadır’ fikrine dayanmaktadır.



Şekil III. 16 (a) Doğal Enzimin Aktif Bölgesinin Bir Kesiti (b) Aromatik Kafesin N Yükü Üzerindeki Etkisini İncelemek İçin Hazırlanan Referans Yapı

III.2.1.8. Tyr407 Ve Tyr444 Aminoasitlerinin Aromatik Kafesteki Görevlerinin Karşılaştırılması

Aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerinin herbirinin substratın amin azotu üzerindeki etkisini ayrı ayrı incelemek için iki ayrı referans yapı oluşturuldu (Şekil III. 17).



Şekil III. 17 (a) Enzimin Aktif Bölgesi (b) Tyr407'nin Etkisini İncelemek İçin Hazırlanan Model (c) Tyr444'ün Etkisini İncelemek İçin Hazırlanan Model. (Aktif bölgede hesaplara dahil edilen diğer atomlar şekilde gösterilmemiştir.)

Tyr407'nin etkisini incelemek için hazırlanan modelde enzimin aktif bölgesinden sadece Tyr444 silindi ve herbir optimizasyon için oluşturulan referans yapıya HF/6-31G* yöntemi ile tek nokta enerji hesabı yaptırılarak amin N'unun elektron yoğunluğundaki değişim izlendi. Aynı işlem Tyr444'ün etkisini incelemek için yapıldığında aktif bölgeden Tyr407 silindi (Şekil III. 17).

$$\text{Tyr407'nin Net Etkisi} = \text{Doğal enzimdeki N yükü (a)} - \text{Tyr444'süz Referans yapıdaki N yükü(b)}$$

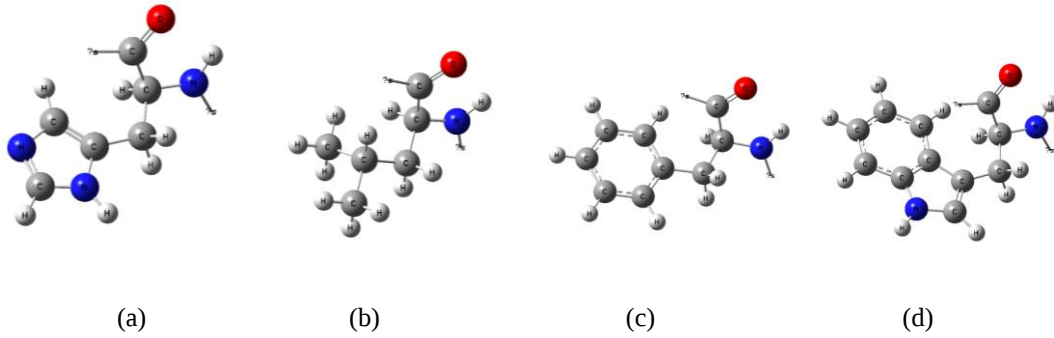
$$\text{Tyr444'nin Net Etkisi} = \text{Doğal enzimdeki N yükü (a)} - \text{Tyr407'siz Referans yapıdaki N yükü(c)}$$

[III.12]

III. 3. AROMATİK AMİNOASİTLERİN MUTASYON ÇALIŞMALARI

MAO A ve MAO B'nin yapılan son mutant çalışmaları gösteriyor ki flavinin ön yüzündeki aromatik kafesi oluşturan iki tirozin aminoasidi benzilamin substratının nükleofilik karakterini arttırarak kataliz için aktif duruma getirmesiyle fonksiyonel bir role sahiptirler. Bu bulgu, S. S Erdem ve grubu tarafından yapılan MAO B ve MAO B'nin Tyr435 mutantları için yapılan ONIOM çalışmalarını ve MAO için önerilen polar nükleofilik mekanizma ile olan ilişkisini desteklemektedir [15].

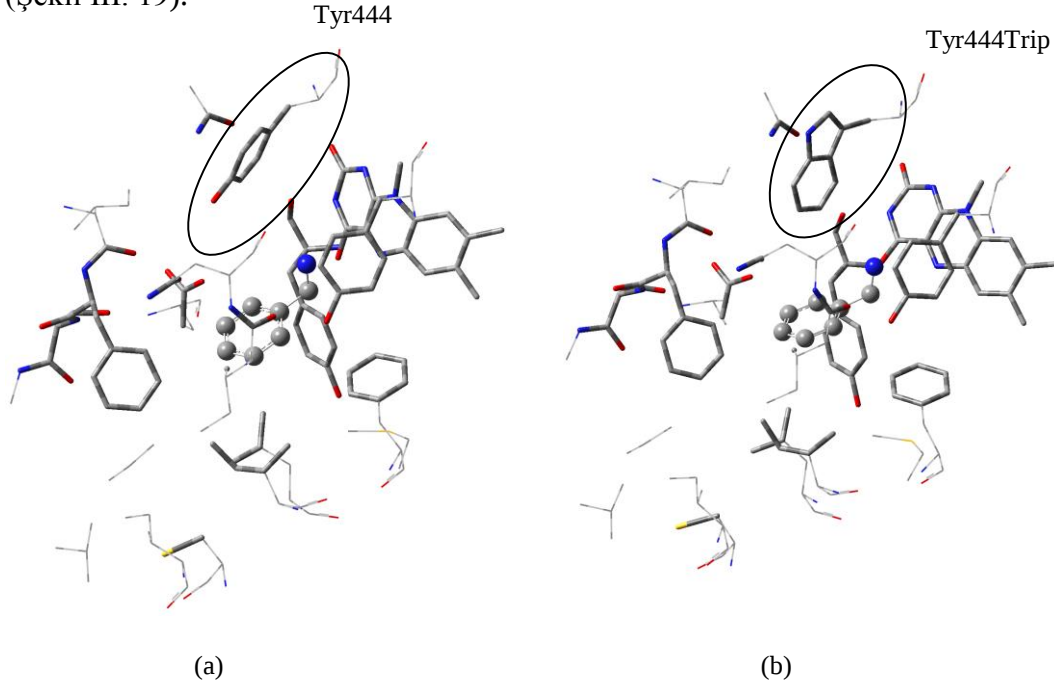
Bu tez çalışması kapsamında MAO A enziminin mutant çalışmaları aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 aminoasitleri için yapıldı. MAO A'nın Tyr444'ün mutasyon çalışmaları histidin, lösin, fenilalanin ve triptofan olmak üzere dört farklı aminoasit ile, Tyr407 mutant çalışmaları ise lösin ve fenilalanin olmak üzere iki farklı aminoasit ile yapıldı (Şekil III. 18). Tyr407 için özellikle lösin ve fenilalanin seçilmesinin sebebi ise lösinin düz zincirli izopropil yan grubu içermesine karşın fenilalaninin aromatik benzen halkası yan grubunu içermesidir. Böylelikle alifatik ve aromatik grup içeren aminoasitlerin benzilamin amin azotu üzerindeki etkisini net bir şekilde inceleme fırsatı bulundu.



Şekil III. 18 Mutant Aminoasitleri: (a) Histidin, (b) Lösin, (c) Fenilalanin, (d) Triptofan

Mutasyon çalışmalarında başlangıç yapısı olarak alınan yapı doğal enzim için hazırlanan x-ışını yapısının aktif bölgeye indirgenmiş halidir. Mutasyon çalışmaları da doğal enzim optimizasyon çalışmalarında olduğu gibi ONIOM yöntemi ile modellendi ve atom seviyelerinin seçilmesi doğal enzim optimizasyonlarındaki ile aynı şekilde yapıldı. Enzimin mutasyona uğratılması işlemi ise şu şekilde yapıldı: Tyr444 aminoasidinin mutant çalışmaları için Tyr444 aminoasidi silinip onun yerine

mutasyona uğratılacağı aminoasit yapısı getirilerek mutant enzim dosyaları elde edildi (Şekil III. 19).



Şekil III. 19 (a) Doğal Enzimin, (b) Triptofan Mutant Enziminin Aktif Bölgesi (H atomları şeklin daha iyi anlaşılabilmesi için gösterilmemiştir).

Mutant enzim optimizasyonlarında pdb yapısının bozulmaması amacıyla flavinin üç metil grubunun karbon atomlarının, aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444'ün benzen halkasının para pozisyonlarındaki karbon atomlarının ve aktif bölgeyi oluşturan diğer atomların tamamının koordinatları donduruldu. Optimizasyonlarda substrat olarak benzilaminin planar ve dik olmak üzere iki farklı konformasyonu kullanıldı ve enerji, yapısal ve elektronik özelliklerdeki değişimler aktif bölgede flavin ile benzilamin arasındaki reaksiyon yolu boyunca araştırıldı. Optimizasyonlar benzilamin α C'u ile flavin N(5) arasındaki 2.5Å - 6Å'luk mesafe belirli adımlarla sabit tutularak ONIOM(HF/6-31G*:PM3:UFF) yöntemi ile gerçekleştirildi. Mutant çalışmalarından elde edilen sonuçlarla Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerinin aromatik kafesteki önemi, mutasyona uğratıldığı amino asit türüne göre benzilaminin amin azotu üzerindeki yük değişimleri araştırıldı.

III. 4. AMİN OKSİTLEME MEKANİZMALARININ MODELLENMESİ

Reaksiyon mekanizmalarının hesapsal yöntemler ile çalışılmasında en sık rastlanılan zorluk geçiş konumlarının optimizasyonu ve doğru olarak karakterize edilebilmesidir. Farklı yollar ile geçiş konumlarının başlangıç geometrileri tayin edilebilir.

Frekans hesaplamaları termodinamik büyüklüklerin hesaplanmasında kullanılmasının yanısıra reaksiyon koordinatındaki durağan noktaların da tespit edilmesinde kullanılır. Geometri ve geçiş konumu optimizasyonu potansiyel enerji yüzeyinde sistemin üzerindeki kuvvetlerin sıfır olduğu bir yapıyı verir. Elde edilen son yapı potansiyel enerji yüzeyinde bir minimum noktaya karşılık gelebilir. Bununla birlikte diğer noktalara göre maksimum olan bir semer noktası da olabilir. Sadece bir noktada maksimum olan ve diğer tüm yönlerde minimum olan semer noktaları geçiş konumu yapılarıdır. Frekans hesaplamalarında geçiş konumu yapılarının output dosyalarından karakterizasyonu için

- Sanal frekansların sayısı,
 - Sanal frekanslara karşılık gelen normal mod
- olmak üzere iki farklı yol vardır.

Sanal frekanslar frekans output dosyalarındaki negatif sayılardır. N tane sanal frekansı olan bir yapının n tane semer noktası vardır. Bu yüzden bir geçiş konumu sadece bir tane sanal frekansa sahip olmalıdır. Bununla birlikte sadece bir tane sanal frekansı olan bir yapı da doğru geçiş konumu yapısı olmayabilir. Semer noktaları potansiyel enerji yüzeylerindeki iki noktayı birleştirmelidir. Fakat bu iki nokta modellenecek olan reaksiyonun giren ve ürünleri olmayabilir. Tek sanal frekans elde edilen optimize yapının bağlarında meydana gelen gerilmelerin ürünlere veya ürünlere karşılık gelip gelmediği incelenmelidir. Bağ gerilmeleri animasyonları incelenmeli ve hareketlerin istenilen yönde olup olmadığı tayin edilelidir. Bunun için diğer bir yol ise IRC(Intrinsic Reaction Coordinate) adı verilen bir hesaplama yapmaktır. IRC hesaplamaları geçiş konumundan başlayıp ileri ve geri yönde reaksiyon koordinatı üzerindeki yapıların enerjilerini hesaplamaktadır. Elde edilen yapılar ilgilenilen reaksiyonun giren ve ürün yapıları ise doğru geçiş konumunun optimizasyonu yapılmış demektir. IRC hesaplamalarında elde edilen reaksiyon koordinatı reaktant ve ürünleri birleştiren en düşük enerjili yol olarak kabul edilir.

Bu tez kapsamındaki mekanizma çalışmalarında ilgili mekanizma için girenler, geçiş konumları, ara ürünler ve ürünler optimize optimize edildi. Geçiş konumlarının doğru tayin edilemesinde bir tek sanal frekansın olmasına dikkat edildi. İlgili giren ve ürünlerin arasındaki doğru semer noktası tayini için IRC hesaplamaları da yapıldı. Yerel minimum noktaları olan girenler, ara ürünler ve ürünlerinin tüm frekanslarının ise pozitif olduğu yapılar dikkate alınarak hesaplamalar yapıldı.

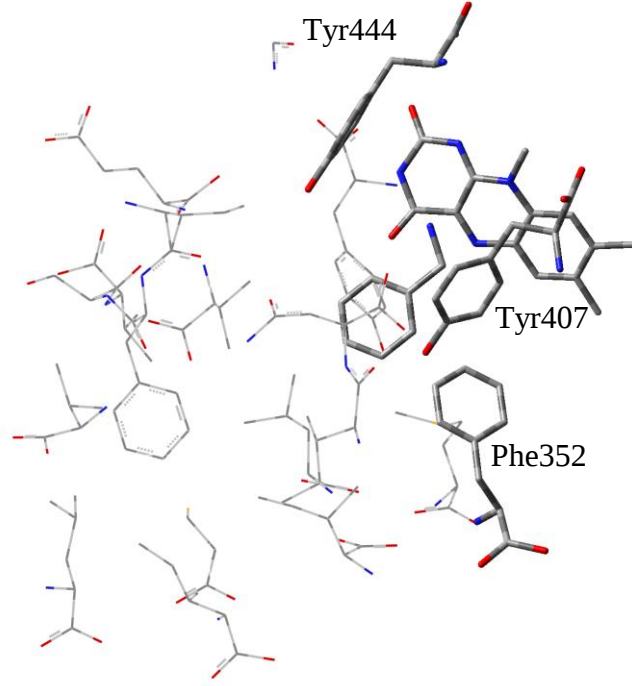
ONIOM yöntemi ile yapılan mekanizma çalışmalarında ise doğru geçiş konumunun tayini yukarıda anlatıldığı gibi yapılamadı. Model yapılarıdaki atom sayılarının fazla olması sebebi ile yapıdaki atomların koordinatları kısmen donduruldu. Koordinatları dondurulan atomlar ait hesaplamalarda birden fazla (-) frekans elde edildi. Bu durumda elde edilen sanal frekansların değerlerine bakılarak doğru bir geçiş geometrisi elde edilip edilemediği kontrol edildi. Geçiş konumundaki yapısında H'in transferine ait olan frekans yaklaşık (-)1800 değerlerinde iken yapıdaki diğer dönme hareketlerine ait olan frekans değerleri (-) 20'lerden azalan şekilde devam etmektedir. Geçiş konumunun doğru yapısı tayin edilirken (-) frekans değerleri ve ait oldukları hareketler incelendi.

III. 4. 1. Aktif Bölge İçinde Polar Nükleofilik Mekanizmanın Modellenmesi

Aktif bölgedeki atom sayısının fazla olması, mekanizma modellemelerinde özellikle geçiş konumu optimizasyonlarının güç olması oluşturulan modellere, çalışma yöntemine ve temel kümelerine sınırlamalar getirmiştir. Aktif bölgenin tamamının dahil edildiği mekanizma çalışmaları iki seviyeli ONIOM yöntemi ile reaksiyon yolu taranarak yapıldı.

III. 4. 1. 1. ONIOM(PM3:UFF) Yöntemi İle Yapılan Mekanizma Çalışmaları

2Z5Y (insan, 2.17A çözünürlük) pdb kodlu MAO A x ışını yapısı aktif bölgedeki aminoasit tiplerine göre düzenlendi. Flavin üç metil karbonundan, aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444'ün benzen halkası p-pozisyonundaki karbon atomlarından ve aktif bölgeyi oluşturan diğer aminoasitlerin tamamı ağır atomlarından donduruldu. Elde edilen yapı iki seviyeye ayrılarak ONIOM(PM3:UFF) yöntemi ile Polar Nükleofilik Mekanizma optimizasyonu yapıldı. Flavin, Tyr407, Tyr444, Phe 352 ve benzilamin yüksek seviye (PM3), aktif bölgenin geri kalanı düşük seviye (UFF) olarak seçildi (Şekil III. 20). Oluşturulan bu yapı ile Polar Nükleofilik Mekanizma modellendi.



Şekil III. 20 Polar Nükleofilik Mekanizmanın ONIOM(PM3:UFF) Yöntemi İle Modellenmesinde Seçilen Seviyeler (H atomları şeklin daha anlaşılır olması için verilmemiştir.)

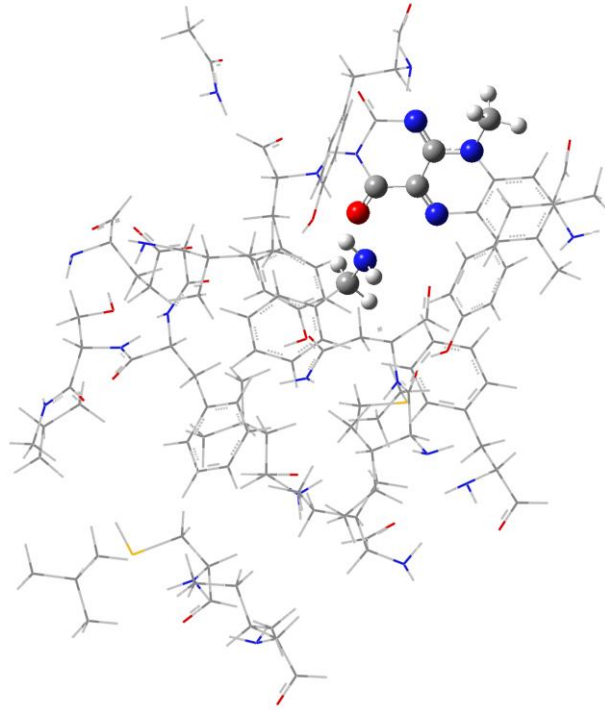
III.4.1.2. ONIOM(PM6:UFF) Yöntemi İle Yapılan Mekanizma Çalışmaları

ONIOM(PM3:UFF) yöntemi ile yapılan mekanizma modelleme çalışmasındaki ONIOM seviyeleri ve dondurulan atomlar aynı kalmak kaydıyla sadece yüksek seviye için seçilen yöntem PM6 olarak değiştirildi. Polar Nükleofilik Mekanizma ONIOM(PM6:UFF) yöntemi ile aktif bölgenin tamamı seçilerek modellendi (Şekil III. 10. b).

III.4.1.3. ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması

2BXR (insan) pdb kodlu 3.0 Å çözünürlüklü MAO A enziminin x ışını yapısı aktif bölgeye indirildi, substrat olarak dik konformasyondaki benzilamin seçildi ve dondurma işlemi doğal enzim optimizasyonlarındaki gibi yapıldı. ONIOM(HF/6-31G*:PM3) seviyelendirmesi şu şekilde yapıldı: Polar nükleofilik mekanizma için önemli olan proton hareketi ve buna yardımcı olan diğer atomlar yüksek seviye (HF/6-31G*) olarak, aktif bölgedeki diğer aminoasitlerin ağır atomları düşük seviye (PM3) seçildi (Şekil III. 21). Benzilamin substratı flavine 4.0 Å mesafe uzaklıktan başlanarak belirli aralıklarla flavine doğru yaklaştırıldı ve ara ürün

modellenmesinde flavine bağlandı. Benzilaminin flavine doğru hareketindeki enerji değişimi incelendi ve aralarındaki mesafe $1.7\text{\AA}$ olduğunda enerjide bir tepe noktası oluşturdu. Bu mesafe sabitlenerek bu kez Pro R H'i ile flavin N(5)'i arasındaki reaksiyon yolunda H'in flavine doğru hareketi $0.1\text{\AA}$ 'luk adımlarla tarandı. Yapılan bu optimizasyonlar sonucunda minimum optimizasyonu ile elde edilmiş olan bir reaksiyon koordinatı oluşturuldu.



Şekil III. 21 Polar Nükleofilik Mekanizmanın ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Modellenmesinde Seviyeler: Top model yüksek seviye HF/6-31G*, çizgi model ise PM3 seviyelerini temsil etmektedir. (H atomları şeklin daha anlaşılır olması için verilmemiştir.)

III.4.1.4. PM3 Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması

Aktif bölgeyi oluşturan aminoasitlerin tamamı tek seviye yarı deneysel PM3 yöntemi ile modellendi. Benzilamin azotu ile flavin C(4a) arasındaki reaksiyon yolu, uzak mesafelerde $0.5\text{\AA}$ 'luk adımlar ile, substrat flavine yaklaştıkça $0.2\text{\AA}$ ve $0.1\text{\AA}$ 'luk adımlarla taranarak reaktant kompleks, geçiş konumu ve araürün yapıları elde edilmeye çalışıldı. Geçiş konumu tespit edilirken reaksiyon yolundaki optimizasyonlardan en yüksek enerji noktasında proR H'i benzilamin α C ile olan bağı kopartıldı ve flavin N5 ile α C'in arasında $0.1\text{\AA}$ 'luk aralıklarla optimize edildi.

Optimizasyon sonuçlarından elde edilen yapılara aynı şekilde HF/6-31G* yöntemi ile ‘Tek Nokta Enerji’ hesabı yaptırıldı ve yüksek enerjili olduğu nokta geçiş konumu yapısı olarak tayin edildi. Araürün yapısı için pro R H’i flavin N(5)’e bağlı olarak optimize edildi ve diğer basamaklarda yapıldığı gibi HF/6-31G* yöntemi ile ‘Tek Nokta Enerji’ hesabı yaptırıldı. Böylelikle polar nükleofilik mekanizmanın hız belirleme basamağı olan birinci basamak için aktivasyon enerjisi tespit edildi. Aynı şekilde PM3 tek seviye hesaplamalarından elde edilen sonuçlara göre de aktivasyon enerjisi tespit edildi. Elde edilen aktifleşme enerjisi ile Berny geçiş konumu optimizasyonu sonucu elde edilen birinci aktifleşme enerjileri kıyaslandı.

III.4.2. Model Yapılar İle Mekanizma Modellenmesi

Aktif bölgedeki atom sayısının fazla olması mekanizma modellemelerinde seçilebilecek yöntemleri sınırlamaktadır. Bu sebeple mekanizma çalışmalarında aktif bölgeye ait x-ışını yapısı küçültülerek farklı model yapılar oluşturularak çalışmalar yapıldı. Böylece modeller arasındaki farkların aktivasyon bariyeri üzerindeki etkileri de incelenmiş oldu. Model yapılar ile yapılan çalışmaları kısaca aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

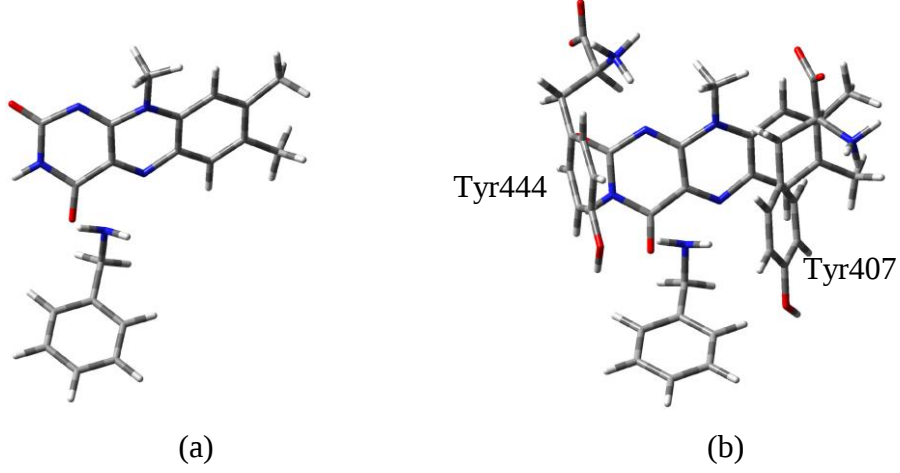
III.4.2.1. PM3 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar

PM3 yöntemi ile Polar Nükleofilik Mekanizmanın modellenmesinde

- Flavin + Benzilamin
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + Ile335
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + Ile335 + kısmen diğer çevre aminoasitleri ile toplam 140 ağır atom içeren model yapı.

olmak üzere toplam altı farklı yapı seçilmiştir. Her bir model ile reaksiyon yolundaki yapılar optimize edilmeye çalışılmıştır. İlk model yapımız olan flavin ve benzilaminden oluşan model yapıda atomlardan hiçbirinin koordinatı dondurulmadan modellenmiştir (Şekil III. 22. a). İkinci model yapı olan flavin, benzilamin, Tyr407 ve Tyr444’ten oluşan modelde flavin üç metil karbon atomundan, Tyr407 ve Tyr444’te

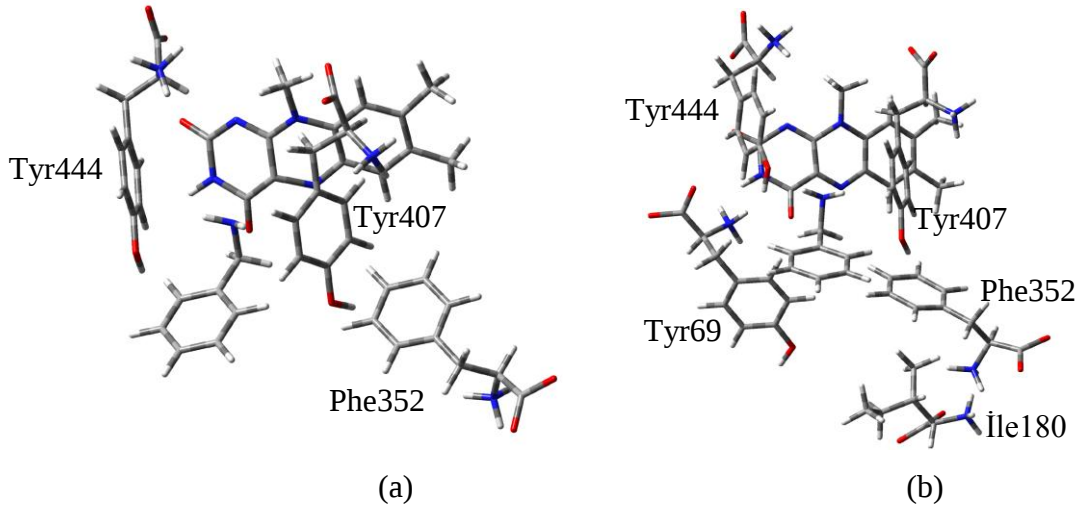
benzen halkalarının C1-C4 ekseninde dönme serbestliğine sahip olacak şekilde o-C ve yan zincir atomlarından dondurulmuştur (Şekil III. 22. b). Bu model yapı aromatik kafesi oluşturan aminoasitlerin Polar Nükleofilik Mekanizmanın aktivasyon enerjisi üzerindeki olası etkilerinin incelenebilmesi için oluşturulmuştur.



Şekil III. 22 PM3 ile Polar Nükleofilik Mekanizma Çalışmasındaki Model Yapılar (Reaktant kompleks): a) Flavin + Benzilamin, b) Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444

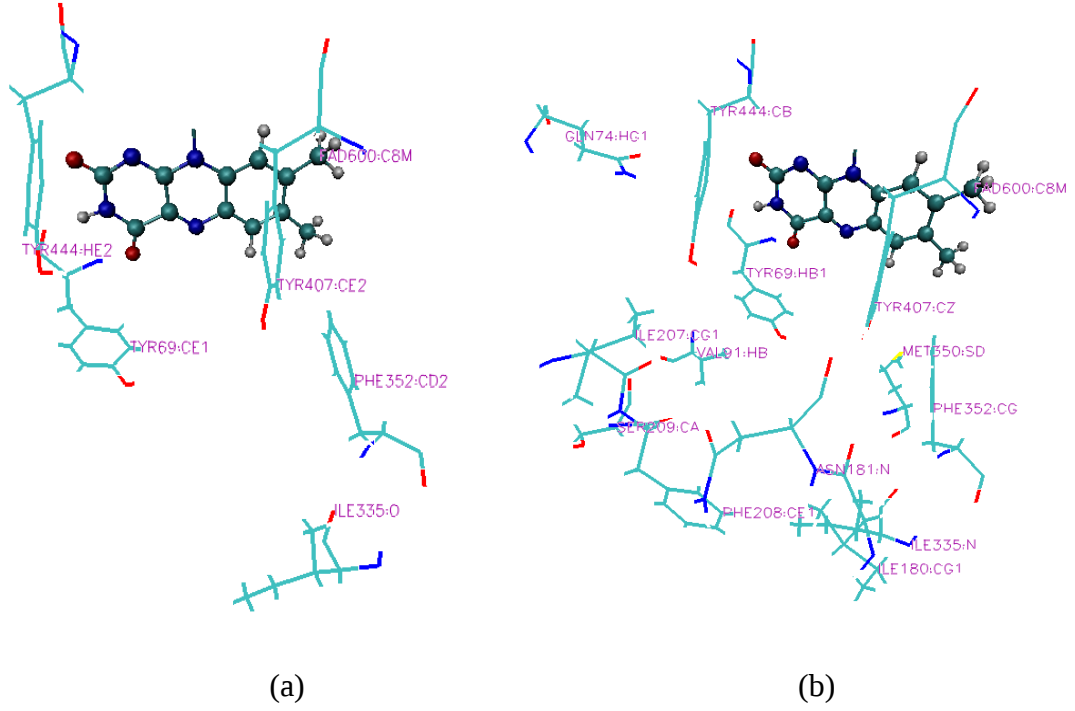
Üçüncü model yapı flavin, benzilamin, Tyr407, Tyr444 ve Phe352'den oluşmaktadır (Şekil III. 23. a). Bu model yapı için yapılan dondurma işleminde ise farklı olarak Phe352 aminoasidinin de benzen halkası C1-C4 ekseninde dönme serbestliğine sahip olacak şekilde o-C ve yan zincir atomlarından dondurulmuştur. Üçüncü model yapı ile flavinin re yüzünde ve benzilamin ile etkileşimde olabilecek diğer bir aromatik aminoasidin reaksiyonun aktivasyon enerjisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

PM3 yöntemi ile yapılan optimizasyonlardaki dördüncü model yapımız ise flavin, benzilamin, Tyr407, Tyr444, Phe352, Tyr69 ve İle180'den oluşmaktadır (Şekil III. 23. b). Üçüncü model yapıdan farklı olarak İle180 aminoasidi C2 ve C3 atomlarından dondurulmuştur. Oluşturulan bu model ile benzilamin substratının çevresi kısmen sarılmaya çalışılmış ve daha büyük bir model yapı ile çalışmak hedeflenmiştir.



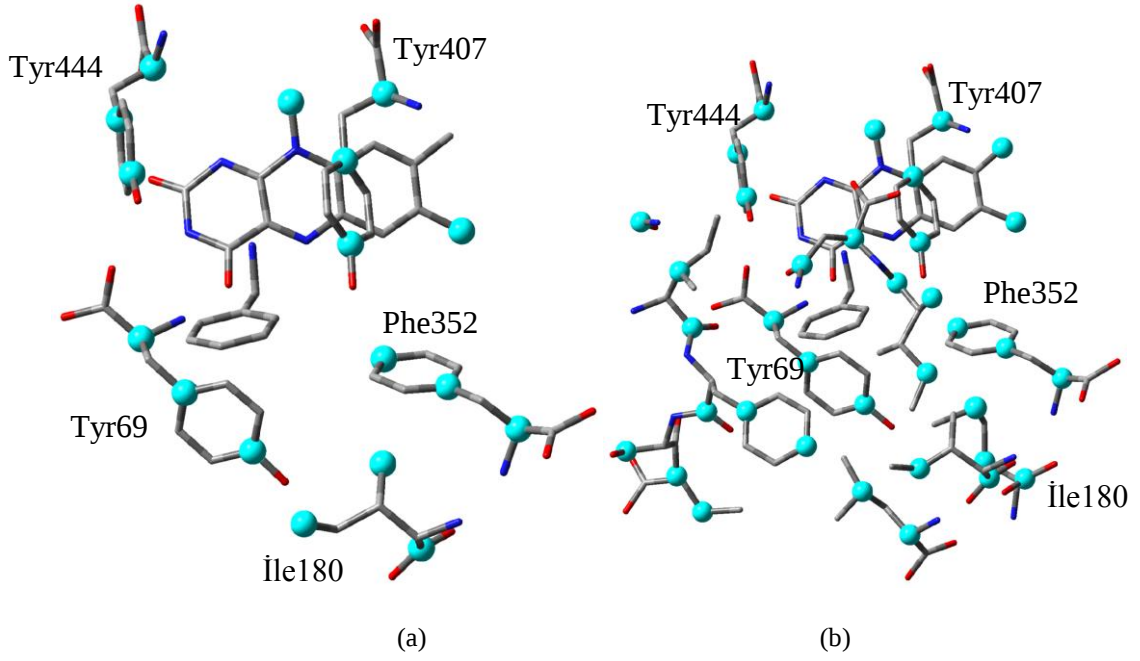
Şekil III. 23 PM3 ile Polar Nükleofilik Mekanizma Çalışmasındaki Model Yapılar: a) Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352, b) Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + İle180

Oluşturulan beşinci ve altıncı model yapılar enzimin aktif bölgesinden sonra çalışılan en büyük model yapılarıdır. MAO A enziminin aktif bölgesinde H atomları dahil 353 atom bulunmakta ve ligandımız olan benzilamin substratı da ilave edilince toplam atom sayısı 370'e çıkmaktadır. Aktif bölgenin tamamının dahil edildiği bir mekanizma çalışmasında tek seviye PM3 yöntemi kullanıldığında optimizasyonların süresi çok uzaması ve zaman zaman döngü sayısının yetmemesi ya da farklı nedenlerden ötürü hesaplamalar yarıda kesilmektedir. Bu tip olumsuz koşulları iyileştirebilmek için aktif bölgedeki atom sayısı azaltılarak iki farklı model yapı oluşturuldu. Bu modeller toplam 79 (H atomları dahil 152 atom) ve 140 (H atomları dahil 301 atom) ağır atom içermektedir. 79 ağır atoma sahip olan modelde flavin, benzilamin, Tyr407, Tyr444, Phe352, Tyr69 ve Ile335 aminoasitleri dahil edildi (Şekil III. 24. a). 140 ağır atoma (H atomları dahil 301 atom) sahip olan model yapı ise flavin, benzilamin, Tyr407, Tyr444, Phe352, Tyr69, Ile335 ve kısmen Gln74, Val91, Asn181, Ile180, Met350, Phe208, Ile207 ve Ser209 aminoasitlerini içermektedir (Şekil III. 24. b).



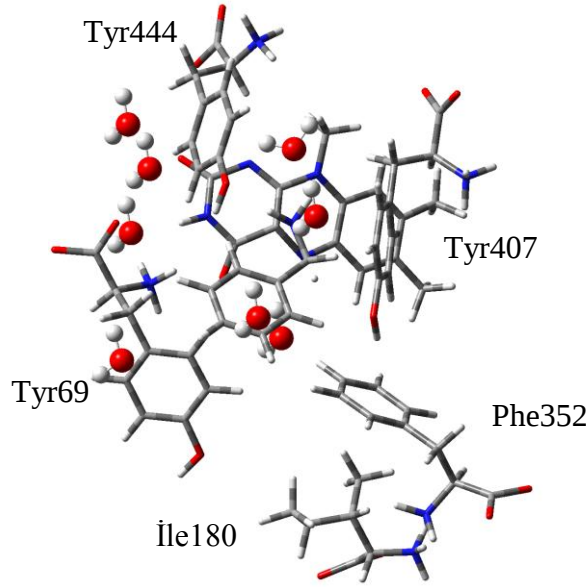
Şekil III. 24 PM3 ile Polar Nükleofilik Mekanizma Çalışmasındaki Model Yapılar: a) 79, b)140 ağır atomlu model yapılar

Optimizasyonlar yapılırken benzilamin tamamen serbest bırakıldı. Tyr407 ve Tyr444'ün aromatik halkası konformasyonel serbestliğe sahip olacak şekilde fenol gruplarının para pozisyonlarından donduruldu. 79 ağır atom içeren modelde Phe352, Tyr69 ve İle180 aminoasitleri ise sadece üçer tane atomlarından, 140 ağır atom içeren model de aynı şekilde Phe352, Tyr69 ve İle180 aminoasitleri ise sadece üçer tane atomlarından ve modeldeki diğer Gln74, Val91, Asn181, Ile180, Met350, Phe208, Ile207 ve Ser209 aminoasitlerinin ise iki-üç atomundan donduruldu (Şekil III. 25).



Şekil III. 25 PM3 Yöntemi ile Çalışılan Büyük Modellerde Koordinatları Dondurulan Atomlar: a) 79 ağır atom içeren yapı, b) 140 ağır atom içeren yapı. (Koordinatları dondurulan atomlar top model ile seçili olarak gösterilmiştir.)

79 ve 140 ağır atom içeren model yapı 2.17 Å çözünürlüklü 2Z5Y pdb kodlu x-ışını yapısının küçültülmesi ile elde edildi. Bu x-ışını yapısı incelendiğinde flavinin *re* yüzünde sekiz adet H₂O molekülünün varlığı tespit edildi. Bunun üzerine mevcut sekiz adet H₂O molekülünün koordinatları değiştirilmeden, sadece yönelmeleri H bağı yapacak şekilde yönlendirilerek Polar Nükleofilik Mekanizma modellenmesine dahil edildi (Şekil III. 26). Böylelikle H köprü bağlarının aktivasyon enerjisi üzerindeki etkisi ve aktif bölge içindeki H₂O moleküllerinin olası görevi incelenmeye çalışıldı.



Şekil III. 26 79 Ağır Atom + 8 H₂O Molekülünden Oluşan Model Yapı (H₂O molekülüleri anlaşılır olması amacıyla top model ile gösterilmiştir).

III.4.2.2. PM6 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar

Gaussian09'un geliştirilmesi ile hesaplamalarımıza dahil ettiğimiz yarı deneysel PM6 yöntemi ile yapılan çalışmalarda kullanılan model, PM3 yöntemi ile yapılan optimizasyonlardaki model yapılar ile örtüşmektedir. Aşağıdaki listede verildiği gibi

- Flavin + Benzilamin
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69

modelleri ile çalışıldı (Şekil III. 22 ve Şekil III. 23. a). Söz konusu modellerde uygulanan atomların dondurulma işlemi Bölüm III.4.2.1.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

III.4.2.3. HF Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar

HF/6-31G* yöntemi ile yapılan Polar Nükleofilik Mekanizmanın model çalışmasında mevcut imkanlarımız yarı deneysel yöntemler ile çalışılan model yapıların tamamının çalışılmasına izin vermedi. Dolayısıyla HF yöntemi ile Polar Nükleofilik Mekanizmanın modellenmesinde

- Flavin + Benzilamin
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444'den

oluşan iki farklı model yapı ile çalışıldı (Şekil III. 22). İkinci model yapı çalışmasında koordinatları dondurulan atomlar yarı deneysel yöntem çalışmalarındaki ile aynıdır.

III.4.2.4. DFT Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar

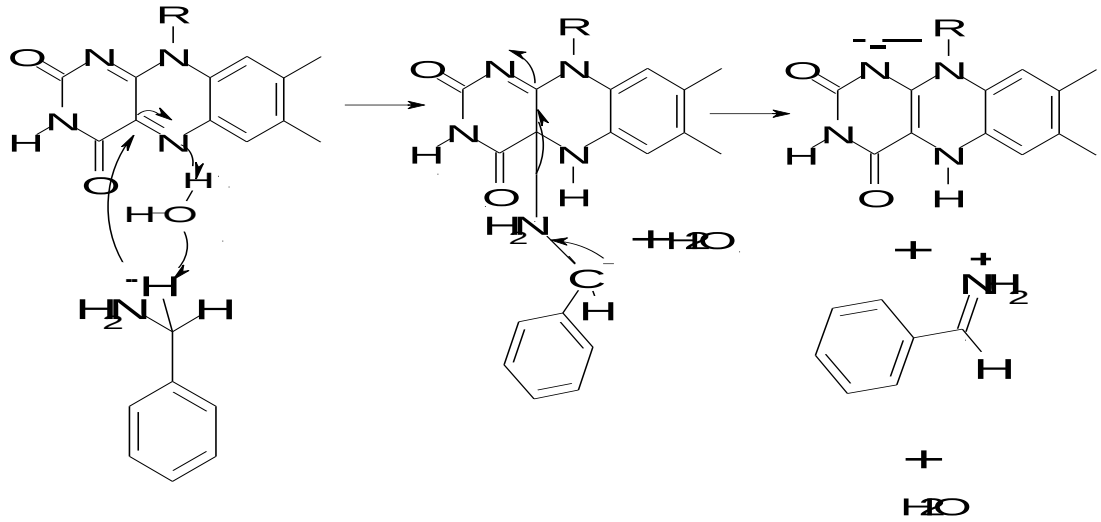
B3LYP/6-31G* yöntemi ile yapılan Polar Nükleofilik Mekanizmanın modellenmesinde daha hassas yöntem seçilmesi çalışılan model yapıyı sınırlamıştır. DFT yöntemi ile sadece flavin ve benzilaminden oluşan küçük yapı modellenmiştir (Şekil III. 22. a).

III.4.2.5. MP2 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalar

Aynı şekilde MP2/6-31G* yöntemi ile yapılan mekanizma modellenmesinde de yüksek seviye yöntem seçilmesi çalışılan model yapıyı sınırlamıştır ve sadece flavin ve benzilaminden oluşan tek model yapı ile çalışma yapılmıştır (Şekil III. 22. a).

III.4.3. H₂O'lu Polar Nükleofilik Mekanizmanın Önerilmesi ve Modellenmesi

MAO A'nın protein data banktaki düşük çözünürlüklü x ışını yapılarında enzimdeki H₂O molekülleri yer almamaktaydı. Protein data banka Nisan 2008 tarihinde eklenen daha yüksek çözünürlüklü 2Z5X (2.2 Å) ve 2Z5Y (2.17Å) x ışını yapıları incelendiğinde flavinin *re*-yüzünde sekiz adet H₂O molekülü gözlemlendi. Literatürde H₂O üzerinden yürüyerek düzenlenen reaksiyonlarda aktivasyon bariyerinin düştüğü [65-67] hatta bazı araştırmalarda yarı değerine indiği [68] ve daha kararlı ürünler elde edildiğine dair araştırmaların bulunmaktadır[69]. Polar Nükleofilik Mekanizma H₂O yardımı ile yeniden önerildi ve çeşitli model yapılar ile hesaplamalar yapıldı (Şekil III. 27). Böylelikle aktif bölgenin içindeki mevcut olan su moleküllerinin reaksiyonun H₂O üzerinden yürümesini kolaylaştırıcı bir etkisi olup olmadığı incelendi.



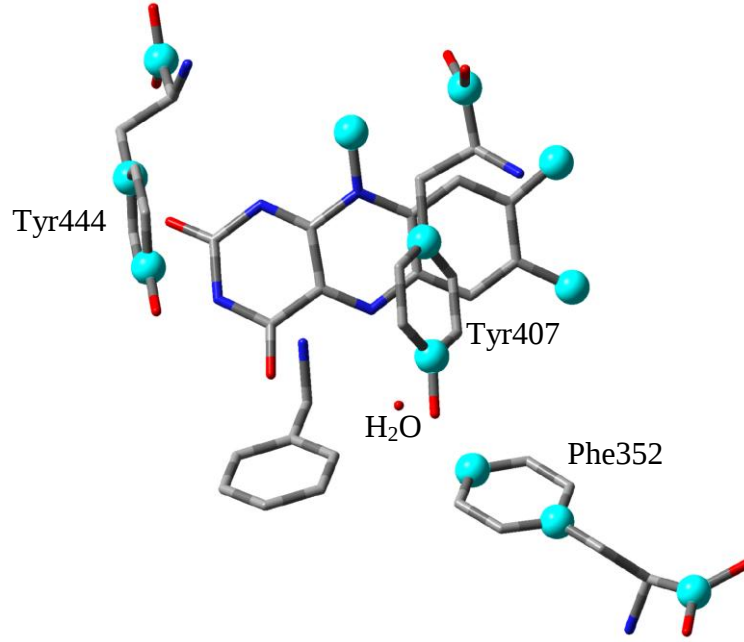
Şekil III. 27 H₂O Üzerinden Yürüyen Polar Nükleofilik Mekanizma

Mekanizma incelemelerinde yedi ayrı model yapı oluşturulmuştur ve tüm modeller PM3 yarı deneysel yöntemi ile çalışılmıştır.

- Flavin + Benzilamin + H₂O
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + H₂O
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + H₂O
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + H₂O (12 atom redundant)
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + Ile335 + H₂O
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + Ile335 + 8H₂O
- Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + Ile335 + kısmen diğer çevre aminoasitleri + H₂O ile toplam 140 ağır atom içeren model yapı.

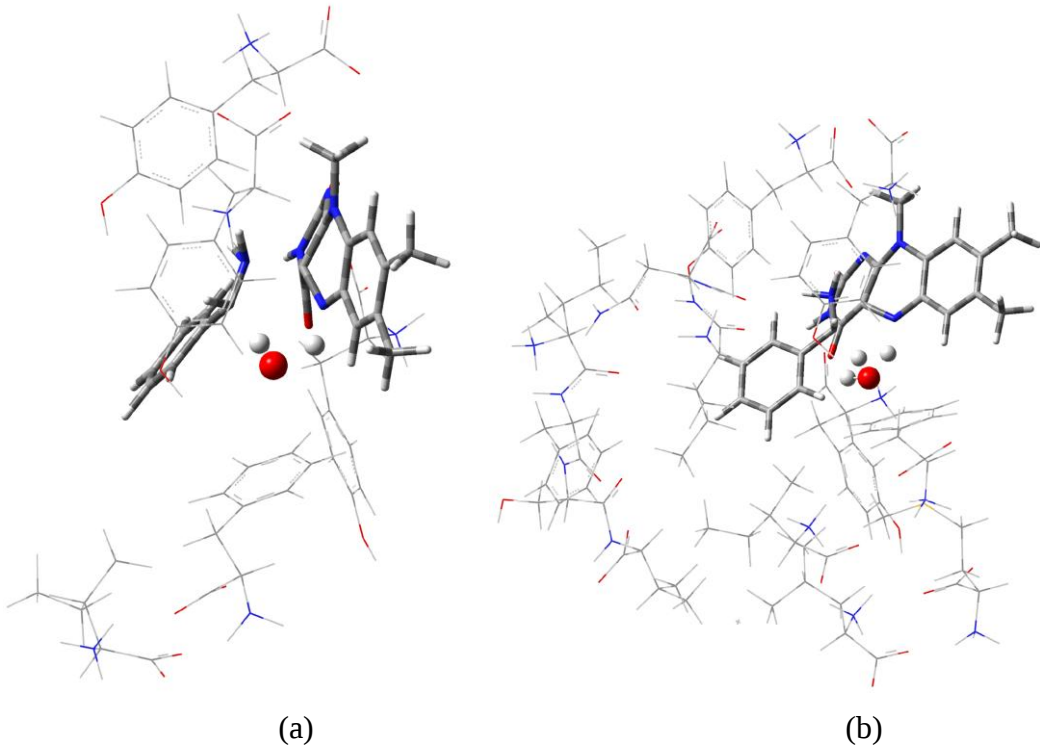
Optimizasyonlar yapılırken benzilamin tamamen serbest bırakıldı. Flavin sahip olduğu üç metil karbon atomundan, tirozin aminoasitleri zincir atomlarından ve aromatik halkalarının konformasyonel serbestliğe izinli olacak şekilde para karbon atomlarından, Phe352 aminoasidi de aynı şekilde konformasyonel serbestliğe izinli olacak şekilde p-C ve yan zincirdeki tüm ağır atomlarından donduruldu. Çalışılan bir diğer model yapı da Flavin, Benzilamin substratı, Tyr407, Tyr444, Phe352 ve H₂O'dan oluşan model yapıda koordinatları dondurulan atom sayısı 21'den 12'ye azaltılarak hesaplamalar tekrarlandı (Şekil III. 28). Böylelikle atom koordinatlarının

dondurulmasının aktivasyon enerjisi üzerindeki etkisi incelendi. Yapılan bu çalışmalarda tek seviye PM3 yarı deneysel yöntemi kullanılmıştır.



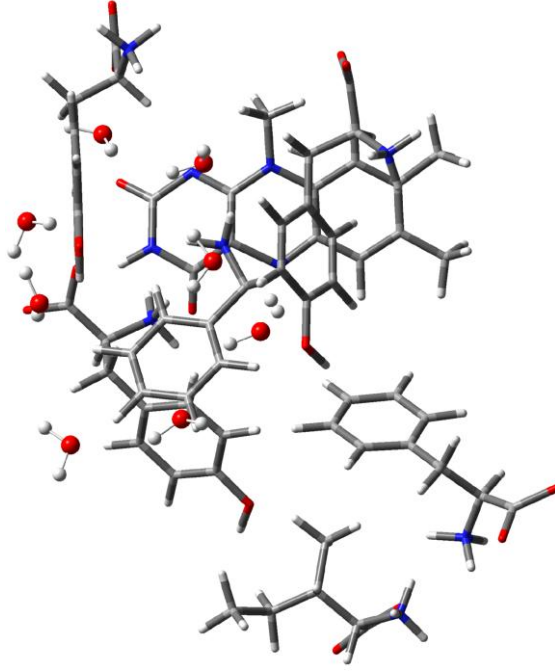
Şekil III. 28 12 Atomun Koordinatının Dondurulduğu Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + H₂O Model Yapısı (Koordinatları dondurulan atomlar top model ile seçili olarak gösterilmiştir.)

H₂O'lu Polar Nükleofilik Mekanizma çalışmasında oluşturulan diğer üç model yapı yukarıdaki listede verilmiştir. H₂O'lu polar nükleofilik çalışmanın en büyük model yapılarını oluşturan 79 (Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + Ile335 + H₂O) ve 140 (Flavin, Benzilamin, Tyr407, Tyr444, Phe352, Tyr69, Ile335 ve kısmen Gln74, Val91, Asn181, Ile180, Met350, Phe208, Ile207 ve Ser209) ağır atom içeren model yapılar Bölüm III. 4. 2. 1'de anlatıldığı gibi dondurulmuştur (Şekil III. 29). İlave edilen H₂O molekülü ise serbest bırakılmıştır.



Şekil III. 29 Tek Seviye PM3 Yöntemi ile H₂O'lu Polar Nükleofilik Mekanizma Çalışmasındaki Model Yapılar: a) Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444+ Phe352+ Tyr69 + Ile335 + H₂O (79 ağır atom), b) Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 + Tyr69 + İle335 + kısmen diğer çevre aminoasitleri + H₂O (140 ağır atom) (Model yapı görüntülerinin anlaşılır olması amacıyla H₂O top şeklinde, benzilamin ve flavin çubuk model şeklinde, protein yapısı ise çizgi şeklinde gösterildi.)

H₂O üzerinden yürüyen Polar Nükleofilik Mekanizma için hazırlanan yedinci model yapı da aktif bölgenin *re* yüzündeki sekiz H₂O molekülünün model yapıya dahil edildiği ve bu H₂O moleküllerinden biri üzerinden mekanizmanın modellendiği yapıdır (Şekil III. 30). Modeldeki H₂O moleküllerinin koordinatları dondurulmamış, tamamen serbest bırakılmıştır.



Şekil III. 30 PM3 Yöntemi ile H₂O İlave Edilerek Atom Sayısı Azaltılmış Model Çalışmaları İçin Düzenlenen Aktif Bölge Yapıları, (b) 79 ağır atoma sahip yapı. (Model yapı görüntülerinin anlaşılır olması amacıyla H₂O molekülleri top model olarak verilmiştir.)

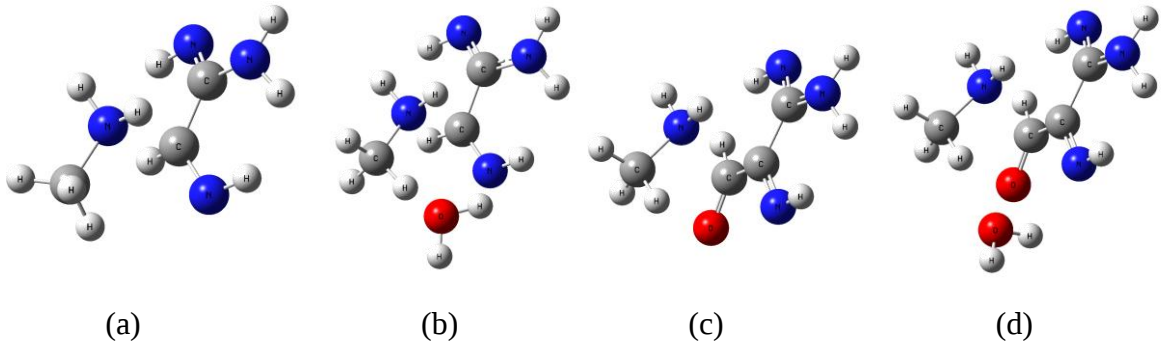
III. 4. 4. Küçük Model Yapılar İle Önerilen Mekanizmaların Karşılaştırılması

Polar nükleofilik, Sulu polar ve Hidrür mekanizmalar küçük model yapılar oluşturularak aktivasyon enerjileri yüksek seviye yöntemler ile karşılaştırıldı. Oluşturulan model yapıları iki grupta toplayabiliriz: Şekil III. 31’de gösterilen I. grup olarak tanımlayabileceğimiz model yapılar bu tez çalışması kapsamında oluşturulan en küçük model yapıları oluştururken, II. grup olarak tanımlayacağımız model yapı (benzilamin+flavin) ise bu tez çalışmasında ve daha önceki S. Erdem danışmanlığında yönetilen tez çalışmalarında kullanılan model yapılarıdır[70, 71].

III. 4. 4. 1. 17 ve 19 Atomlu Modeller İle Mekanizmaların Karşılaştırılması

Mekanizmaların karşılaştırılması farklı yöntem ve temel kümeler ile yapıldı. Daha önceki çalışmalarda Polar Nükleofilik Mekanizmanın araürünü DFT yöntemleri optimize edilmeye çalışılmış ancak başarılamamıştır. Standart DFT yöntemleri amin N’u ile flavin C(4a) arasında bağ oluşturmamaktadır. Bunun sebebi olarak dispersiyon etkisinin hesaba katılmaması düşünülmüştür. Dispersiyon etkisi Gaussian09 programında CAM/B3LYP [72] ve WB97XD [73, 74] yöntemleri ile

hesaplamalara dahil edilmiştir. Böylece Polar Nükleofilik Mekanizmanın yüksek seviye yöntemler ile modellenmesinin önü açıldı. Yüksek seviye yöntemler ile çalışabilmek için oluşturulan en küçük model yapılar 17 ve 19 atom içermektedir (Şekil III. 31).

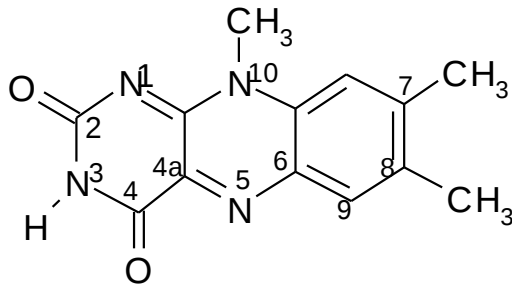


Şekil III. 31 Mekanizmaların Karşılaştırılmasında Kullanılan Model Yapılar: (a) 17 atom içeren model A, (b) 17 atom +H₂O içeren Model A, (c) 19 atom içeren model B, (b) 19 atom +H₂O içeren Model B.

Bu küçük modeller ile çalışılan yöntem ve temel kümeler PM3, PM6, HF/6-31G*, HF/6-31+G**, DFT/6-31G*, DFT/6-31+G**, CAMB3LYP/6-31G*, CAMB3LYP/6-31+G**, WB97XD/6-31G*, WB97XD/6-31+G** ve MP2/6-31+G**'dir. Seçilen yöntem ve model yapılar ile polar nükleofilik, sulu polar ve hidrür mekanizmaların aktivasyon enerjileri karşılaştırıldı. Reaksiyonun potansiyel enerji yüzeyindeki reaktantlar, ara ürün, ürün ve geçiş konumları tamamen optimize edildi. Geçiş konumları tek bir sanal frekans ve IRC hesapları ile doğrulandı.

III. 5. KARBONİL MEKANİZMANIN ÖNERİLMESİ

Bu tez çalışması sırasında MAO A'nın amin oksitleme mekanizmalarını incelerken literatürde olmayan yeni bir mekanizma önerildi. Bu mekanizmanın önerilmesinin sebebi flavin üzerindeki yük dağılımıdır. Flavin üzerindeki yük dağılımı HF/6-31G* yöntemi ile yapılan hesaplamada aşağıda Şekil III.32'de verildiği gibi bulunmuştur.



C4 : + 0.888272

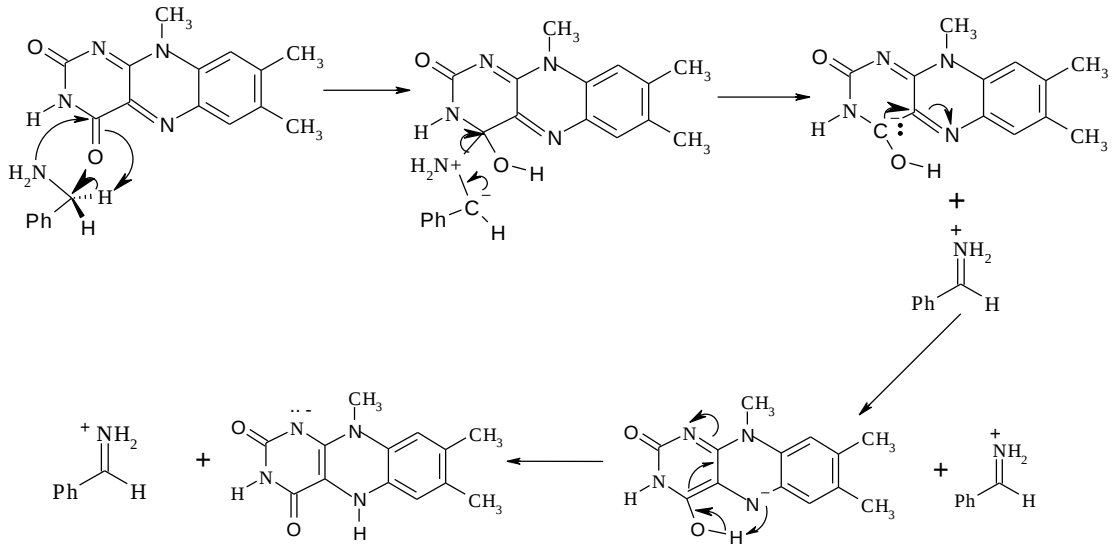
C4=O : - 0.741264

C(4a) : 0.144028

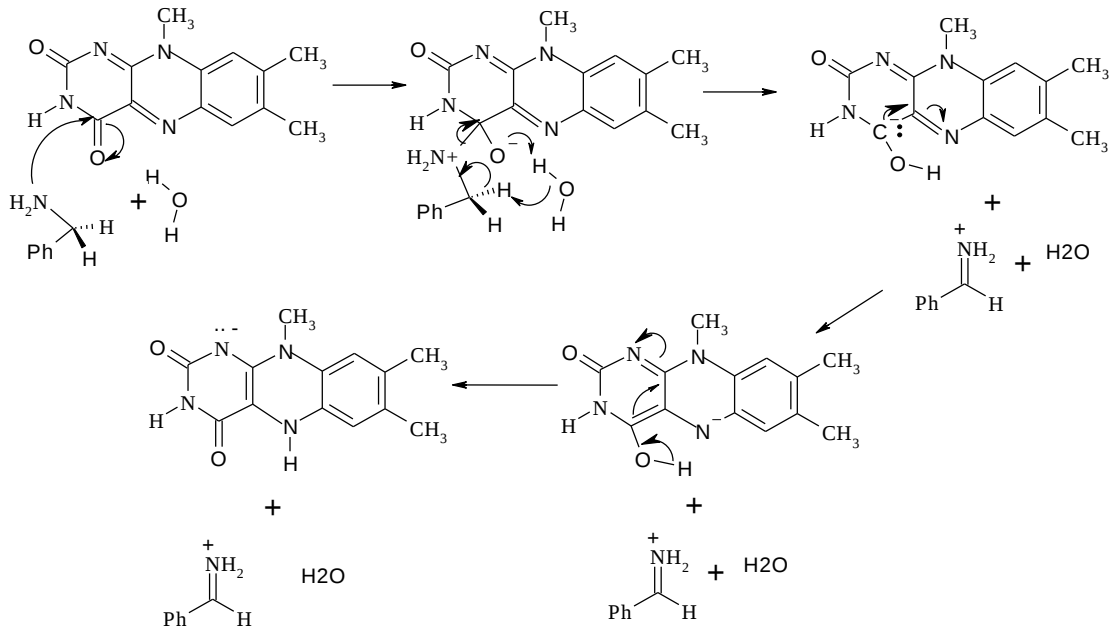
N(5) : - 0.550136

Şekil III. 32. Flavin Üzerindeki Mulliken Yük Dağılımı

Bunun üzerine benzilamin N'unun bağ yapmamış elektronları ile pozitif yükü C4a'ya göre çok daha büyük olan C4'e saldırabileceği fikri üzerinde duruldu. Bu fikirden hareketle aşağıda Şekil III.33 ve Şekil III.34'te görülen Karbonil Mekanizma ve H₂O'lu Karbonil Mekanizma olmak üzere iki farklı mekanizma yazıldı. Yazılan bu iki farklı mekanizma tek basamakta veya iki basamakta H⁺ transferi yapacak şekilde mekanizma A ve mekanizma B olmak üzere iki farklı formda yazıldı. Önerilen bu mekanizma Şekil III. 22.a'da gösterilen flavin ve benzilaminden oluşan model yapı ile yarı deneysel PM3 ve PM6 yöntemleriyle modellendi.



Şekil III. 33. a. Karbonil Mekanizma A (tek basamakta H⁺ transferi)



Şekil III. 34. b. H₂O'lu Karbonil Mekanizma B (iki basamakta H transferi)

Şekil III. 34. b'de verilen H₂O'lu Karbonil Mekanizma B'de ise benzilamin N'u önce C4'e saldırır, karbonil O'i ve C4 arasındaki çift bağ O üzerine açılarak O üzerinde negatif yükün biriktiği bir ara ürün oluşturur. Daha sonra O üzerinde biriken elektron yoğunluğu H₂O'nun H'ine saldırır, diğer reaksiyon basamakları Şekil III. 34. a'da verilen reaksiyon şemasındaki ile aynıdır.

III. 6. P-SÜBSTİTÜE BENZİLAMİN TÜREVLERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR VE YAPI AKTİVİTE İLİŞKİLERİ

Çalışmamızda substratımızı oluşturan benzilaminin para pozisyonunda $\bar{e}$ çeken ve veren grupların delokalizasyon yoluyla önerilen mekanizmaların üzerinde etkisi incelendi. MAO B izo enzimi için yapılan deneysel çalışmaların mevcut olması çalışmamızın bu bölümünden elde edilen teorik verilerin deneysel veriler ile kıyaslanmasını sağlamıştır. P-X-benzilamin X: H, F, Cl, Br, I, Me, MeO, EtO, IsoPr, N(CH₃)₂, n-Bu, NO₂, CF₃, CF₃O ve t-Bu sübtitüentleri ile modellendi.

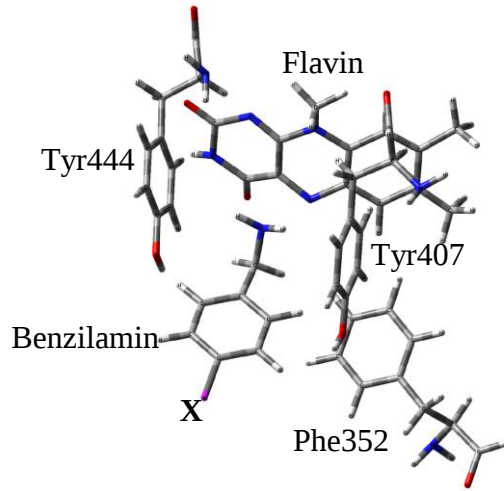
P-Sübtitüe Benzilamin Çalışmaları İçin Oluşturulan Model Yapılar:

III. 6. 1. Flavin + Benzilamin Modeli

Şekil III. 22. a’da gösterilen model yapı ile X: H, F, Cl, Br, I, Me, MeO, EtO, IsoPr, N(CH₃)₂, n-Bu, NO₂, CF₃O ve t-Bu sübtitüentleri ile modellenen yapı yarı deneysel PM6 yöntemi ile optimize edildi. Hesaplamalarda Polar Nükleofilik Mekanizma’ya reaksiyon basamaklarındaki yapıların optimizasyonları, flavin ve benzilaminden oluşan diğer model yapılarda olduğu gibi yapıdaki atomların koordinatları dondurulmadan optimizasyonlar gerçekleştirildi.

III. 6. 2. Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 Modeli

Şekil III.35’te gösterilen model yapı X: H, F, Cl, Br, I, Me, MeO, EtO, IsoPr, N(CH₃)₂, n-Bu, NO₂, CF₃O ve t-Bu sübtitüentleri ile modellendi.



Şekil III. 35 P-Sübtitüe Benzilamin Türevleri İle Yapılan Çalışmada Oluşturulan Model Yapı.

Oluşturulan bu model yapıda flavin sahip olduğu üç metil karbon atomundan, tirozin aminoasitleri zincir atomlarından ve aromatik halkalarının konformasyonel serbestliğe izinli olacak şekilde p-C atomlarından, fenilalanin aminoasidi de konformasyonel serbestliğe izinli olacak şekilde p-C ve yan zincirlerinin tüm ağır atomlarından donduruldu. Yapılan optimizasyonlarda yarı deneysel PM3 yöntemi kullanılarak reaktant kompleks ve 1. geçiş konumu optimize edildi. Böylece Polar Nükleofilik Mekanizma’nın hız belirleme basamağı olan 1. aktivasyon enerjisi üzerinde elektron çeken ve veren sübtitüentlerin etkisi incelenmiş oldu.

III. 6. 3. Aktif Bölgenin İçine P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin Yerleştirilmesi

Benzilamin ve p-sübsititüe benzilamin türevlerinin doğal enzimin aktif bölgesindeki etkileri karşılaştırıldı. Bu optimizasyonlarda doğal enzim optimizasyonlarındaki çalışma modelimiz olan Şekil III. 10'da gösterilen MAO A enziminin aktif bölge aminoasitlerinin tamamı model yapıya dahil edildi. Aktif bölgedeki atomların koordinatlarının dondurulma işlemi ise doğal enzim optimizasyonlarında yapıldığı gibidir. Aktif bölgeyi oluşturan tüm ağır atomların koordinatları donduruldu, Tyr407 ve Tyr444 amino asitlerine konformasyonel serbestlik verildi. Substrat olarak ise sırasıyla p-X-benzilamin türevleri olarak X: H, F, Cl, Br, I, Me, MeO, EtO, IsoPr, N(CH₃)₂, n-Bu, NO₂, CF₃, CF₃O ve t-Bu süstitüentleri seçildi.

Öncelikle enzim aktif bölgesinin içine substrat eklenmeden tek seviye yarı deneysel PM3 yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirildi. Sırasıyla her bir p-süstitüe benzilamin türevi tek başına PM3 yöntemi ile optimize edildi. Daha sonra p-süstitüe benzilamin türevleri sırasıyla aktif bölgenin içinde benzilamin N-flavin C(4a) arasındaki 2.5-6 Å'luk reaksiyon yolunda 0.5 Å'luk adımlar ile flavine doğru yaklaştırılarak optimizasyonlar yapıldı. Bu optimizasyonlarda elde edilen enerji değerleri incelendiğinde her bir süstitüent için reaksiyon yolundaki minimum enerjiye sahip olduğu nokta belirlendi. Her bir süstitüent aktif bölgenin içinde tespit edilen minimum enerji noktalarında serbest bırakılarak optimize edildi. Yapılan bu optimizasyonlar ilk yapılan optimizasyonlara göre daha düşük enerji değerleri elde edildi.

Elde edilen değerler mevcut deneysel veriler ile karşılaştırıldı ve Yapı-Aktivite İlişkileri (SAR) kurulmaya çalışıldı. Enzim ile substratların bağlanma enerjileri (ΔE_b) hesaplandı, ΔE_b ile V_w (van der Waals hacmi), E_s (Taft sterik parametresi), π (lipofilik özellik sabiti), σ (elektronik süstitüent sabiti) ve deneysel $\log K_d$ korelasyonları araştırıldı. Tepkimelerin aktivasyon enerjileri ($\Delta E^\ddagger$) hesaplanmaya çalışıldı ve bunun σ ve deneysel k_{red} (flavin indirgenme hızı) ile korelasyonuna bakıldı.

III. 6. 4. P-Süstitüe Benzilamin Türevleri İle Yapılan Docking Çalışmaları

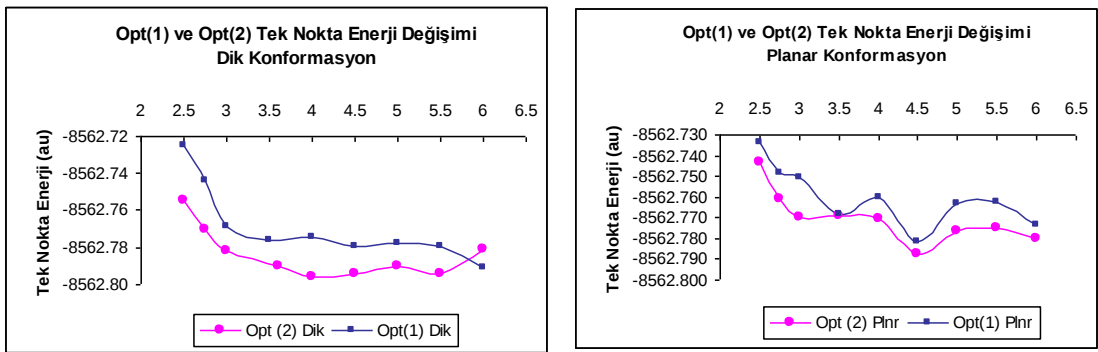
MAO A enziminin p-süstitüe benzilamin türleri ile yapılan deneysel çalışmaları [12] Polar Nükleofilik Mekanizma ile oldukça uyumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca, gaz fazında yapılan hesapsal çalışmalar da bu çalışmaları desteklemiştir [9]. Bu sebepler ile bu tez çalışmasının kapsamında p-süstitüe benzilamin analogları ile modelleme çalışmalarının yanında Docking çalışmaları da yapıldı. Öncelikle docking çalışmaları için enzimin x-ışını yapısındaki inhibitör silinerek işleme başlandı. Çalışılan substratlar sırasıyla p-X-benzilamin türevleri X: H, F, Cl, Br, I, Me, MeO, Et, EtO, I-Pro, N(CH₃)₂, n-Bu, NO₂, NH₂, CF₃, CF₃O, t-Bu, OH, COOH ve COH olmak üzere toplam 20 adet substitüent seçildi. Her bir substitüente önce Spartan programında [75] PM3 yarı deneysel yöntemiyle konformasyon taraması yapılarak en kararlı konformasyonları tespit edildi. Daha sonra AutoDock 4.2 programı [76] kullanılarak docking işlemi yapıldı. Docking işleminde flavin N5 merkez olarak kabul edilerek 70x70x70 Å³'lük bir hacimde substratlar için bağlanacakları bölge olarak tayin edildi. Docking işlemi sonucunda K_i ve E_{Binding} değerleri hesaplandı.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

IV.1. DOĞAL ENZİM HESAPLAMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Bölüm III.2.1’de anlatıldığı gibi doğal enzim optimizasyonlarında aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 aminoasitleri iki farklı yaklaşım ile donduruldu. İkinci yaklaşımda konformasyonel serbestlik dikkate alındı ve bu optimizasyonlar, tirozinlerin tamamen dondurulduğu birinci yaklaşımdan daha kısa zamanda gerçekleşti. Yapılan bu farklı iki tip optimizasyon sonucunda planar ve dik konformasyonlara ait elde edilen değerlere ait grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil IV.1). Birinci ve ikinci yaklaşımla yapılan optimizasyonların enerji grafikleri incelendiğinde, 1. optimizasyonlar, planar ve dik konformasyonların herikisi için yeni optimizasyonlara göre daha yüksek enerjili olarak bulundu. Bu veri aromatik kafesin konformasyonunun sterik olarak önem taşıdığını göstermektedir.

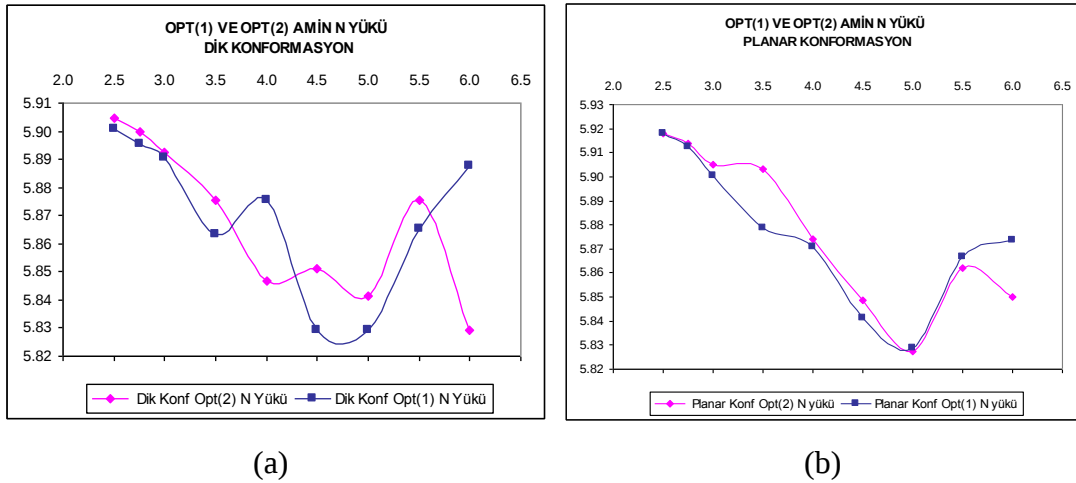


(a)

(b)

Şekil IV. 1. Opt(1) ve Opt(2) Optimizasyonlarında Enerji Değişimi: (a) Dik, (b) Planar Konformasyon

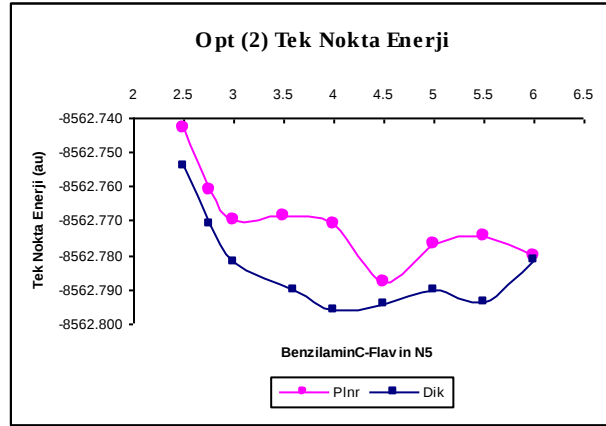
Tirozinlerin konformasyonlarının benzilaminin amin N'u üzerindeki etkisi de incelendi. Tirosin konformasyonlarının serbest bırakıldığı dik benzilamin optimizasyonlarında amin N'u üzerindeki kısmi negatif yükün 4.5 ve 6 Å dışındaki mesafelerde daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil IV. 2. a). Planar benzilaminin opt(2) hesaplamalarında amin N'u üzerindeki yük yoğunluğu tirozinlerin konformasyonel serbestliğinden etkilenmemektedir (Şekil IV. 2. b). Tablo III.1 incelendiğinde Tyr407 amino asidi benzilaminin dik veya planar konformasyona sahip olmasından 3-4°'lik bir açı kadar etkilenmesine karşın Tyr444 aminoasidi benzilamin konformasyonundan çok daha fazla etkilenmektedir. Bu Tyr407 aminoasidinin konformasyonunu korumasının bir nedeni olduğunu göstermektedir. Nedenlerden biri Tyr407 amino asidinin substrat ile daha fazla etkileşmesi ve bunun sonucunda konformasyonunu korumak istemesi olabilir. Planar konformasyonda amin N'u üzerindeki yük artışının fazla olmasının sebebi ise planar konformasyona sahip olan substrat ile Tyr407'nin aromatik halkasındaki π elektronları ile benzilamin H'i arasındaki H bağı etkileşimlerinden kaynaklanabilir.



Şekil IV. 2 Opt(1) ve Opt(2) Optimizasyonlarında Benzilamin Azotunun Elektron Yoğunluğunun Karşılaştırılması: a) Dik Konformasyon, b) Planar Konformasyon

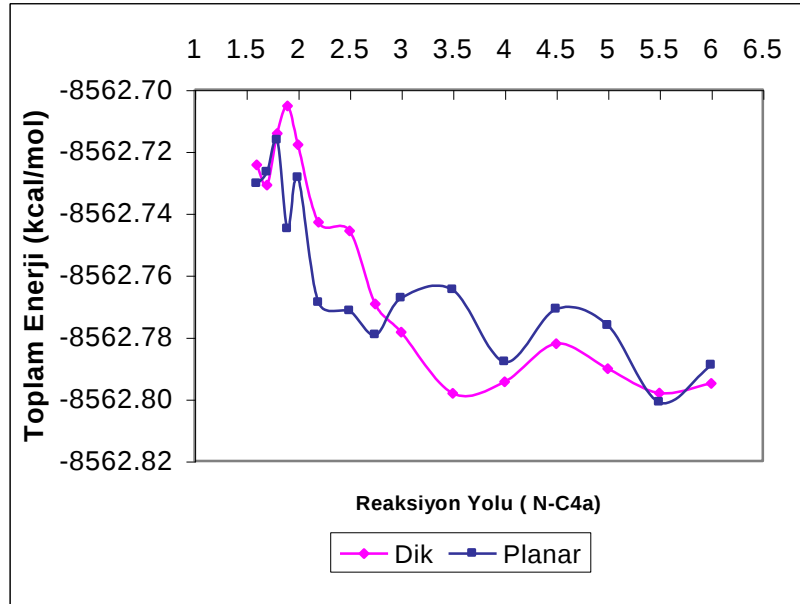
Yapılan bu optimizasyonlara göre, MAO A enziminde benzilamin substratının benzilamin α C-Flavin N(5) arasındaki reaksiyon yolunda dik konformasyonu planar konformasyondan daha kararlı olarak bulundu (Şekil IV. 3). MAO B enzimi için S. Erdem ve grubu tarafından yapılan [15] çalışmada benzilamin substratının planar konformasyonun daha kararlı olduğu bulunmuştur. MAO A'nın ve MAO B'nin x-

ışını yapılarına bakıldığında, MAO A'nın aktif bölgesinin şeklinin MAO B'nin aktif bölgesinden farklı olduğu görülmektedir. MAO A'da benzilaminin hareket ettiği reaksiyon yolunun daha kısa ve geniş olmasına karşın MAO B'deki reaksiyon yolu daha uzun ve dardır [3]. İki enzimdeki benzilaminin kararlı konformasyonunda görülen bu değişikliğin sebebinin aktif bölgelerindeki yapısal farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil IV. 3 Planar veya Dik Benzilamin İçeren MAO A Enziminin Benzilamin α C-Flavin N(5) Reaksiyon Yolu Boyunca Olan Enerji Değişimi

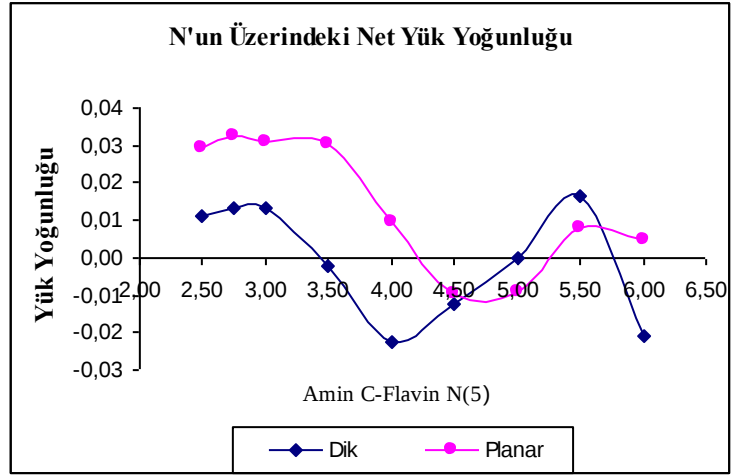
Tirozin halkalarına konformasyonel serbestlik verilerek yapılan hesaplamalar, benzilaminin N atomu ve flavinin C(4a) atomu arasındaki mesafe değiştirilerek tekrarlanmıştır. Benzilamin N-flavin C(4a) arasındaki reaksiyon yolunda aromatik kafesin dışında dik konformasyonun genellikle kararlı olduğu, aromatik kafesin etkisine girdiği ve flavine doğru yaklaştığı 3.0 Å'dan yakın mesafelerde substratın planar konformasyonun kararlı olduğu bulunmuştur (Şekil IV. 4).



Şekil IV. 4 Planar ve Dik Benzilamin İçeren MAO A Enziminin Benzilamin N-Flavin C(4a) Reaksiyon Yolu Boyunca Olan Enerji Değişimi

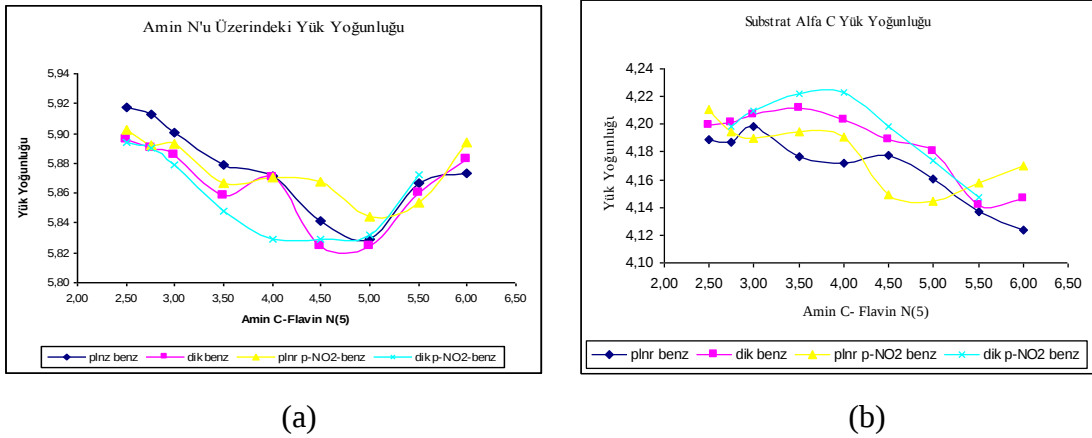
IV.1.1. Aromatik Kafesin Amin Azotu Üzerindeki Etkisi

Benzilamin flavine doğru ilerlerken amin α C-flavin N(5) mesafesi yaklaşık $3.5\text{\AA}$ olduğunda aromatik kafesin etkisine girmektedir. Benzilamin N'u üzerindeki elektron yoğunluğu izlendiğinde (Şekil IV. 2) $4\text{\AA}$ 'dan başlayarak hızlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Substratın flavin halkasına yaklaşmasının da elektron yoğunluğunu değiştirebileceği fikrinden yola çıkılarak, flavinin etkisi eşitlik III.11 kullanılarak ortadan kaldırılmıştır. Amin N'u üzerindeki net yük değişimine bakıldığında (Şekil IV. 5) ise $3.5\text{\AA}$ 'a kadar değişkenlik gösterdiği ancak $3.5\text{\AA}$ 'da artış gösterdiği ve flavine yaklaşırken hemen hemen sabit kaldığı görülmektedir. Amin azotu üzerindeki net yük hesaplanması Bölüm III. 2. 1. 7'de anlatıldığı gibi eşitlik III. 12'ye göre doğrudan aromatik kafesi oluşturan tirozin aminoasitlerinin etkilerini göstermektedir. Bu sonuçlardan hareketle amin N'unun üzerindeki yük değişiminin sebebi aromatik kafese bağlanabilir. Ayrıca, benzilamin azotunun elektron yoğunluğu üzerinde aromatik kafesin etkisinin planar konformasyonda daha fazla olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil IV. 5 Benzilamin Azotu Üzerindeki Net Yük Yoğunluğu

p-NO₂ benzilamin ve benzilamin substratlarının optimizasyon sonuçları karşılaştırıldığında Şekil IV. 6'daki grafikler elde edilmiştir.



(a)

(b)

Şekil IV. 6 p-NO₂ Benzilamin ve Benzilamin Substratlarının Yük Yoğunluklarının Karşılaştırılması: a) N atomu üzerinde, b) α C atomu üzerinde

MAO A enziminde substratın amin azotu üzerindeki elektron yoğunluğu;

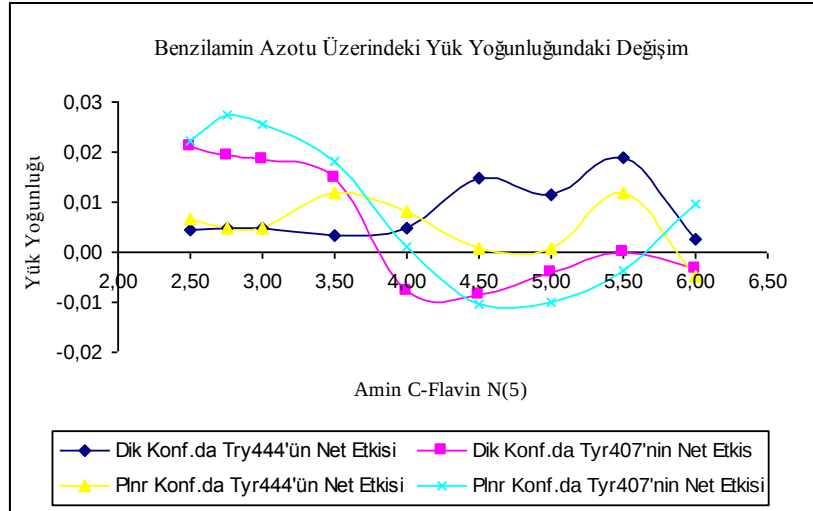
Planar benzilamin>Planar p-NO₂ benzilamin>Dik benzilamin>Dik p-NO₂ benzilamin

şeklindedir. S. Erdem ve grubu tarafından MAO B için benzilamin ve p-NO₂ benzilamin substratları ile yapılan çalışmada [15] amin N'u üzerindeki elektron yoğunluğunun sıralaması;

Planar p-NO₂ benzilamin > Dik p-NO₂ benzilamin > Planar benzilamin > Dik benzilamin

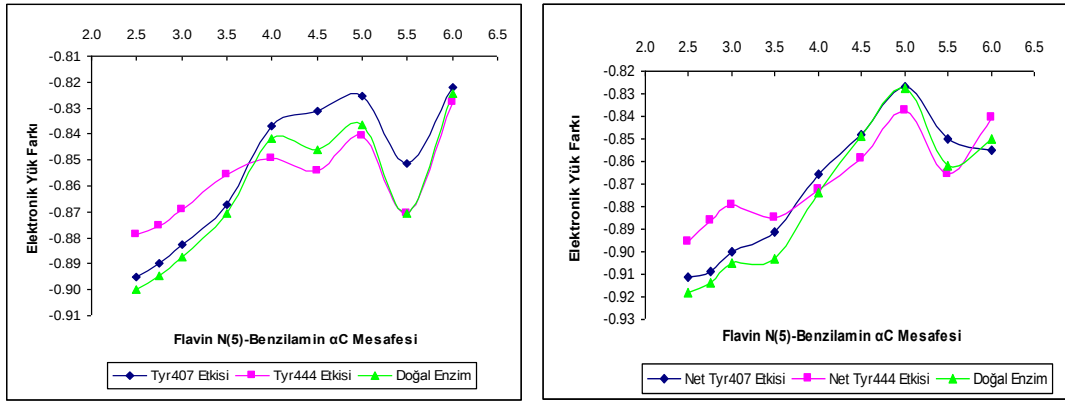
olarak bulunmuştur. -NO₂ grubu kuvvetli elektron çeken bir gruptur. Planar konformasyonda -NO₂ grubunun azotu ile benzen halkası delokalizasyona izin vererek halkadan daha çok elektron çekilmesi ve indüktif etki ile benzilaminin αC atomunun elektron yoğunluğunu azaltması beklenir. Ancak sıralamaya bakıldığında MAO B'nin aksine MAO A'da planar ve dik konformasyonların her ikisinde de benzilamin substratındaki amin azotunun elektron yoğunluğu daha fazladır. Bu durum amin azotunun elektron yoğunluğunu etkileyen aromatik kafesin her iki enzimde farklı derecede etki yaptığı sonucunu akla getirmektedir.

Benzilamin azotunun elektron yoğunluğundaki artışta aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerinin net etkilerini eşitlik III.11'deki denklem ile ayrı ayrı hesaplanmasından elde edilen değerlere ait grafik Şekil IV. 7'de görülmektedir. Şekil IV. 7 incelendiğinde, benzilaminin aromatik kafesin etkisine girdiği 3.5Å ve daha yakın mesafede Tyr407 planar ve dik konformasyonların her ikisinde de amin azotundaki yük yoğunluğunu daha çok arttırmıştır.



Şekil IV. 7 Benzilamin N'u Üzerindeki Net Yük Değişimi

Aşağıda Şekil IV. 8'de verilen grafikte amin N'u üzerindeki elektron yükünün planar ve dik konformasyonlar için ayrı ayrı doğal enzimdeki amin N'u üzerindeki elektron yüküne karşı değişimini göstermektedir.



Şekil IV. 8 Benzilamin N'u Üzerindeki Yüklerin Kıyaslanması

Yukarıdaki grafikler incelendiğinde amin N'u üzerindeki yük artışının

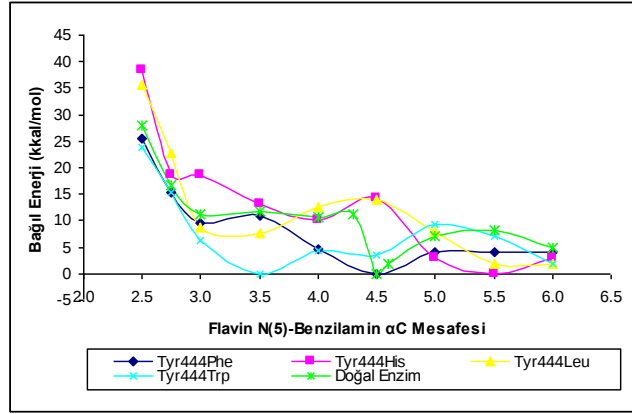
Doğal Enzim>Tyr407 Etkisi>Tyr444 Etkisi

şeklinde değiştiği görülmektedir. Bu sonuç yukarıdaki Şekil IV.7'de gösterilen grafikler ile uyumludur. Doğal enzim yapısında Tyr407 ve Tyr444'ün birlikte olması amin N'u üzerindeki yük artışının en çok olması gerektiğini tahmin ettirmektedir ki bu grafik bu fikri doğrulamaktadır. Tyr407'nin etkisinin Tyr444'e göre daha fazla olduğu yukarıda Şekil IV. 8'de verilen grafiklerde gösterilmiştir.

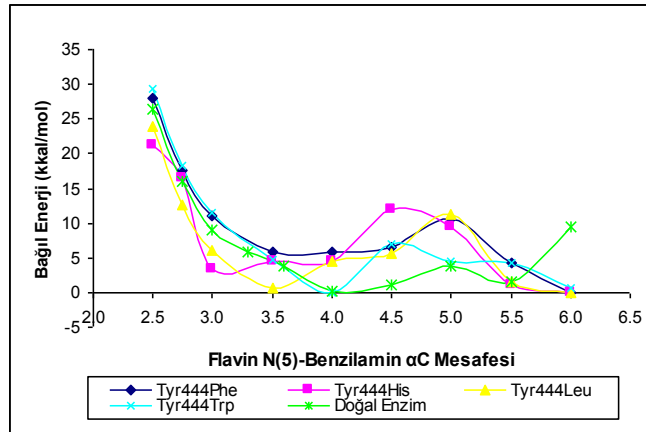
IV.2. MUTASYON ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

MAO A için yapılan mutasyon çalışmaları aromatik kafesi oluşturan Tyr444 için 4 farklı, Tyr407 amino asidi için ise 2 farklı aminoasit ile yapıldı ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçların doğal enzime karşı grafikleri çizildi.

Tyr444 mutantlarının planar ve dik konformasyonları için elde edilen optimize yapılar HF/6-31G* yöntemi ile yapılan tek nokta enerji grafikleri şekilde verilmiştir (Şekil IV.9 ve IV.10). Dik konformasyonun enerjisinde, 3.5-6.0 Å arasında, mutasyona bağlı bazı iniş çıkışlar görülmekte ancak flavine yaklaştıkça enerjiler yakın değerlerde seyretmektedir. Planar konformasyonun enerjisinde ise daha dikkat çekici değişimler gözlemlenmiştir.



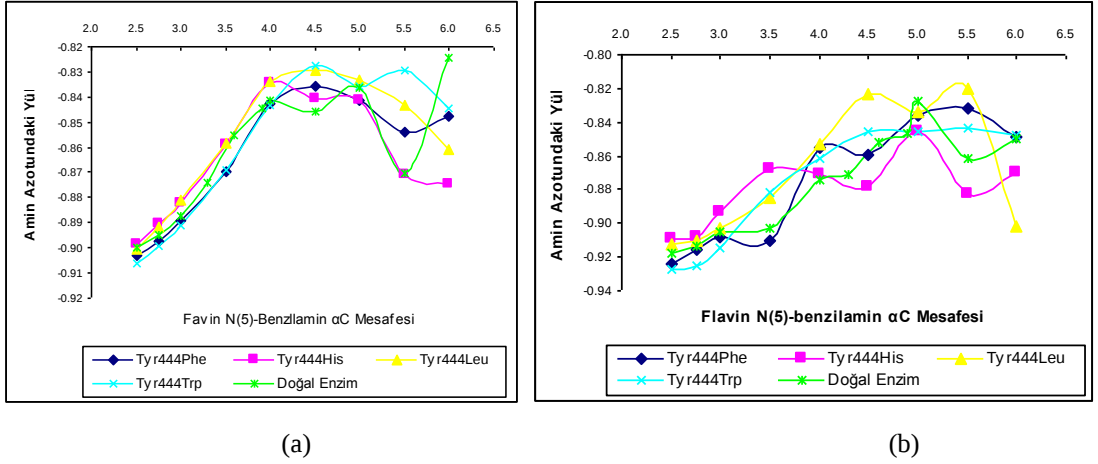
Şekil IV. 9 İnsan MAO A'sının Aktif Bölgesinde Doğal Enzim ve Tyr444 Mutant Enzimlerinin Benzilaminin Planar Konformasyonu İçin Enerji Değişimi: Enerjiler en düşük enerji noktalarına göre verilmiştir. En düşük enerji noktaları: (a) Tyr444Phe 4.5 Å, -8487.9297006 au (b) Tyr444His 5.5 Å, -8482.04213693 au. (c) Tyr444Leu 6 Å - 8375.48595844 au. (d) Tyr444Trp 3.5 Å, -8618.6801875 au. (e) Doğal enzim 4.5 Å, -8562.7877161 au.



Şekil IV. 10 İnsan MAO A'sının Aktif Bölgesinde Doğal Enzim ve Tyr444 Mutant Enzimlerinin Benzilaminin Dik Konformasyonu İçin Enerji Değişimi: Enerjiler en düşük enerji noktalarına göre verilmiştir. En düşük enerji noktaları: (a) Tyr444Phe 6Å, -8487.94273359 au (b) Tyr444His 6Å, -8482.04011494 au. (c) Tyr444Leu 6Å - 8375.49304797au. (d) Tyr444Trp 4Å, -8618.69274101 au. (e) Doğal enzim 4Å, -8562.79577376 au.

Benzer bir davranış amin azotunun elektronik yük değişiminde gözlenmektedir (Şekil IV. 11). Bu bilgi gösteriyor ki substratın planar konformasyonu flavine doğru olan hareketi boyunca yakınındaki aminoasitlerden dik konformasyona oranla daha

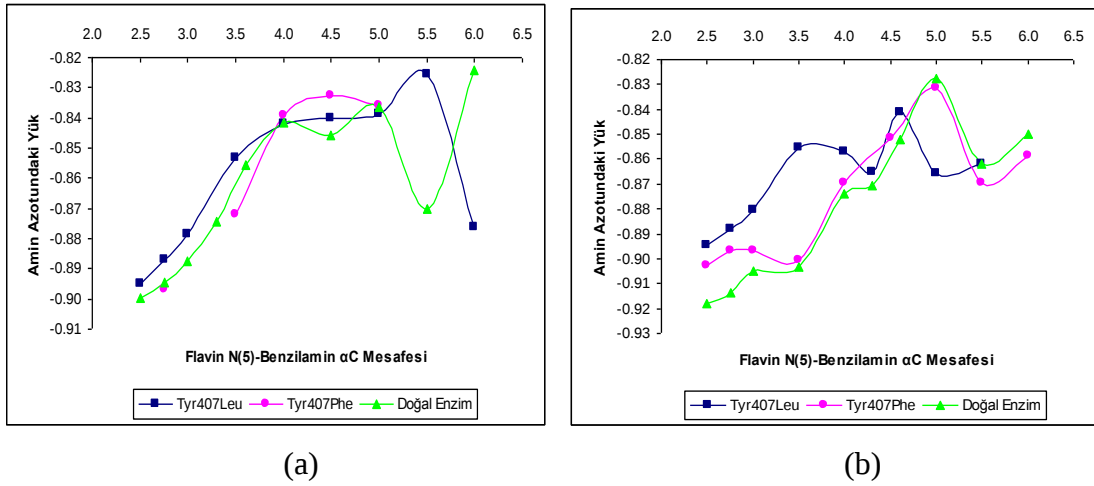
fazla etkilenmektedir. Elektronik özelliklerdeki bu değişimlerin sonucu olarak planar konformasyon için mutasyonların etkilerini analiz etmek güçtür. Dik konformasyon için tüm Tyr444 mutant proteinleri ve doğal enzim, NH/ π etkileşimlerinin etkisinin başladığı 4 Å'dan daha yakın mesafelerde amin azotunun negatif yükünde hızlı bir artış gösterir. Tyr444 mutant proteinleri için ise, 2.5-4 Å arasında, elektronik yükteki değişimin şiddeti doğal enzimdeki gibi oldukça nettir. Böylece anlaşıyor ki Tyr444 mutasyonu amin azotundaki yük dağılımını pek etkilememektedir. Bununla beraber amin azotunun yükünde aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 arasında iken net bir artış olduğu görüldüğünden, amin yükündeki bu artışa Tyr407 amino asidinin neden olduğu düşünülebilir. Bu tahminin doğruluğunu araştırmak ve Tyr407'nin rolünü test etmek amacıyla, Tyr407 mutant çalışmaları yapıldı.



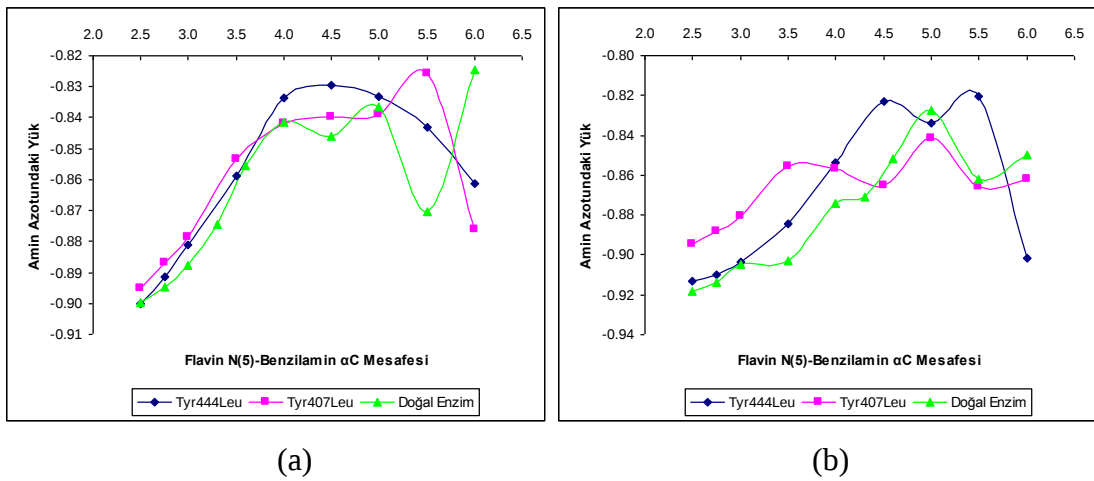
Şekil IV. 11 Tyr444 Mutant Enzimlerinde Amin Azotundaki Mulliken Yüğü (a) Dik Konformasyon (b) Planar Konformasyon.

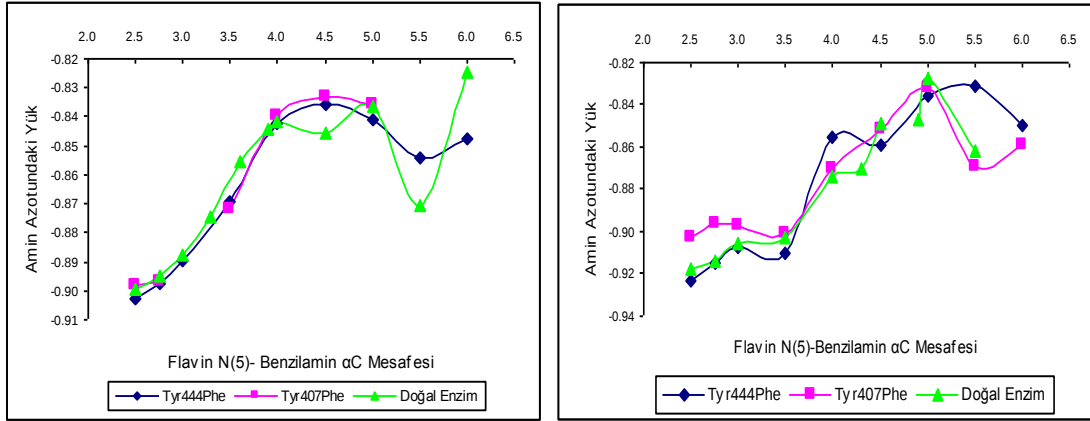
Lösin alifatik izopropil yan zincirine sahip ve tirozine kıyasla tamamen farklı elektronik yapıya sahiptir. Böylelikle, aromatik halkanın etkisini değerlendirme dışı bırakmak için lösin mutasyonu yapmak mantıklı bir seçimdir. Şekil IV.12.a ve IV.12.b'de MAO A doğal enzimindeki amin yükü Tyr444Leu ve Tyr407Leu mutant enzimlerinin planar ve dik konformasyonlarındaki amin yükü ile karşılaştırıldı. Yaklaşık 4 Å'dan daha yakın mesafelerde aromatik kafesin etkisinin altındaki amin grubu Tyr444Leu mutant enziminin amin yükündeki artış doğal enzimdekine benzerdir. Çünkü Tyr444Leu mutant enzimindeki tirozin halkası sadece Tyr407'dir. Bu gözlem amin nükleofilliğindeki artışa Tyr444'ten ziyade Tyr407'nin sebep olduğunu işaret etmektedir. Buna paralel olarak Tyr407Leu mutant enzimindeki

negative amin yükündeki artışın şiddeti doğal enzim MAO A ve Tyr444Leu mutant enzimleri ile karşılaştırıldığında daha küçüktür. Bu davranış planar benzilamin konformasyonunda daha belirgindir, çünkü Şekil IV.13'te görüldüğü ve Şekil IV.12'de desteklendiği gibi aromatik kafesin etkisi planar konformasyonda daha fazladır. Planar konformasyon için Tyr407Leu'in amin negatif yükündeki artış doğal enzim MAO A'dan 0.02 au düşük iken Tyr444Leu'de ise 0.0005 au daha düşüktür (Şekil IV. 13. b). Diğer taraftan dik konformasyon için karşılık gelen değerler çok yakındır (0.006 au) (Şekil IV. 13. a).



Şekil IV. 12 Tyr407Leu ve Tyr407Phe Mutasyonlarında Benzilamin N'undaki Yük Değişimleri: (a) Dik Konformasyon, (b) Planar Konformasyon





(c)

(d)

Şekil IV. 13 Lösin ve Fenilalanin İle Yapılan Mutasyonlarda Tyr444, Tyr407 ve Doğal Enzimdeki Amin N’undaki Yük Değişimlerinin Karşılaştırılması: (a) Lösin mutasyonu dik konformasyon, (b) Lösin mutasyonu planar konformasyon, (c) Fenilalanin mutasyonu dik konformasyon, (d) Fenilalanin mutasyonu planar konformasyon.

IV.3. MEKANİZMA MODELLEMELERİNDEN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

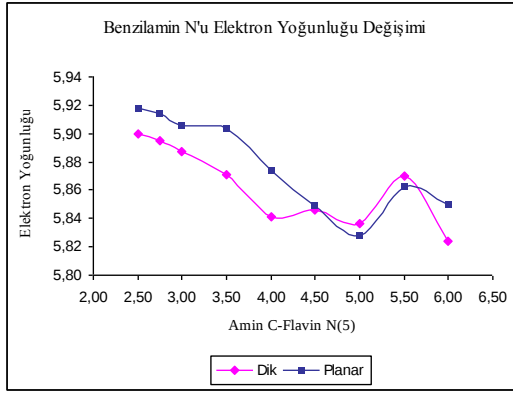
Bölüm III’te anlatıldığı gibi bu tez çalışmasında özellikle Polar Nükleofilik Mekanizma hesapsal yöntemlerle detaylı olarak incelenerek destekleyici veya karşıt deliller bulunmaya çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda ilgili başlıklar halinde verildi.

IV. 3. 1. ONIOM(HF:PM3:UFF) Sonuçlarının Polar Nükleofilik Mekanizma İle İlişkisi

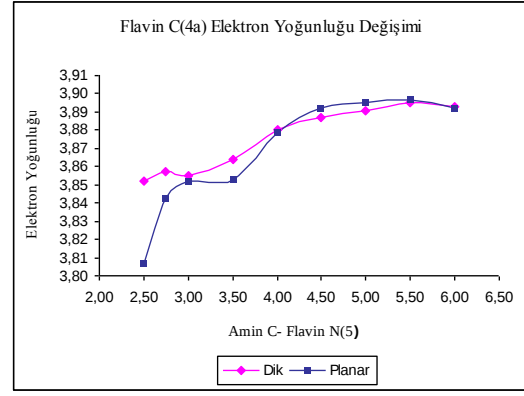
MAOA enziminin literatürde belirtilen aktif bölgesinin tamamının hesaplamalara dahil edildiği ONIOM(HF:PM3:UFF) yöntemi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda veriliştir.

Edmondson ve grubu tarafından önerilen ve Şekil I.1’de verilen Polar Nükleofilik Mekanizmaya göre, benzilaminin amin N’u nükleofil olarak flavin C(4a)’ya saldırır. C(4a) ve N(5) arasındaki çift bağ N(5) üzerine açılarak flavin N(5)’in nükleofilik karakterini artırır ve benzilaminin pro-R α -hidrojenini almasını kolaylaştırır. Böylece kovalent bağlı bir ara ürün oluşur. Benzilamin α C-flavin N(5) doğrultusu için yapılan enerji hesaplamalarının sonucunda mekanizma için önemli

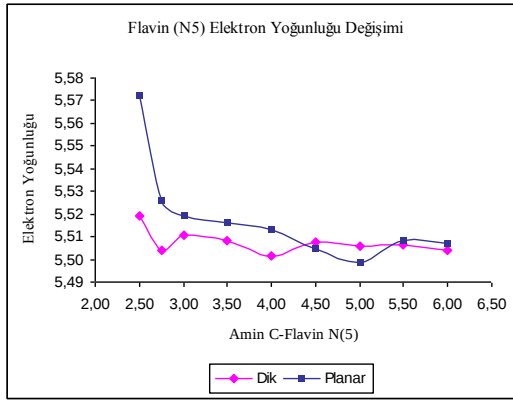
olan atomlardaki elektron yoğunlukları Şekil IV. 14'de, benzilamin N-flavin C(4a) doğrultusu için elde edilen sonuçlar ise aşağıda Şekil IV. 15'de verilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde benzilaminin flavine yaklaşmasıyla, amin N'unun ve flavin N(5)'in nükleofilik ve flavin C(4a)'nın elektrofilik karakterinin arttığı görülmektedir. Bu veri polar nükleofilik mekanizma ile uyumludur. Şekil IV. 14 (d)'de verilen pro-R α -H yükü grafiği incelendiğinde flavine yaklaştıkça elektron yoğunluğunda azalma olduğu görülmektedir. Ancak yük yoğunluğunun C(4a)'ya yaklaştıkça doğrusal bir artış göstermemesinin sebebi elde edilen yük değerlerinin amin α -C-flavin N(5) mesafesindeki optimizasyonlara ait olmasıdır. Bu doğrultuda ilerleyen benzilamin substratının pro-R α -H'i, N(5)'e bağlanacak uygun geometride değildir. Şekil IV. 14(d)'deki pro-R α -H yük grafiği incelendiğinde, 3.5 Å'dan kısa mesafede N(5)'e yaklaştıkça H'in yük yoğunluğunda bir azalmanın olduğu görülmektedir. Şekil IV.15'de verilen amin N-flavin C(4a) reaksiyon yolu optimizasyon sonuçlarının verildiği grafiklerde mesafe 2.2 Å olduğunda amin N'u, flavin C(4a) ve N(5) üzerindeki yük yoğunlukları maksimuma ulaşmıştır. 2.2 Å'dan daha yakın mesafeye gelindiğinde yük yoğunluklarının azaldığı görülmektedir. Bu veriler ile amin azotu üzerindeki elektron çiftinin flavin C(4a)'ya verilmeye ve flavin C(4a)-N(5) arasındaki çifte bağı N(5) üzerine açılmaya başladığını, böylece kovalent bağlı bir ara ürün oluştuğu bilgilerine ulaşılmaktadır. 2.2 Å'dan daha yakın mesafelerde ise pro-R hidrojeninin yükünde hızlı bir artış görülmektedir. Polar nükleofilik mekanizmada kovalent bağlı bir ara ürün oluşumuyla N(5)'in üzerinde nükleofilik yük artışının sağlanması sonucunda benzilamin pro-R α -H'ine saldırısının gerçekleşeceği önerilmektedir. Bu mekanizmaya göre pro-R α -H'indeki pozitif yükün 2.2 Å'dan flavine doğru yaklaştıkça hızlı bir şekilde artması beklenen bir sonuçtur. Elde edilen bu sonuçlara göre Polar Nükleofilik Mekanizma, önerilen reaksiyon yolu için yapılan optimizasyon sonuçları tarafından desteklenmektedir.



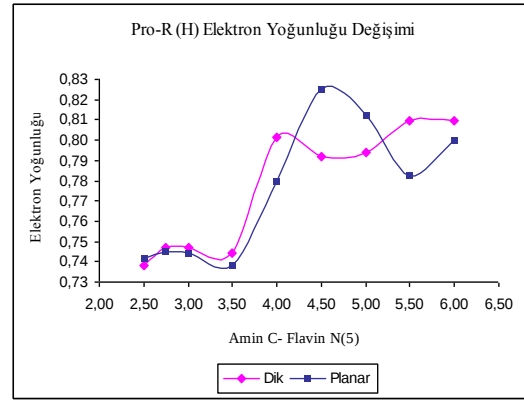
(a)



(b)

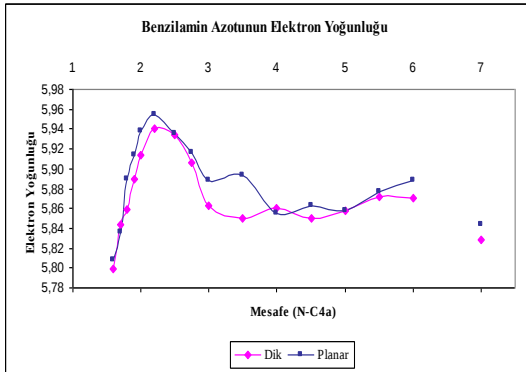


(c)

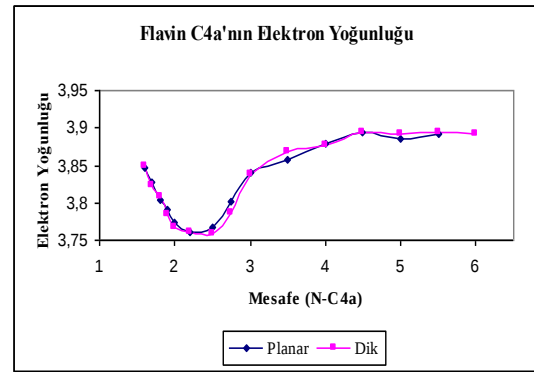


(d)

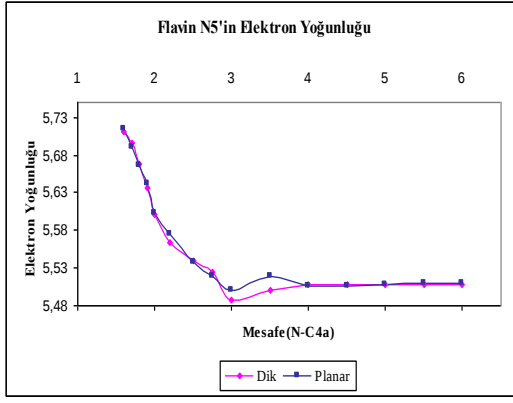
Şekil IV. 14 Amin α C-flavin N(5) Doğrultusunda a) Benzilamin N, b) Flavin C(4a), c) N(5) ve d) Pro-R α -H Yük Yoğunlukları



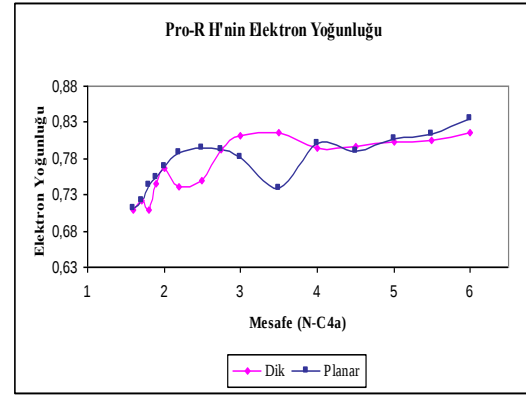
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil IV. 15 Amin N-flavin C(4a) Doğrultusunda a) Benzilamin N, b) Flavin C(4a), c) N(5) ve d) Pro-R α -H Yük Yoğunlukları

IV.3.2. Aktif Bölge İçinde Polar Nükleofilik Mekanizmanın Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar

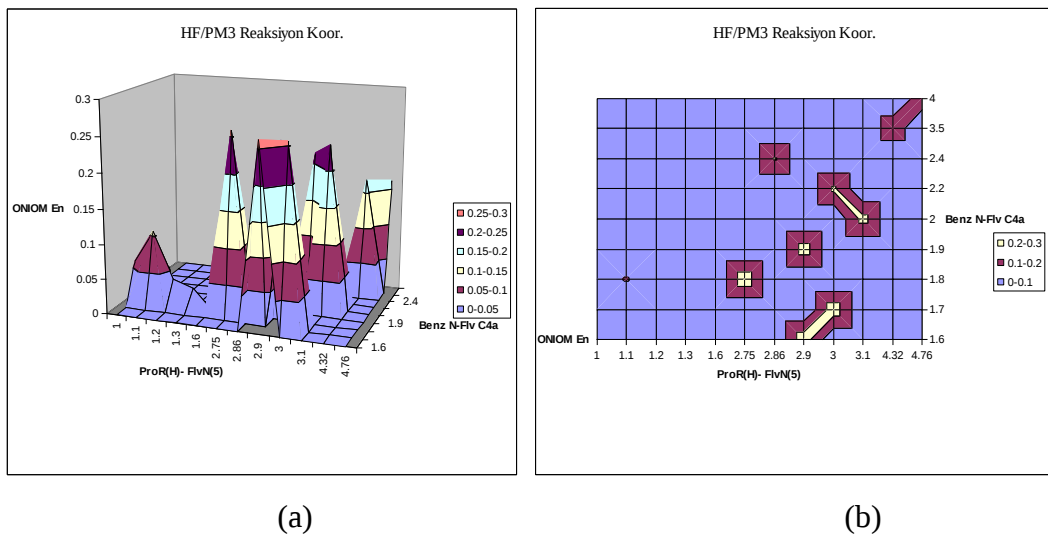
Enzimimizin aktif bölge yapısı iki seviye ile modellenerek mekanizma çalışmaları yapıldı. ONIOM(PM3:UFF) ve ONIOM(PM6:UFF) yöntemleri ile Polar Nükleofilik Mekanizmanın modellenmesinden elde edilen optimize yapılar HF/6-31G* ile tek nokta enerji hesabı yaptırılarak elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo IV.1.'de verilmiştir. Her iki ONIOM çalışmasında yüksek seviye için kullanılan farklı iki yarı deneysel yöntem ile Polar Nükleofilik Mekanizmaya ait iki geçiş konumu da elde edilebilmiştir. Tablo IV. 1'da görüldüğü gibi PM3/UFF yöntemi ile yapılan hesaplama birinci aktivasyon enerjisini çok yüksek bulurken PM6/UFF yöntemi ile yapılan hesaplamada elde edilen birinci aktivasyon enerjisi küçük model yapılar ile daha yüksek seviye yöntemlerden elde edilen değerler ile uyumludur. Bu sonuç ONIOM(PM6:UFF) yönteminin aktif bölgenin dahil edildiği mekanizma çalışması için uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Tablo IV. 1 ONIOM(PM3:UFF) ve ONIOM(PM6:UFF) Yöntemleri İle Reaksiyon Yolu Taranarak Elde Edilen Aktivasyon Enerjileri (kcal/mol)

	Akt. En. 1	Akt. En.2
PM3:UFF	70.188	19.772
PM6:UFF	47.746	17.420

IV.3.2.1. ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranmasından Elde Edilen Sonuçlar

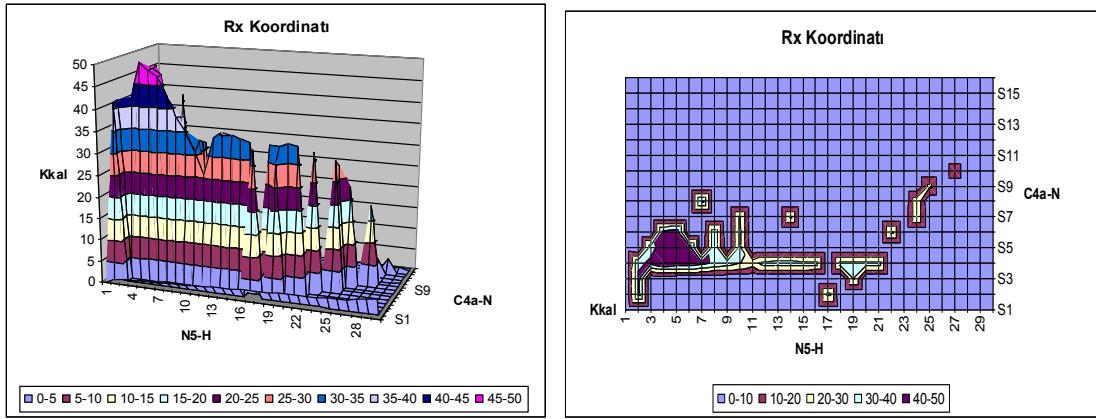
Bölüm III. 4. 1. 3.'te anlatıldığı gibi ONIOM(HF:PM3) yöntemi ile reaksiyon yolu taraması yapıldı. Aşağıda Şekil IV.16'da verilen grafik incelendiğinde benzilamin N-flavin C4a arasındaki reaksiyon yolunda $1.7\text{\AA}$ 'da bir tepe noktası bulunduğu ve ProR α H-flavin N(5) arasında reaksiyon yolunda ise $1.3\text{\AA}$ 'da ise daha yüksek bir tepe noktası bulunduğu gözlemlenmiştir, bu nokta polar nükleofilik mekanizmaya dair birinci geçiş konumu geometrisi olarak tayin edilmiştir. Elde edilen bu sonuç küçük model (flavin + benzilamin) yapılar ile geçiş konumu optimizasyonu yapıldığında elde edilen geometri sonuçları ile uyumludur.



Şekil IV. 16 ONIOM(HF:PM3) Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması (a) Üç boyutlu, (b) İki boyutlu enerji grafikleri

IV.3.2.2. PM3 Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranmasından Elde Edilen Sonuçlar

Bölüm III. 4. 1. 4'te anlatıldığı gibi benzilamin N-flavin C(4a) arasındaki reaksiyon yolu aktif bölgenin tamamından oluşan tek seviye PM3 yöntemil ile tarandı. Her bir optimizasyon sonucuna HF/6-31G* yöntemi ile tek nokta enerji hesabı yaptırıldı. Elde edilen enerji değerleri ile aşağıda Şekil IV. 17'de verilen üç ve iki boyutlu grafikler çizildi.



(a)

(b)

Şekil IV.17 PM3 Yöntemi İle Reaksiyon Yolunun Taranması (a) Üç boyutlu, (b) İki boyutlu enerji grafikleri

Aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi aktif bölgenin tamamına uygulanan PM3 yöntemi aktivasyon enerjisini ONIOM(HF:PM3) yöntemine göre yaklaşık 2 kcal kadar düşük bulmuştur. PM3 yöntemi ile belirlenmeye çalışılan geçiş konumu geometrisinde benzilamin substratının amin azotu ile flavin C(4a)'nın arasındaki mesafe 1.7 Å, pro R H'i ile flavin N(5) arasındaki ise 1.2 Å'dur. ONIOM(HF:PM3) yöntemi ile tespit edilen geçiş konumu geometrisinde ise amin N'u-flavin C(4a) mesafesi 1.7 Å, pro R H-flavin N(5) mesafesi 1.3 Å'dur. S. S. Erdem'in gaz fazı PM3 hesaplamalarında ise geçiş konumunu geometrisinde amin azotu-flavin C(4a) mesafesi 1.73 Å, pro R H-flavin N5 mesafesi ise 1.32 Å olarak tespit edilmiştir [9]. Elde edilen ve literatürdeki sonuçlar birbiri ile uyumludur.

Tablo IV. 2 ONIOM(HF:PM3) ve Tek Seviye PM3 Yöntemi ile Hesaplanan Polar Nükleofilik Mekanizma'ya ait Akt. En. 1 değerleri (kcal/mol)

Model	Akt. En.1 (kcal/mol)
ONIOM(HF:PM3)	47.666
PM3	45.905

IV.3.3. Model Yapılar İle Mekanizma Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar

Literatürde önerilen mekanizmalardan öne çıkan Polar Nükleofilik ve Hidrür Mekanizmalar Bölüm III. 4. 2’de anlatıldığı gibi çeşitli model yapılar ile çalışıldı. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ilgili yöntemlere göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir.

IV. 3. 3. 1. PM3 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

PM3 ile yapılan mekanizma modellemelerinde dört model yapı optimizasyonundan elde edilen değerler Tablo IV. 3’te toplu olarak verilmiştir.

Tablo IV. 3 Polar Nükleofilik Mekanizmanın PM3 İle Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar

Model Yapılar		Giren(au)	TS1(au)	Akt1/kcal	Add(au)	TS2(au)	Akt2/kcal	Ürün(au)
E+ZPE								
Flv+Benz		0.36001	0.43238	45.4	0.41448	0.41861	2.6	0.37208
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444		0.57892	0.65022	44.7	0.63848	0.64467	3.9	0.58655
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352		0.728146	0.80261	46.7	0.77656	0.78556	5.7	0.72642
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352+Tyr69		0.81161			0.69035			0.84069
ΔG		Giren(au)	TS1(au)	Akt1/kcal	Add(au)	TS2(au)	Akt2/kcal	Ürün(au)
Flv+Benz		0.29471	0.37684	51.5	0.35715	0.36167	2.8	0.31417
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444		0.48896	0.56695	48.9	0.55304	0.56134	5.2	0.49864
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352		0.62741	0.70832	50.7	0.68214	0.69826	10.1	0.62322
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352+Tyr69		0.70041			0.564153			0.729511

Bölüm III. 4. 2. 1’de izah edilen 79 ve 140 ağır atom içeren model yapıların optimizasyonlarından elde edilen sonuçlar Tablo IV. 4’te verilmiştir. 79 ağır atom içeren model yapıların sonuçları incelendiğinde flavinin *re*-yüzünde H₂O moleküllerinin varlığı, substrat ve aromatik kafesi oluşturan aminoasitler ile H bağı yapması Polar Nükleofilik Mekanizmanın aktifleşme enerjisini yaklaşık 10 kcal kadar artmıştır. Bu sonuç bize aktif bölge içindeki H₂O moleküllerinin Polar Nükleofilik Mekanizma üzerinde kolaylaştırıcı bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Tablo IV. 4 Polar Nükleofilik Mekanizmanın PM3 Yöntemi İle 79 ve 140 Atomlu Model Yapılarından Elde Edilen Sonuçlar

Model Yapılar	Giren Komp (au)	TS1 (au)	Akt1 (kcal)	Add (au)	TS2(au)	Akt2 (kcal)	Ürün (au)
E+ZPE							
79 Atom	0.66192	0.730213	42.8	0.717689	0.715753	-1.2	0.685262
79 Atom+8H₂O	0.115982	0.199599	52.5	0.174049			0.105703
140 Atom	1.211985			1.267591			1.21904
ΔG	Giren Komp (au)	TS1 (au)	Akt1 (kcal)	Add(au)	TS2(au)	Akt2 (kcal)	Ürün (au)
79 Atom	0.52187	0.59367	45.1	0.57899	0.5767	-1.4	0.546395
79 Atom+8H₂O	-0.0555	0.03134	54.5	0.0044			-0.05665
140 Atom	0.98407			1.03384			0.991866

IV. 3. 3. 2. PM6 Yöntemi İle Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

Yarı deneysel PM6 yöntemi ile dört farklı model çalışması yapıldı, elde edilen değerler Tablo IV. 5’te verilmiştir. Elde edilen değerler aynı zamanda iki farklı yarı deneysel yöntemin kıyaslanmasını sağladığı için de önem taşımaktadır.

Tablo IV. 5 Polar Nükleofilik Mekanizmanın PM6 ile Modellenmesinden Elde Edilen Sonuçlar

Model Yapılar							
E+ZPE	Giren Komp (au)	TS1(au)	Akt1(kcal)	Add(au)	TS2(au)	Akt2(kcal)	Ürün(au)
Flv+Benz	0.346376	0.39716	31.9	0.38008	0.38109	0.6	0.3249
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444	0.46656	0.58628	75.	0.33843	0.4087	44.1	0.48276
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352	0.597643	0.69594	61.7	0.48711	0.54067	33.6	0.61434
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352+ Tyr69	0.647024	0.69836	32.2	0.48412			0.65129
ΔG	Giren Komp (au)	TS1(au)	Akt1(kcal)	Add(au)	TS2(au)	Akt2(kcal)	Ürün(au)
Flv+Benz	0.283031	0.34137	36.6	0.32344	0.32424	0.5	0.26976
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444	0.381385	0.50378	76.8	0.24438	0.32632	51.4	0.39948
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352	0.499559	0.59864	62.2	0.38478	0.44486	37.7	0.52023
Flv+Benz+Tyr407+Tyr444+Phe352+ Tyr69	0.537068	0.59018	33.3	0.363878			0.53919

H₂O'lu Polar Nükleofilik Mekanizma çalışmasında oluşturulan tüm model yapılar için elde edilen değerler aşağıda Tablo IV. 6 ve Tablo IV. 7'de toplu olarak verilmiştir.

Tablo IV. 6 PM3 Yöntemi İle Optimizasyonu Yapılan H₂O’lu Polar Nükleofilik Mekanizma İçin Elde Edilen E+ZPE Değerleri

	Model Yapılar									
	E+ZPE	Giren Komp (au)	TS1(au)	Akt1(au)	Akt1(kcal)	Add(au)	TS2(au)	Akt2(au)	Akt2(kcal)	Ürün(au)
93	Flv+Benz+H ₂ O	0.266098	0.353980	0.087882	55.1	0.319458	0.322420	0.002962	1.9	0.273636
	Flv+Benz+Tyr444+Tyr407+H ₂ O	0.481265	0.556910	0.075645	47.5	0.471930	0.575714	0.103784	65.1	0.521519
	Flv+Benz+Tyr444+Tyr407+ Phe352+H ₂ O	0.651490	0.737752	0.086262	54.1	0.701819	0.705928	0.004109	2.6	
	Flv+Benz+Tyr444+Tyr407+ Phe352+H ₂ O /12 atom redundant	0.511748	0.604928	0.09318	58.5	0.570217	0.573009	0.002792	1.7	0.546540
	79 Atom+H ₂ O	0.568823	0.684922	0.116099	72.8	0.652323	0.662694	0.010371	6.5	0.632472
	79 Atom+7H ₂ O+H ₂ O	0.113327				0.169				0.140495
	140 Atom +H ₂ O	1.149369				1.167165				1.126331

Tablo IV. 7 PM3 Yöntemi İle Optimizasyonu Yapılan H₂O’lu Polar Nükleofilik Mekanizma İçin Elde Edilen ΔG Değerleri

Model Yapılar									
ΔG									
	Giren Komp (au)	TS1(au)	Akt1(au)	Akt1(kcal)	Add(au)	TS2(au)	Akt2(au)	Akt2(kcal)	Ürün(au)
Flv+Benz+H ₂ O	0.198270	0.299722	0.101452	63.7	0.263975	0.263451	-0.000524	-0.3	0.212339
Flv+Benz+Tyr444+Tyr407+H ₂ O	0.385722	0.473155	0.087433	54.9	0.384781	0.484809	0.100028	62.8	0.426898
Flv+Benz+Tyr444+Tyr407+Phe352+H ₂ O	0.544671	0.636638	0.091967	57.7	0.601506	0.604905	0.003399	2.1	
Flv+Benz+Tyr444+Tyr407+Phe352+H ₂ O /12 atom redundant	0.404350	0.501453	0.097103	60.9	0.461893	0.468765	0.006872	4.3	0.442796
79 Atom+H ₂ O	0.4271	0.54613	0.11903	74.7	0.51226	0.5258	0.01352	8.5	0.497381
79 Atom+7H ₂ O+H ₂ O	-0.0625				-0.00077				-0.03566
140 Atom +H ₂ O	0.91975				0.94301				0.897972

Yukarıdaki Tablo IV. 6 incelendiğinde aktivasyon enerjilerinin beklenenden yüksek olduğu gözlemlendi. Birinci aktivasyon enerji değerleri 47 ile 58 kcal/mol arasında lineer olmayan bir şekilde değişkenlik gösterdi. Model yapılarıdaki atom sayılarının artması tahminlerimizin aksine aktifleşme enerjisinde bir düşüş sağlamadı. Aynı şekilde atomların koordinatlarını dondurmamızın enerji artışı sağlayabileceği fikrinden hareketle koordinatlarını dondurduğumuz atom sayısını azalttık, ancak Tablo IV. 8 ve IV. 7 incelendiğinde 12 ağır atomun koordinatlarının dondurulduğu model yapı için elde edilen aktivasyon enerjisi yaklaşık 4 kcal/mol kadar artmıştır.

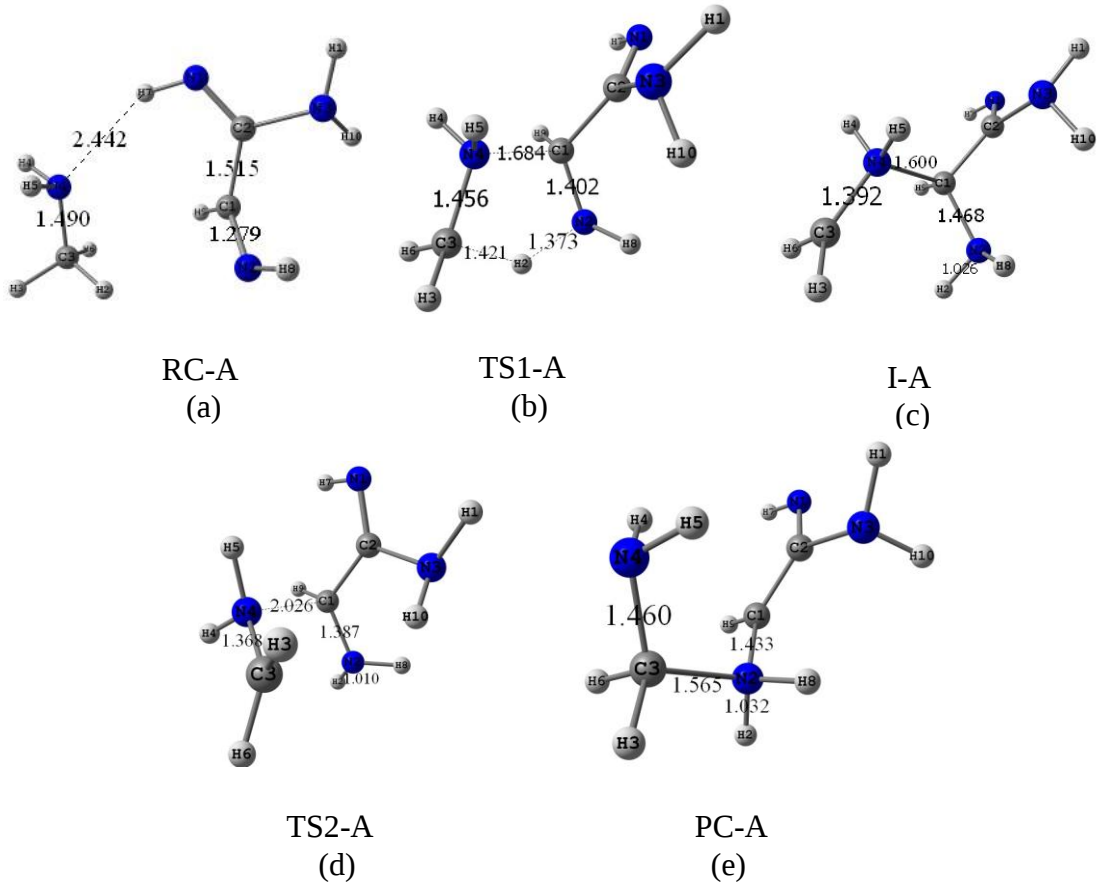
Polar mekanizma sonuçlarından elde edilen değerler ile kıyaslandığında H₂O ile modifiye edilen polar nükleofilik mekanizmanın birinci basamak aktifleşme enerjisinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 79 ağır atom içeren model yapıların sonuçları incelendiğinde H₂O üzerinden yürümesi modellenen Polar Nükleofilik Mekanizmanın aktifleşme enerjisi yaklaşık 30 kcal/mol kadar artmıştır. Bu sonuç bize MAO'nun amin oksitlenme mekanizmasını H₂O üzerinden yürümeyeceği sonucunu göstermiştir. 140 ağır atom içeren model çalışmasında ise geçiş konumu optimizasyonları gerçekleştirilemediği için aktifleşme enerjisi hesaplanamamıştır. Yukarıdaki Tablo IV. 7 ve IV. 8 kıyaslandığında aktif bölgenin içine 8 H₂O molekülü ilave edilmesi aktivasyon enerjisini arttırmıştır. 8 H₂O içeren model yapının polar mekanizma üzerindeki etkisi beklediğimizin aksine zorlaştırıcı yöndedir.

IV. 3. 4. Küçük Model Yapılar İle Önerilen Mekanizmaların Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar

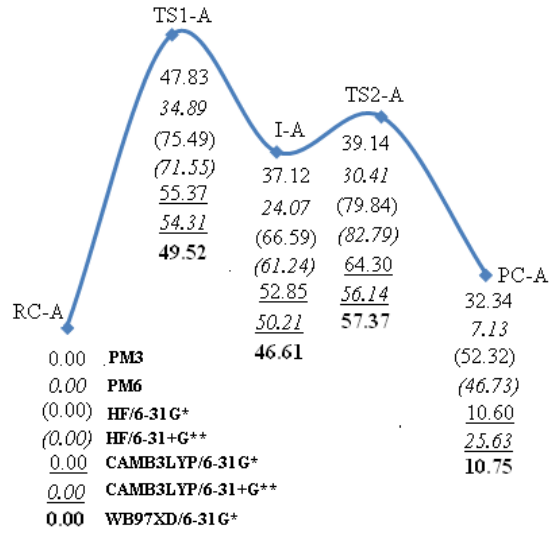
Bölüm III. 4. 4'te anlatıldığı gibi Polar nükleofilik, Sulu Polar ve Hidrür mekanizmalar küçük model yapılar oluşturularak aktivasyon enerjileri karşılaştırıldı. Oluşturulan model yapıları iki grupta toplayabiliriz.

IV.3.4.1. 17 ve 19 Atomlu Modeller İle Mekanizmaların Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar

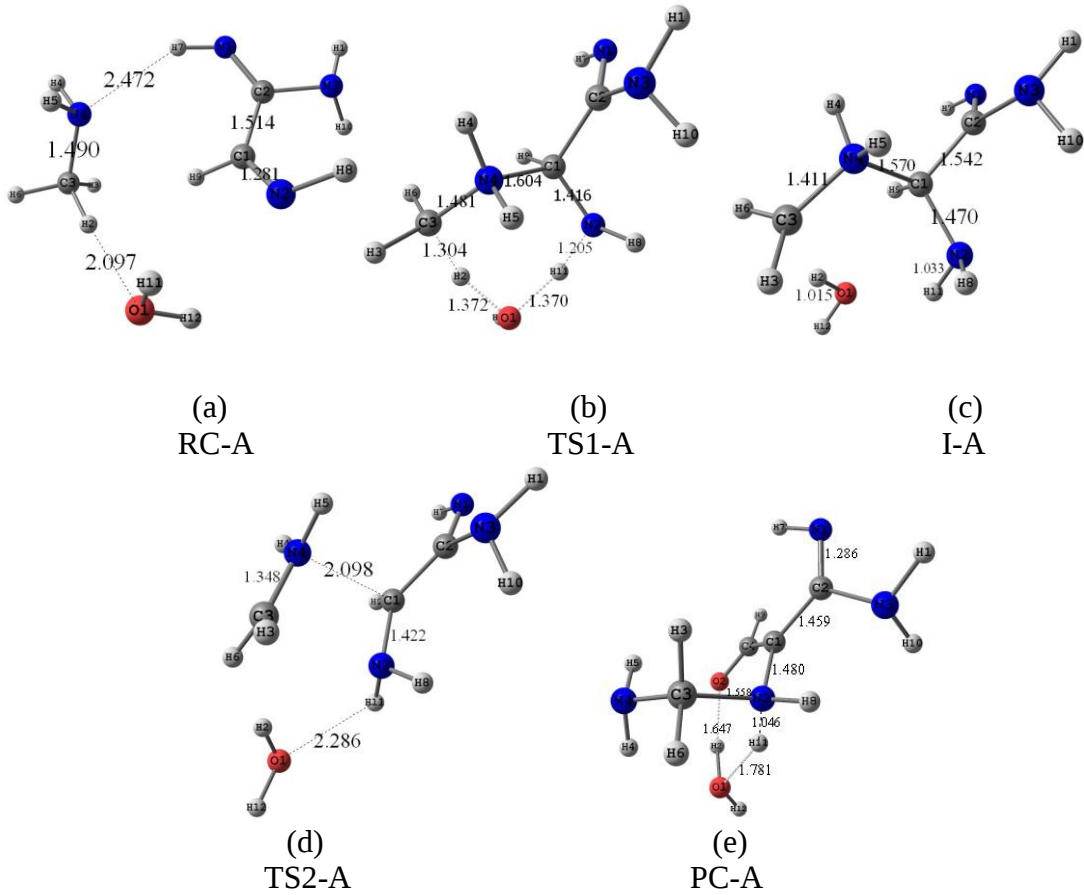
Bu tez çalışması kapsamında oluşturulan en küçük model yapımız 17 atom içeren Model A'dır. Model A için Polar Nükleofilik ve Sulu Polar Mekanizma modellemelerinden elde edilen PM6 yöntemine ait optimize geçiş konumu geometrileri aşağıda Şekil IV. 18'te verilmiştir. Çalışılan her bir yöntemin reaksiyon koordinatlarına ait enerji değişimleri Şekil IV.19'da, hesaplanan Gibbs serbest aktifleşme enerjileri de Tablo IV. 8'de verilmiştir.



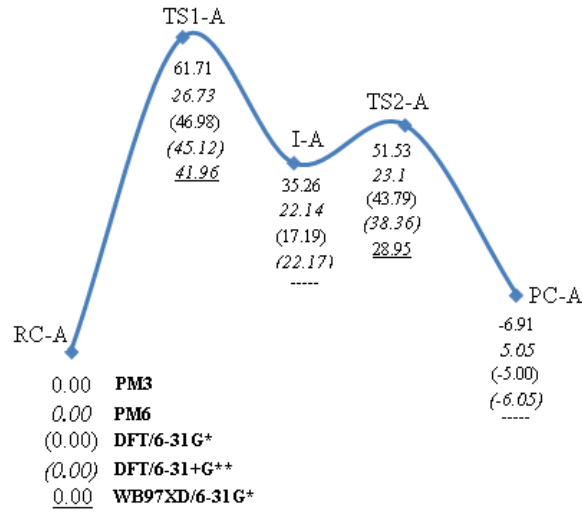
Şekil IV. 18 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model A İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapılar



Şekil IV. 19 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model A İçin Reaksiyon Koordinatı (Gibbs Serbest Enerji(kcal/mol) değerleri reaktant kompleksine(RC) relatif olarak verilmiştir.)



Şekil IV. 20 Sulu Polar Mekanizmanın Model A İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları



Şekil IV. 21 Sulu Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model A İçin Reaksiyon Koordinatı (Gibbs Serbest Enerji(kcal/mol) değerleri reaktant kompleksine(RC) relatif olarak verilmiştir.)

Table IV. 8 Model A İçin Elde Edilen Gibbs Serbest Enerji (kcal/mol)

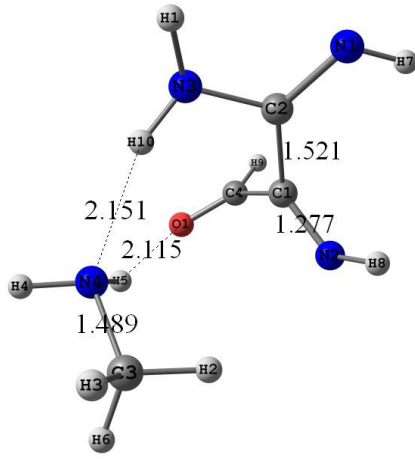
Metotlar	Polar Nükleofilik		Sulu Polar		Hidrür
	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$
PM3	47.84	6.39	61.71	2.01	a
PM6	34.89	6.34	26.73	1.97	a
HF/6-31G*	75.49	13.26	c	c	a
HF/6-31+G**	71.55	21.55	c	c	a
DFT/6-31G*	c	c	46.98	7.06	a
DFT/6-31+G**	c	c	45.12	3.65	a
CAMB3LYP /6-31G*	55.37	11.45	43.68	18.4	a
CAMB3LYP/6-31+G**	54.32	5.92	c	c	a
WB97XD/6-31G*	49.52	10.75	41.96	c	a
WB97XD/6-31+G**	53.96	c	c	c	a
MP2/6-31+G**	54.41	c	c	c	b

^a Polar Mekanizmaya dönüştürdü.

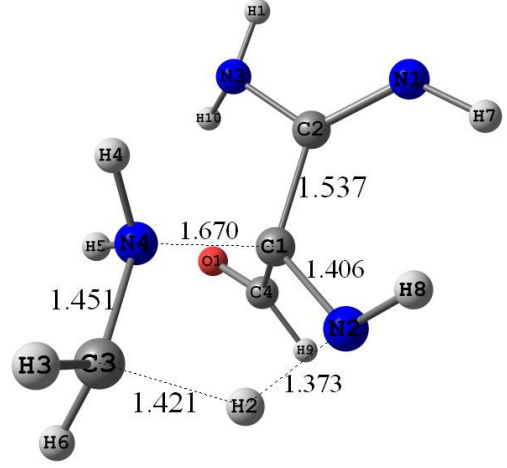
^b TS'yi bulamadı, ürüne ait tek bağ üzerindeki dönme hareketini elde etti.

^c Optimize edilemedi.

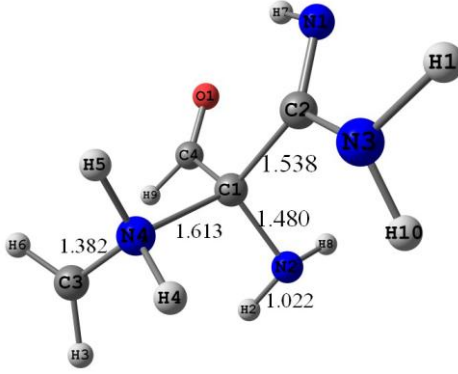
Model B için elde edilen optimize yapılar:



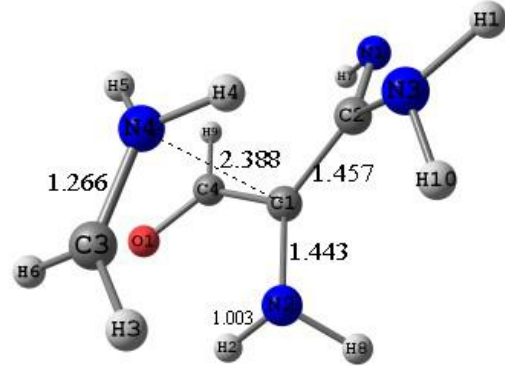
(a)
RC-B



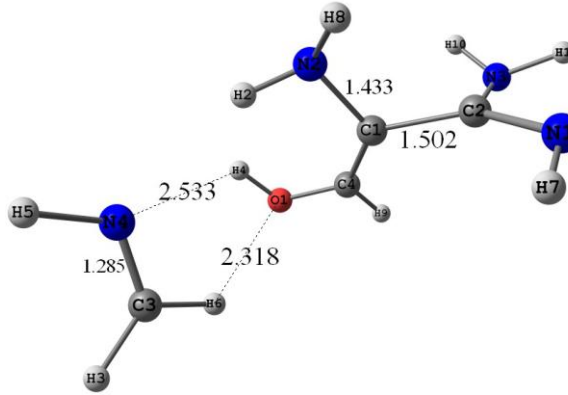
(b)
TS1-B



(c)
I-B

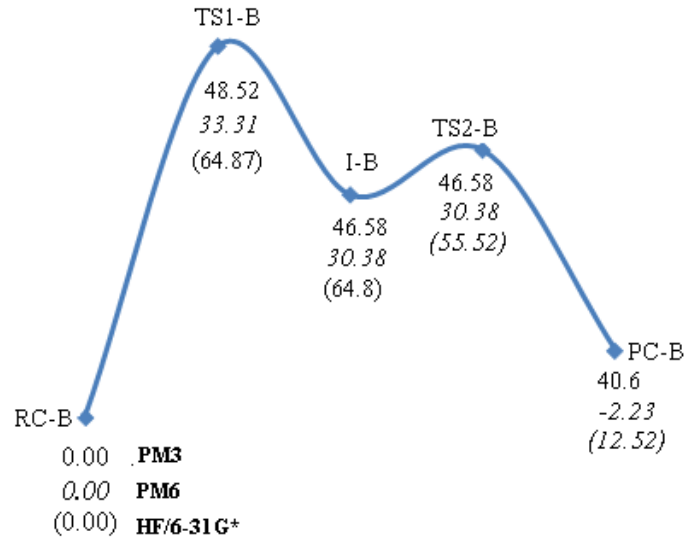


(d)
TS2-B

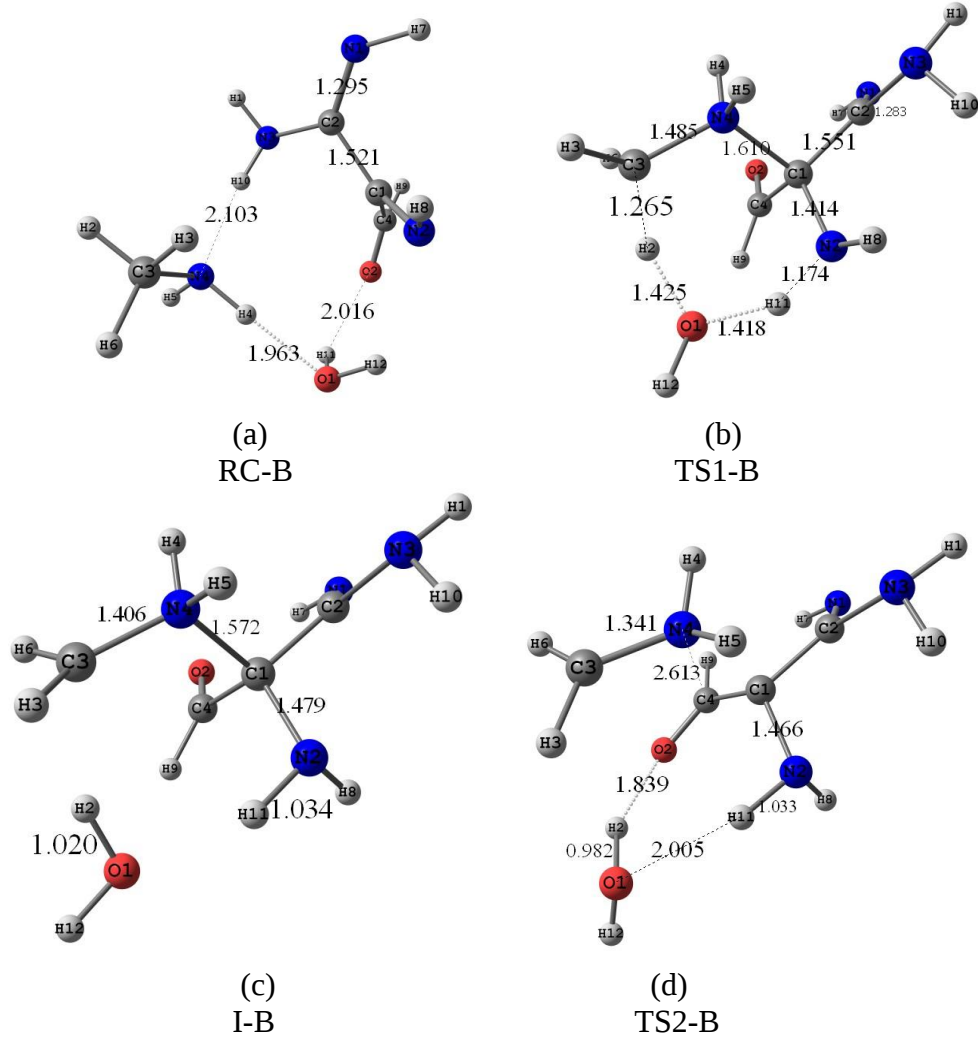


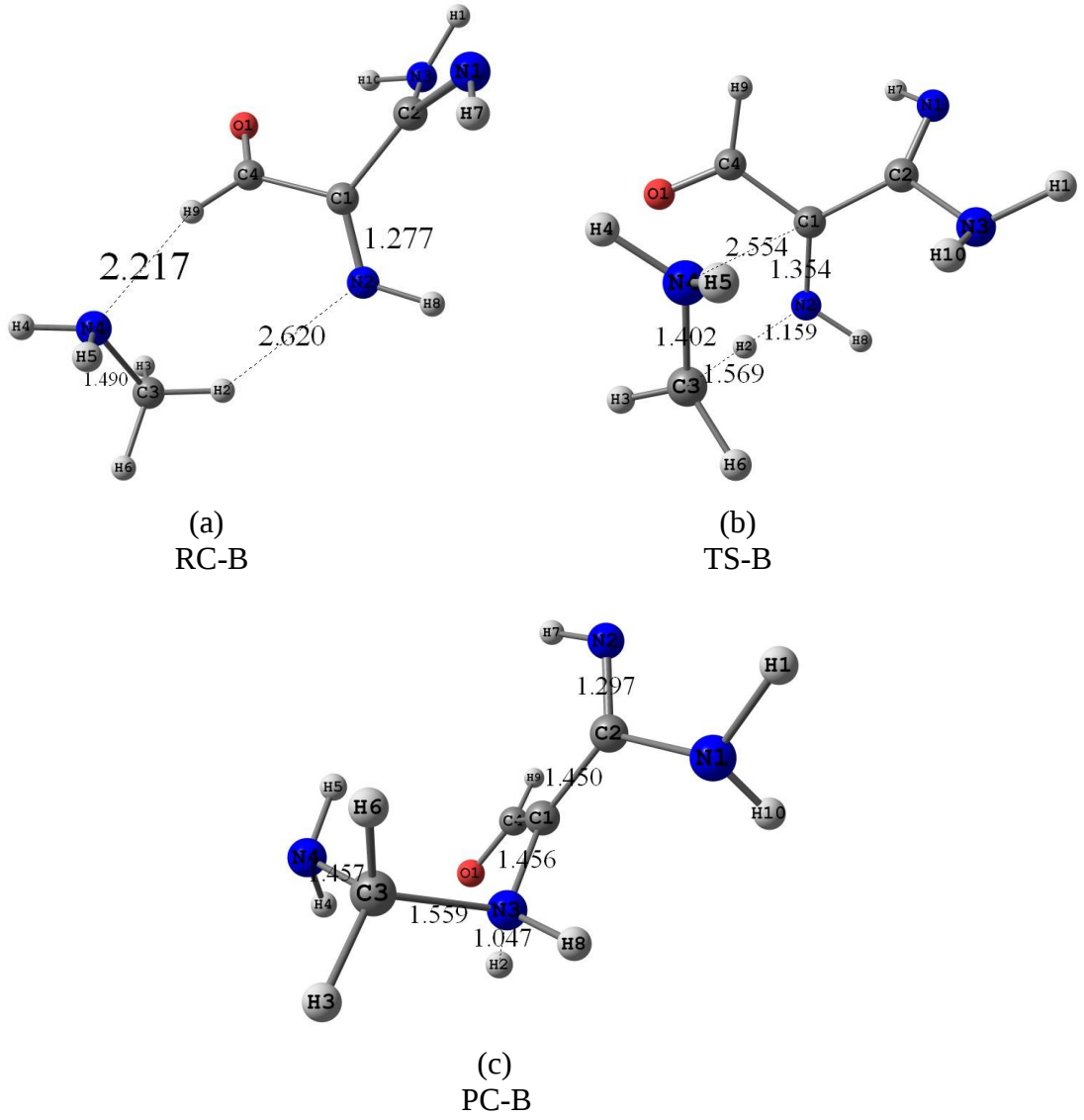
(e)
PC-B

Şekil IV. 22 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model B İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapılar

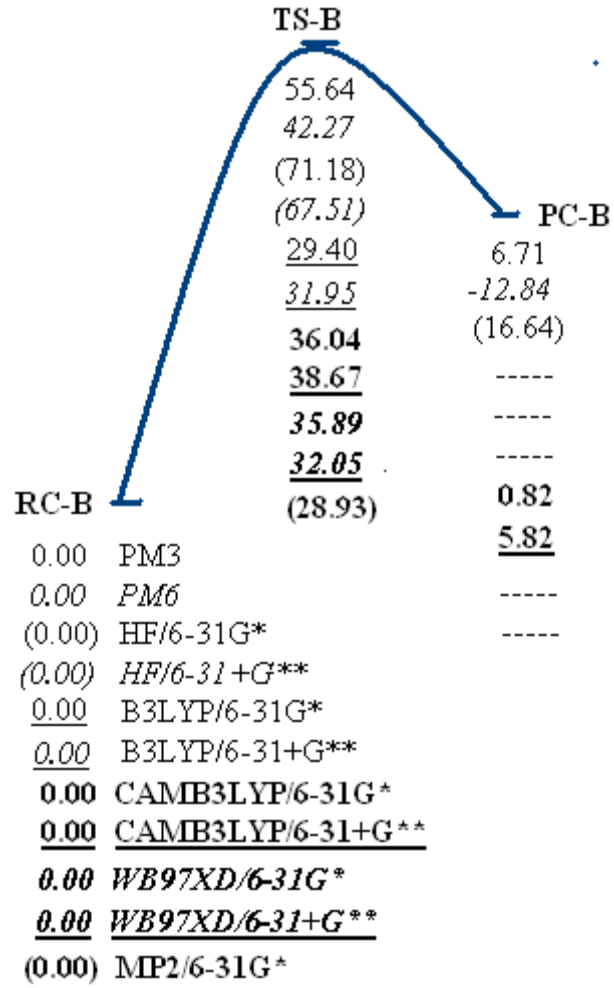


Şekil IV. 23 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model B İçin Reaksiyon Koordinatı (Gibbs Serbest Enerji(kcal/mol) değerleri reaktant kompleksine(RC) relatif olarak verilmiştir.)





Şekil IV. 26 Hidrür Mekanizmanın Model B İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları: (a) Reaktant Kompleks, (b) Geçiş Konumu, (c) Ürün Kompleks



Şekil IV. 27 Hidrür Mekanizmanın Model B İçin Reaksiyon Koordinatı (Gibbs Serbest Enerji(kcal/mol) değerleri reaktant kompleksine(RC) relatif olarak verilmiştir.)

Table IV.9 Model B İçin Elde Edilen Gibbs Serbest Enerji (kcal/mol)

Metotlar	Polar Nükleofilik		Sulu Polar		Hidrür
	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$
PM3	48.52	7.54	63.91	3.77	55.64
PM6	33.31	4.38	28.18	5.32	42.27
HF/6-31G*	64.87	10.18	62.00	20.59	71.18
HF/6-31+G**	66.47	b	49.78	17.34	67.51
DFT/6-31G*	a		26.68	21.67	29.40
DFT/6-31+G**	a		28.82	16.57	31.95
CAMB3LYP /6-31G*	a		b	b	36.04
CAMB3LYP/6-31+G**	a		b	b	38.67
WB97XD/6-31G*	a		b	b	35.89
WB97XD/ 6-31+G**	a		b	b	32.05
MP2/6-31+G**	a		b	b	28.93

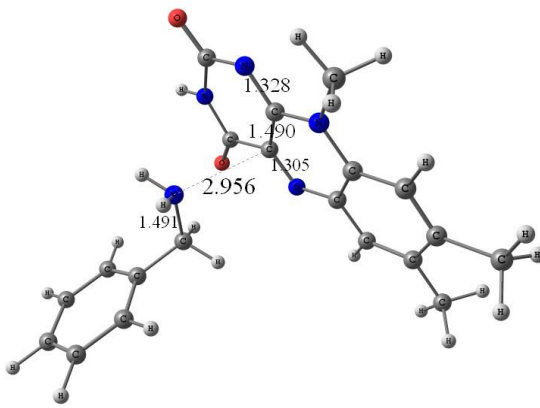
^a Hidrür Mekanizmaya dönüştürdü.

^b Optimize edemedi.

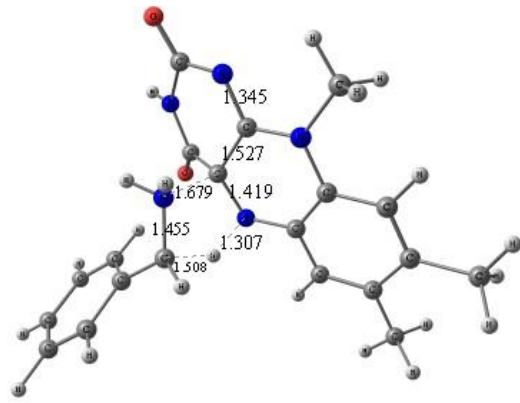
Çeşitli hesapsal yöntemler arasında sadece yarı deneysel olanlar ve HF/6-31+G** yöntemleri model B için tüm mekanizmaların geçiş durumlarını ve ara yapılarını optimize edebildi ve böylelikle aktivasyon enerji değerlerini karşılaştırabildik. Son dönemde geliştirilen PM6 metodu Model B ile yapılan hesaplarda Polar Nükleofilik Mekanizma için 33.31 kcal/mol'lük serbest enerji değeri ile Hidrür Mekanizmaninkinden (42.27 kcal/mol) daha düşük bir değer bulmuştur. CAMB3LYP/ 631+G** ve WB97XD/6-31+G** metotları sadece Model A için yüksek bir geçiş enerjisi (49.5-55.4 kcal/mol) bularak Polar Nükleofilik Mekanizmayı optimize edebildi. Diğer taraftan aynı DFT metotları Direk Hidrür Mekanizmayı Model B için daha düşük bir enerji (32.5-38.7 kcal/mol) ile optimize etti. Bu Direk Hidrür Mekanizma'nın MAO enzimleri için DFT metotları açısından daha düşünebilir bir mekanizma olduğunu göstermektedir fakat hala deneysel ve teorik veriye ihtiyaç vardır. PM6 metodu Direk Hidrür Mekanizma'nın aktifleşme enerjisini (42.3 kcal/mol) Polar Nükleofilik Mekanizma'nın aktifleşme enerjisinden (33.3 kcal/mol) daha yüksek bulmaktadır. Sulu Polar Mekanizma için enerji aktivasyon enerjisinin bariyeri 28.2 kcal/mol'e gerilemiştir.

IV.3.4.2. Flavin ve Benzilamin Modeli İle Mekanizmaların Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar

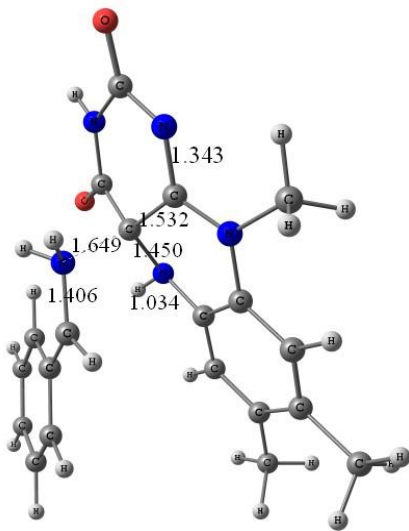
Yüksek seviye yöntemler ile yapılan mekanizmaların kıyaslanması çalışmalarındaki en büyük model yapı flavin ve benzilaminden oluşan modeldir. Bu model ile yapılan hesaplamalardan elde edilen optimize yapılara ait geometriler aşağıda Şekil IV.28, IV.30 ve IV.32’de verilmiştir.



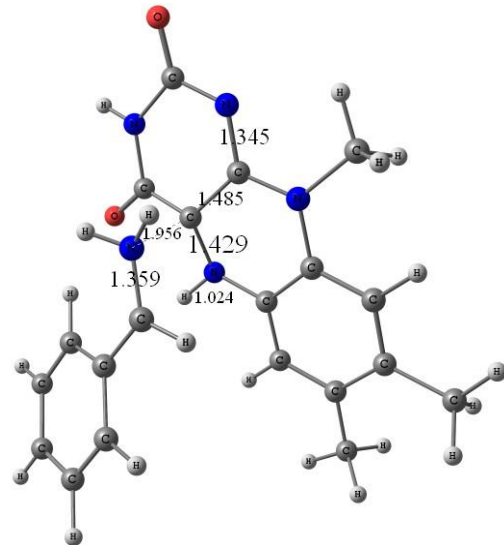
(a)
RC-C



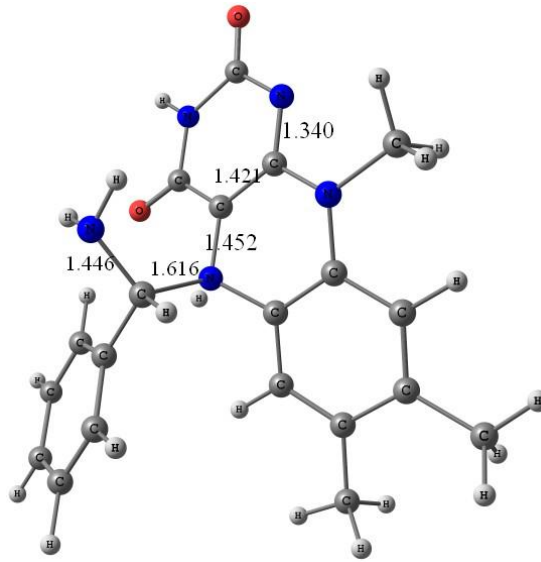
(b)
TS1-C



(c)
I-C

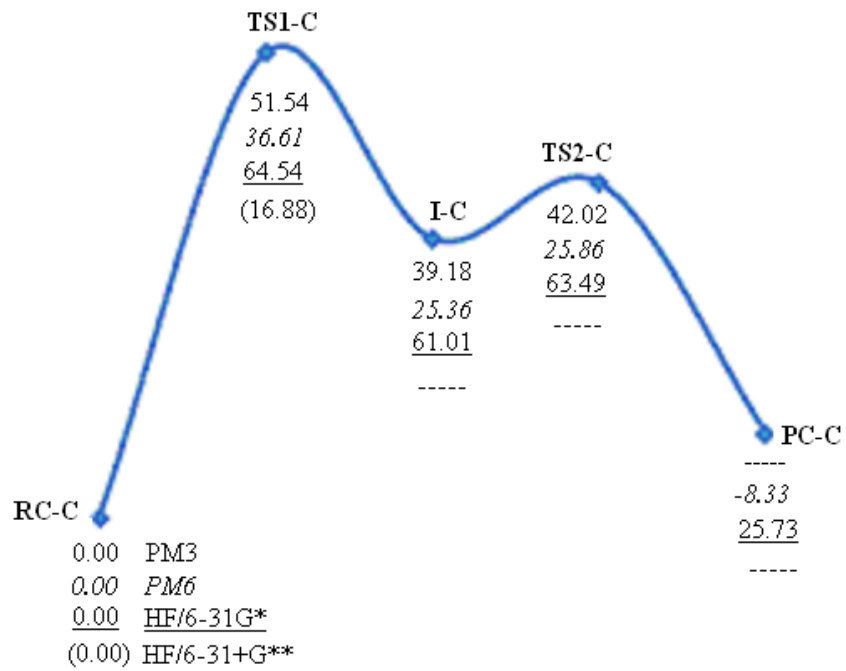


(d)
TS2-C

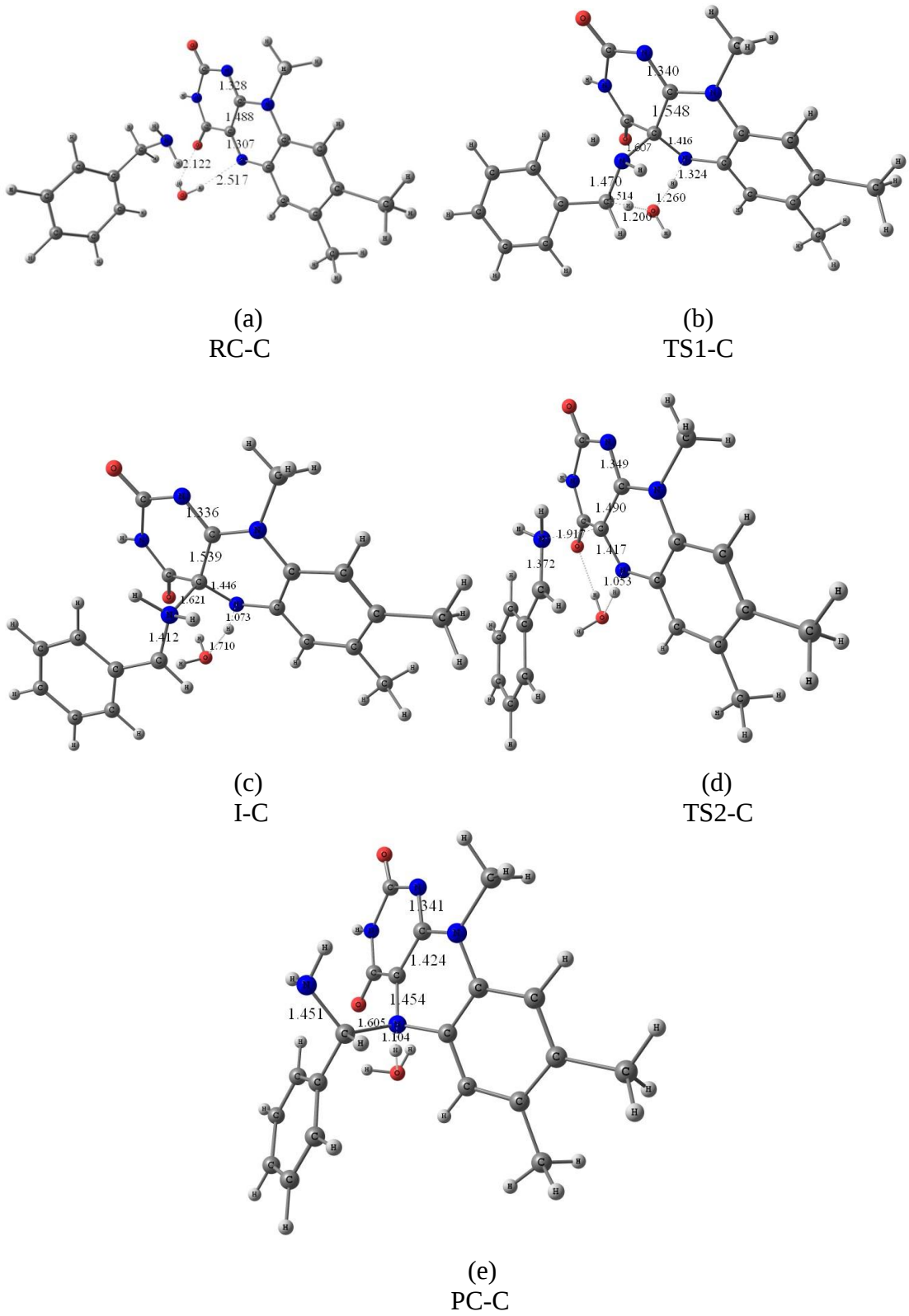


(e)
PC-C

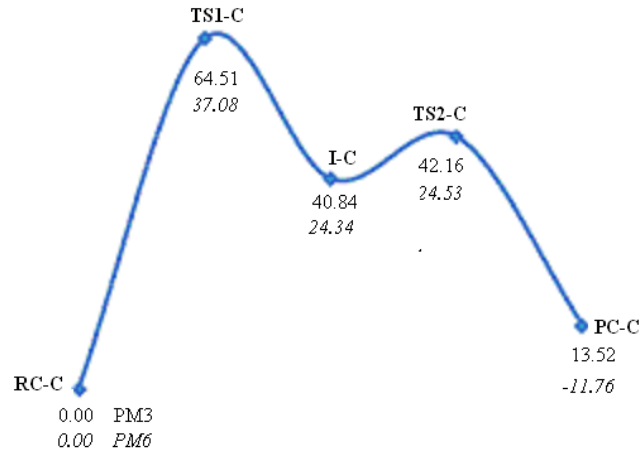
Şekil IV. 28 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları: (a) Giren Kompleks, (b) 1. Geçiş Konumu, (c) Ara Ürün, (d) 2. Geçiş Konumu, (e) Ürün Kompleks



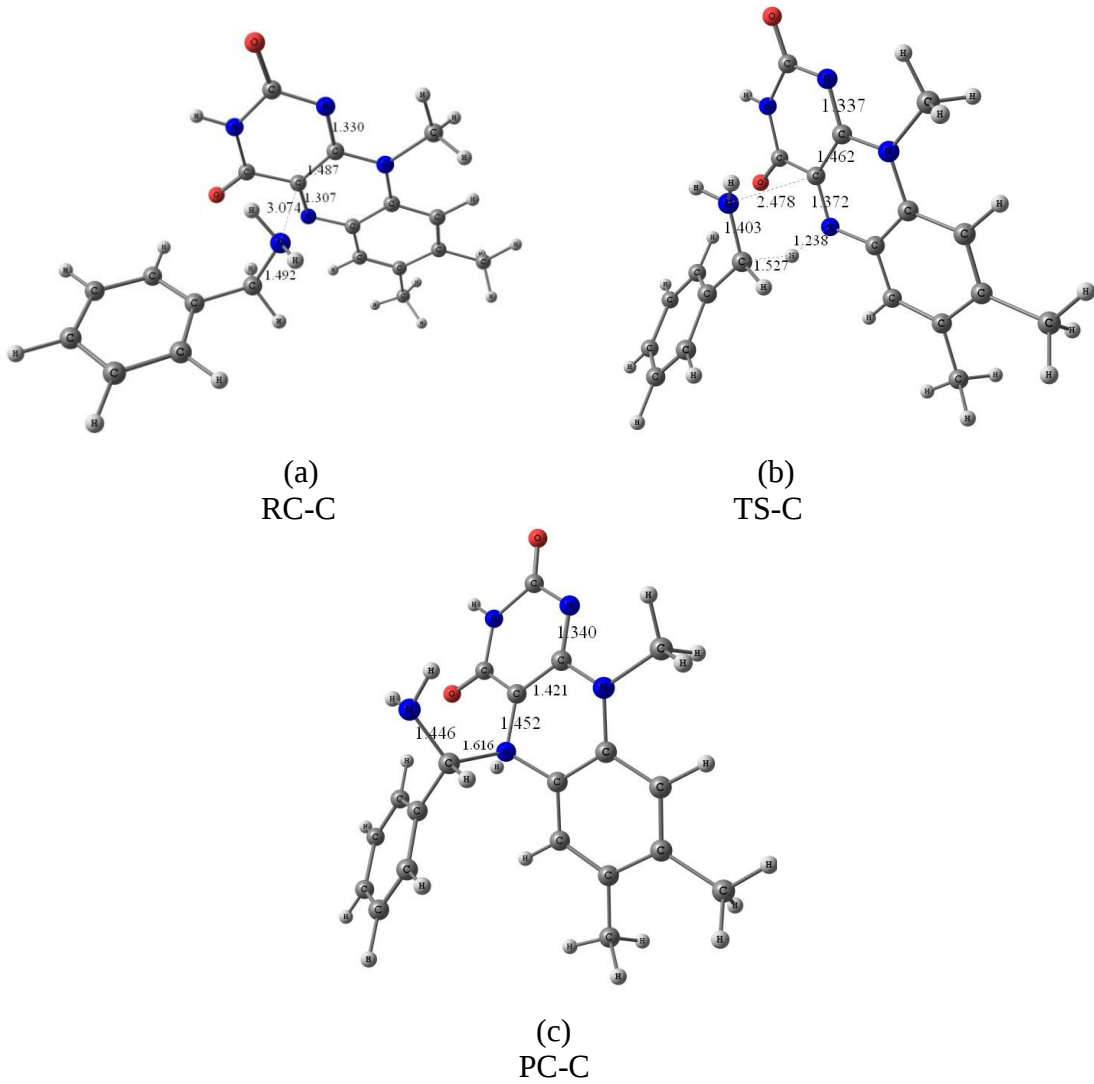
Şekil IV. 29 Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model C İçin Reaksiyon Koordinatı



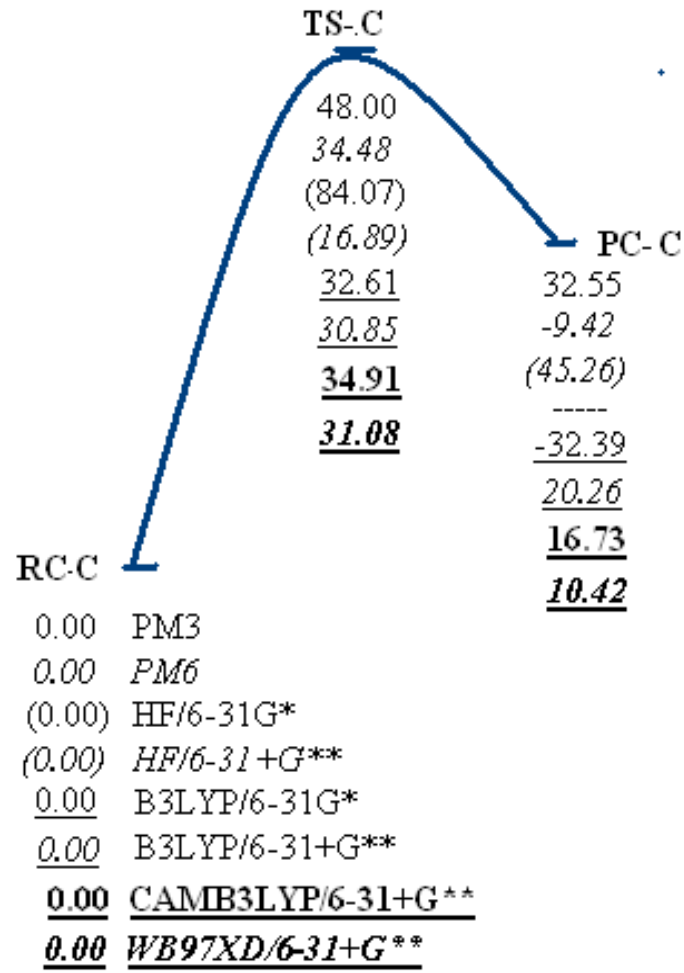
Şekil IV. 30 Sulu Polar Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları: (a) Giren Kompleks, (b) 1. Geçiş Konumu, (c) Ara Ürün, (d) 2. Geçiş Konumu, (e) Ürün Kompleks



Şekil IV. 31 Sulu Polar Nükleofilik Mekanizmanın Model C İçin Reaksiyon Koordinatı



Şekil IV. 32 Hidrür Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları: (a) Giren Kompleks, (b) Geçiş konumu, (c) Ürün Kompleks



Şekil IV. 33 Hidrür Mekanizmanın Model C İçin Reaksiyon Koordinatı

Model C için yapılan hesaplamalardan her bir mekanizma için elde edilen aktivasyon enerjileri aşağıda Tablo IV.10'da verilmiştir.

Tablo IV. 10 Model C İçin Elde Edilen Gibbs Serbest Enerji (kcal/mol)

Metotlar	Polar Nükleofilik		Sulu Polar		Hidrür
	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$
PM3	51.54	2.84	64.51	0.29	48.00
PM6	36.61	0.5	37.08	0.24	34.48
HF/6-31G*	64.54	2.48	b	b	84.07
HF/6-31+G**	16.88	a	b	b	16.89
DFT/6-31G*	a	a	b	b	32.61
DFT/6-31+G**	a	a	b	b	30.85
CAMB3LYP/6-31+G**	a	a	b	b	34.91
WB97XD/6-31+G**	a	a	b	b	31.08

^a Hidrür Mekanizmaya dönüştürdü.

^b Optimize edemedi

Tablo IV. 10. incelendiğinde Model C için sadece yarı deneysel yöntemler üç mekanizmayı da modelleyebilmiştir. PM6 yönteminden elde edilen değerler incelendiğinde incelenen mekanizmaların aktivasyon enerjilerinin birbirlerine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Daha yüksek seviye yöntemlere çıkıldıkça sadece Hidrür Mekanizma modellenenilirken diğer mekanizmalar modellenememiştir. Bu sebeple PM6 ile elde edilen optimize olmuş yapılara DFT/B3LYP/6-311+G**, CAMB3LYP/6-311+G** ve WB97XD/6-311+G** yöntemleri ile tek nokta enerji ve su ortamında SCRF=IEFPCM hesabı yaptırıldı. Elde edilen değerler aşağıda Tablo IV. 11 ve Tablo IV. 12’de verilmiştir.

Tablo IV. 11 Model C İçin Mekanizma Karşılaştırılmalarında Tek Nokta Enerji (kcal/mol) Değerleri

Metot/Tek Nokta Enerji	Polar Nükleofilik		Sulu Polar		Hidrür
	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$
B3LYP/6-311+G**	62.78	-16.54	72.06	x	x
CAM/B3LYP/6-311+G**	61.84	-13.04	69.45	-18.71	35.84
WB97XD/6-311+G**	58.5	-11.47	65.89	-18.45	33.92

Tablo IV. 12 Model C İçin Mekanizma Karşılaştırılmalarında Suyun Çözücü Etkisi (kcal/mol)

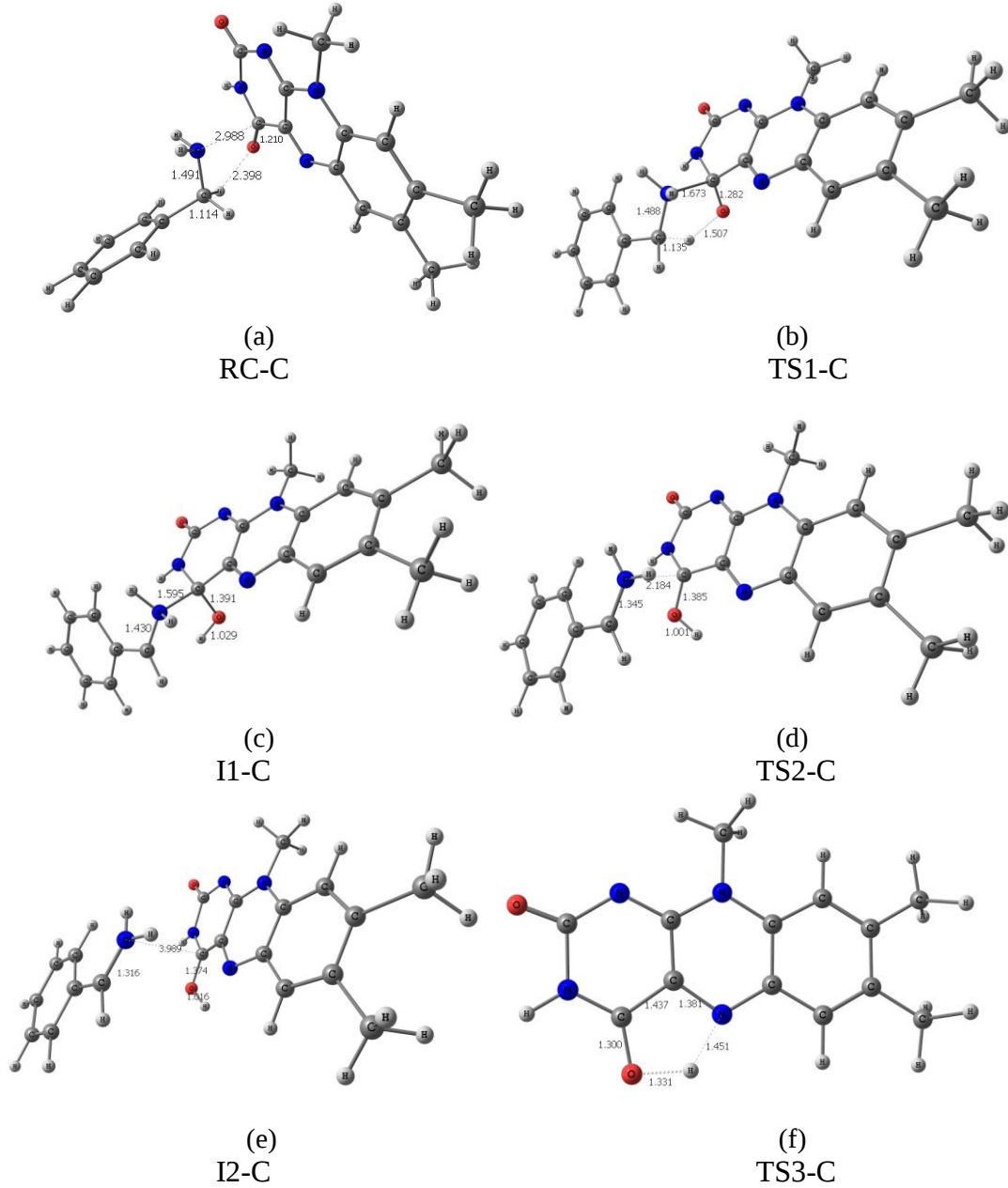
Metot/SCRF-PCM	Polar Nükleofilik		Sulu Polar		Hidrür
	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$
B3LYP/6-311+G**	61.39	- 16.10	61.39	-21.11	x
CAM/B3LYP/6-311+G**	60.17	-12.34	64.16	-16.65	34.04
WB97XD/6-311+G**	56.79	-10.67	60.62	-16.28	32.15

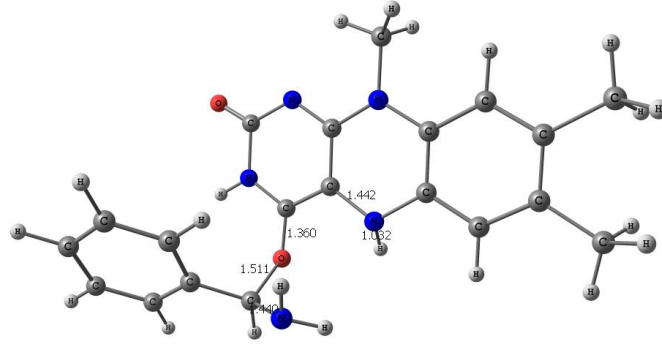
Yukarıdaki Tablo IV. 11 ve Tablo IV. 12 incelendiğinde hem tek nokta hem de sulu ortamda yapılan enerji hesaplarında Hidrür Mekanizmaya ait aktivasyon enerjisinin diğer iki reaksiyonun aktifleşme enerjilerinin yanında oldukça küçük değerlere sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç enerji hesaplarına dayanarak Hidrür Mekanizmanın üzerinde daha çok durulması gereken bir mekanizma olduğunu göstermektedir.

IV.4. KARBONİL MEKANİZMA ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Bölüm III.5'te anlatıldığı gibi tarafımızdan önerilen karbonil mekanizma flavin+benzilaminden oluşan model yapı ile PM3 ve PM6 yöntemleri ile modellendi. Her iki model yapı Bölüm III.5'te anlatıldığı gibi önerilen iki farklı Karbonil

Mekanizma'nın H^+ transferinin gerçekleşmesinin birinci basamakta veya ikinci basamakta olduğu iki farklı yol için modellendi. Aynı zamanda Karbonil Mekanizmanın H_2O molekülü üzerinden yürüyebilme ihtimaline karşılık yazılan mekanizma da H 'in birinci veya ikinci basamakta transfer edilebileceği iki farklı yol üzerinden modellendi. Yapılan hesaplamalar sonucu elde optimize yapılara ait geometriler Şekil IV.34'te, sonuçlar ise aşağıda Tablo IV.13 ve IV.14'te verilmiştir.





(g)
PC-C

Şekil IV. 34 Karbonil Mekanizmanın Model C İçin PM6 Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Optimize Yapıları: (a) Giren Kompleks, (b) 1. Geçiş Konumu, (c) Ara Ürün, (d) 2. Geçiş Konumu, (e) Ara Ürün 2, (e) 3. Geçiş Konumu, (f) Ürün Kompleks

Tablo IV.13 PM3 Yöntemi İle Hesaplanan Karbonil Mekanizmaya Ait Enerji Değerleri

Mekanizma	Giren Komp (au)	TS1 (au)	Akt. En.1 (kcal/mol)	Add1 (au)	TS2(au)	Akt. En.2 (kcal/mol)	Add2 (au)	TS3(au)	Akt. En3 (kcal/mol)	Ürün(au)
1. Bas. H Transferi	0.294157	0.371016	48.2	0.361761	0.387056	15.9	0.339967	0.394206	28.3	0.331531
2 Bas. H Transferi	0.294157	x	x	x	0.371018	x	0.339967	0.394206	28.3	0.331531
H ₂ O'lu 1. Bas. H Transferi	0.228098	x	x	0.288738	x	x	x	x	x	0.257137
H ₂ O'lu 2 Bas. H Transferi	0.228098	x	x	x	x	x	x	x	x	0.257137

Tablo IV.14 PM6 Yöntemi İle Hesaplanan Karbonil Mekanizmaya Ait Enerji Değerleri

Mekanizma	Giren Komp (au)	TS1(au)	Akt. En.1 (kcal/mol)	Add1(au)	TS2(au)	Akt. En.2 (kcal/mol)	Add2(au)	TS3(au)	Akt. En3 (kcal/mol)	Ürün(au)
1. Bas. H Transferi	0.282539	0.329258	29.3	0.330055	0.35667	16.7	0.278572	0.355913	12.2	0.277412
2 Bas. H Transferi	0.282539	x	x	x	0.329781	x	0.278572	0.355913	12.2	0.277412
H ₂ O'lu 1. Bas. H Transferi	0.199162	x	x	0.208879	x	x	0.180531	x	x	0.195581
H ₂ O'lu 2 Bas. H Transferi	0.199162	x	x	x	x	x	x	x	x	0.195581

Yukarıdaki Tablo IV.13 ve IV.14 incelendiğinde sadece birinci basamakta H transferinin gerçekleştiği Şekil III.33.a'da gösterilen mekanizma basamaklarının optimizasyonlarının yapılabildiği, diğer önerilen mekanizmaların tamamlanamadığı özellikle geçiş konumu optimizasyonlarının yapılamadığı görülmektedir. Birinci basamaktaki H^+ transferinin gerçekleştiği Karbonil Mekanizmaya ait aktivasyon enerjileri incelendiğinde H^+ transferinin gerçekleştiği basamağın enerjisi PM6 yöntemi ile hesaplandığında 29 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu değer diğer önerilen mekanizmaların aktifleşme enerjileri ile kıyaslandığında daha düşük seviyelerdedir. H^+ 'nın karbonil oksijeni ile N5 arasında transferini H_2O üzerinden modellediğimizde PM6 yöntemi ile yöntemi ile hesaplanan TS3 aktivasyon bariyeri yaklaşık 1 kcal/mol gibi çok düşük bir değer olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar ışığında Karbonil Mekanizma'nın üzerinde daha fazla durulması gereken alternatif bir oksidasyon mekanizması olabilme ihtimali vardır.

Karbonil Mekanizmanın önerilen diğer yollarının optimize edilememesinin sebebi modellemelerin yarı deneysel yöntemler ile yapılmasına bağlı olarak (-) yük yoğunluğunun ilgili yapılar üzerinde lokalize edilememesidir. Eğer daha yüksek seviye yöntemler ile Karbonil Mekanizma hesaplamaları tekrarlanırsa diğer yollarında optimize edilebilme ihtimali vardır.

IV.5. P-SÜBSTİTÜE BENZİLAMİN TÜREVLERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALARDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

IV. 5. 1. Flavin + Benzilamin Modelinden Elde Edilen Sonuçlar

Bölüm III. 6. 1'de anlatıldığı gibi p-sübstütü benzilamin türevlerinin Polar Nükleofilik Mekanizma için modellenmesinde çalışılan en küçük model yapı flavin ve benzilaminden oluşmaktadır. Bu model yapının PM6 yöntemi ile yapılan optimizasyonlarından elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo IV.15 ve IV.16'da verilmiştir.

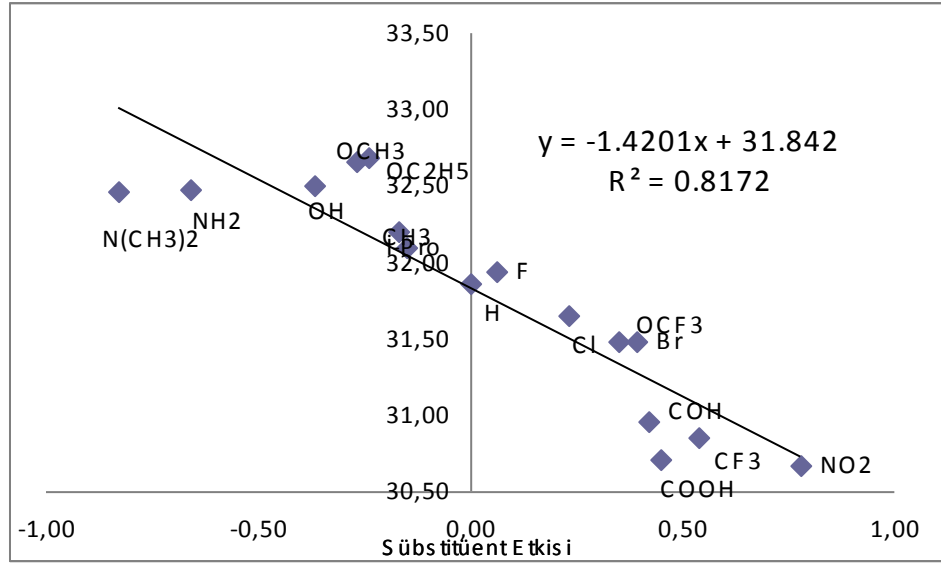
Tablo IV. 15 P-Sübstitüe Benzilamin Substratları İçin PM6 Yöntemi İle Modellenen Polar Nükleofilik Mekanizmaya ait ZPE Katılmış Enerji ve σ Sübstitüent Sabiti Değerleri

	Giren Komp. (au)	1. Geçiş Konumu (au)	1.Akt En. (kcal/mol)	Ara Ürün (au)	2. Geçiş Konumu (au)	2.Akt En. (kcal/mol)	Ürün Komp. (au)	σ
F	0.26255	0.313462	31.9	0.241839	0.297824	35.1	0.241839	0.06
Cl	0.321507	0.371959	31.7	0.30262	0.35626	33.6	0.324328	0.23
Br	0.33976	0.38994	31.5	0.302508	0.374323	45.1		0.39
OH	0.276957	0.32876	32.5	0.256512			0.255153	-0.37
CH₃	0.355485	0.4068	32.2	0.390808	0.39075	-0.1	0.332934	-0.17
OCH₃	0.310032	0.362077	32.7	0.288789	0.346562	36.2	0.287455	-0.27
n-Bütil	0.411949	0.463155	32.1	0.390866	0.447069	35.3		-1.63
İ-Pro	0.392735	0.443891	32.1	0.371608	0.427771	35.2	0.363436	-0.15
N(CH₃)₂	0.41176	0.463505	32.5	0.388128	0.447589	37.3	0.406095	-0.83
OC₂H₅	0.324851	0.376945	32.7	0.30331				-0.24
H	0.346376	0.397158	31.9	0.326246	0.381084	34.4	0.324896	0
NO₂	0.339725	0.388592	30.7	0.363493	0.372786	5.8	0.323467	0.78
CF₃	0.091433	0.1406	30.9	0.074211	0.125041	31.9		0.54
OCF₃	0.029714	0.079891	31.5			0	0.010455	0.35
t-Butil			0			0		-2.78
NH₂	0.356841	0.40859	32.5	0.332902	0.393111	37.8	0.332899	-0.66
COH	0.312093	0.361436	31.0	0.293541	0.345167	32.4	0.293219	0.42
COOH	0.216841	0.265783	30.7	0.199515	0.249922	31.6	0.198457	0.45

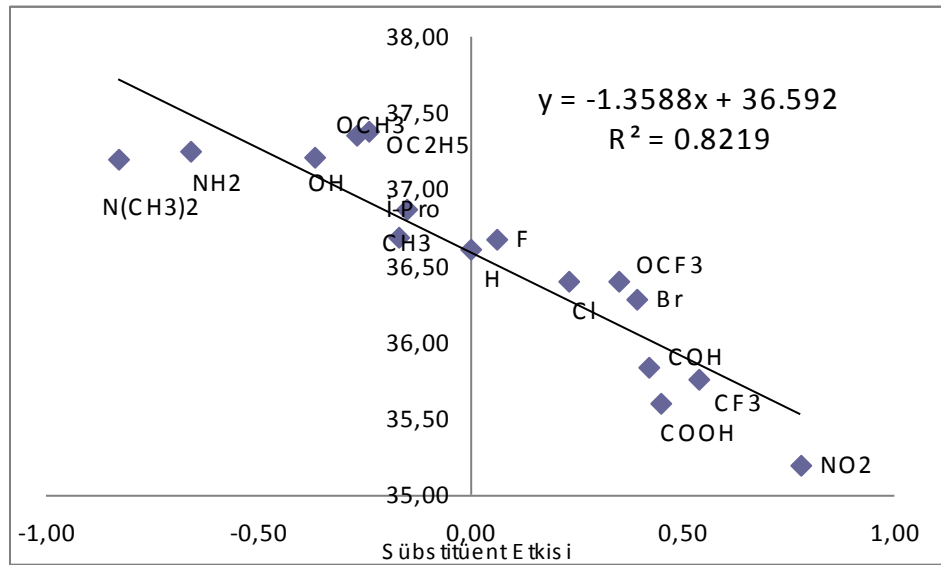
Tablo IV. 16 P-Süstitüe Benzilamin Substratlarının PM6 Yöntemi İle Modellenen Polar Nükleofilik Mekanizmaya ait ΔG Enerjileri ve σ Süstitüent Sabiti Değerleri

	Giren Komp. (au)	1. Geçiş Konumu (au)	1.Akt En. (kcal/mol)	Ara Ürün (au)	2. Geçiş Konumu (au)	2.Akt En. (kcal/mol)	Ürün Komp. (au)	σ
F	0.197938	0.256395	36.7	0.18545	0.239491	33.9	0.18545	0.06
Cl	0.256021	0.31403	36.4	0.247144	0.297005	31.3	0.26075	0.23
Br	0.273065	0.330894	36.3	0.246874	0.31413	42.2	0.31983	0.39
OH	0.212234	0.271539	37.2	0.198308			0.198585	-0.37
CH3	0.288674	0.347137	36.7	0.330783	0.33046	-0.2	0.274381	-0.17
OCH3	0.24279	0.302331	37.4	0.231523	0.285878	34.1	0.228431	-0.27
n-Bütil	0.338353	0.397179	36.9	0.327492	0.380128	33.0		-1.63
İ-Pro	0.322475	0.381239	36.9	0.311413	0.36421	33.1	0.300505	-0.15
N(CH₃)₂	0.341182	0.400471	37.2	0.327762	0.383878	35.2	0.343025	-0.83
OC₂H₅	0.254507	0.314089	37.4	0.242967				-0.24
H	0.283031	0.341371	36.6	0.27011	0.324242	34.0	0.269762	0
NO₂	0.272257	0.328342	35.2	0.304198	0.311667	4.7	0.263713	0.78
CF₃	0.020981	0.077977	35.8	0.013977	0.061452	29.8		0.54
OCF₃	-0.04261	0.015391	36.4			0	-0.05364	0.35
t-Butil			0			0		-2.78
NH₂	0.291839	0.351198	37.2	0.276072	0.334829	36.9	0.276068	-0.66
COH	0.245126	0.302242	35.8	0.231229	0.285046	33.8	0.23445	0.42
COOH	0.148254	0.205	35.6	0.141031	0.188184	29.6	0.138128	0.45

Yukarıda görülen Tablo IV.15'teki PM6 yöntemi ile hesaplanan Tek Nokta Enerji $\Delta H_1^\ddagger$ ve $\Delta G_1^\ddagger$ değerlerinin literatürden [77] alınan σ 'ya karşı grafiği çizildiğinde aşağıdaki Şekil IV. 35'teki grafikler elde edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil IV. 35 P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin PM6 ile Hesaplanan (a) ZPE'li ΔH_1° ve (b) ΔG_1° Değerlerinin Sübs titüent Etkisine (σ) Karşı Grafikleri

Yukarıda grafikler incelendiğinde t-Büt ve n-Büt outlier olarak alınmıştır.

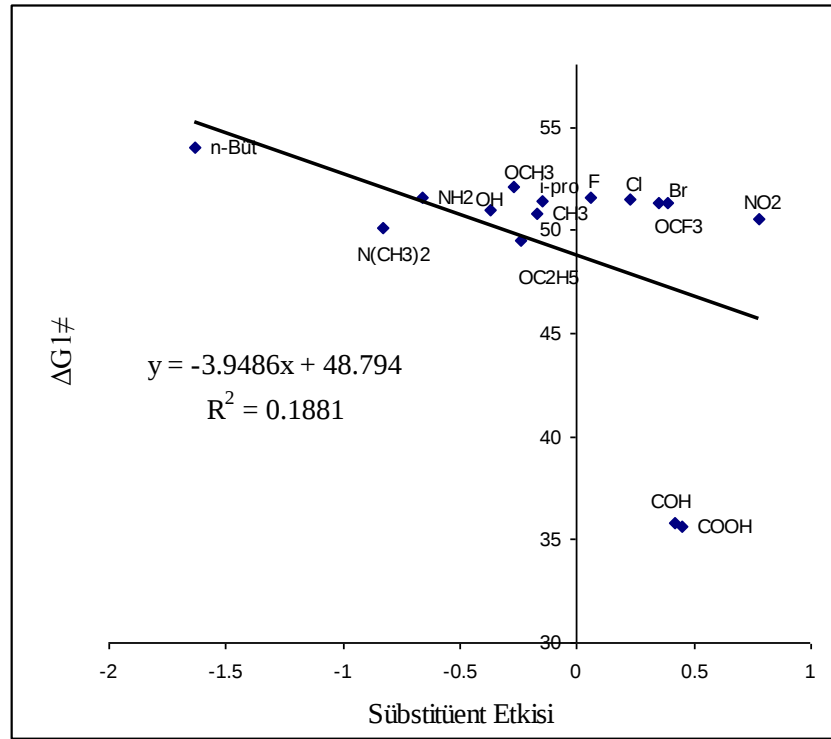
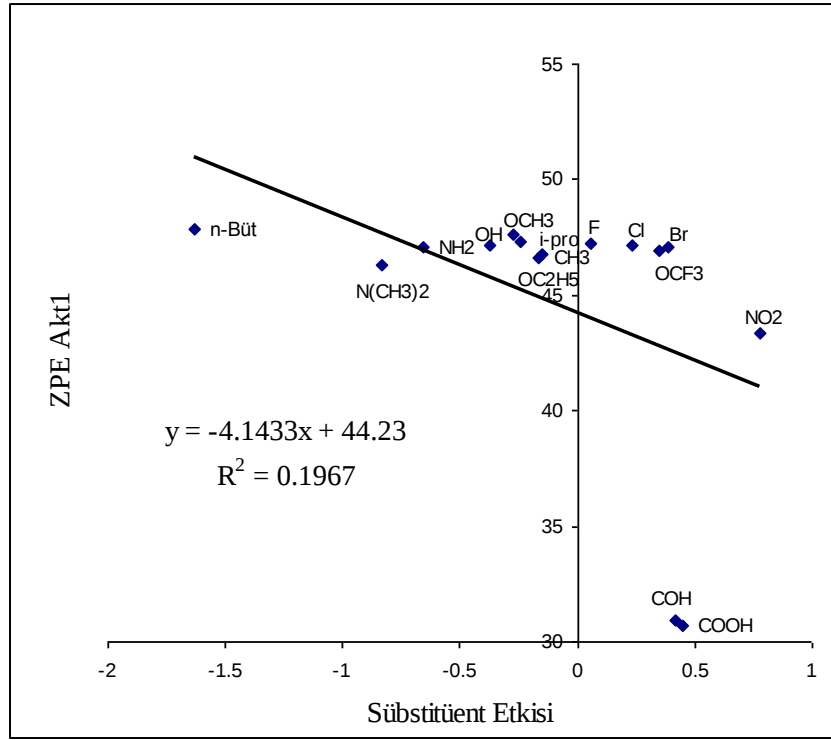
IV.5. 2. Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 Modelinden Elde Edilen Sonuçlar

Bölüm III. 6. 2’de anlatıldığı gibi p-süstitüe benzilamin türevlerinin Polar Nükleofilik Mekanizma için PM3 yöntemi ile modellenmiştir. Bu model yapı substratı çevreleyen aromatik aminoasitlerin p-süstitüe benzilamin türevleri üzerindeki etkisini inceleme adına önemlidir. Bu optimizasyonlar sadece Polar Nükleofilik Mekanizmanın hız belirleme basamağı olan birinci basamak için gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar aşağıda Tablo IV. 17’de verildi.

Tablo IV. 17 p-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin 1. Aktivasyon Değeri Üzerindeki Etkisi

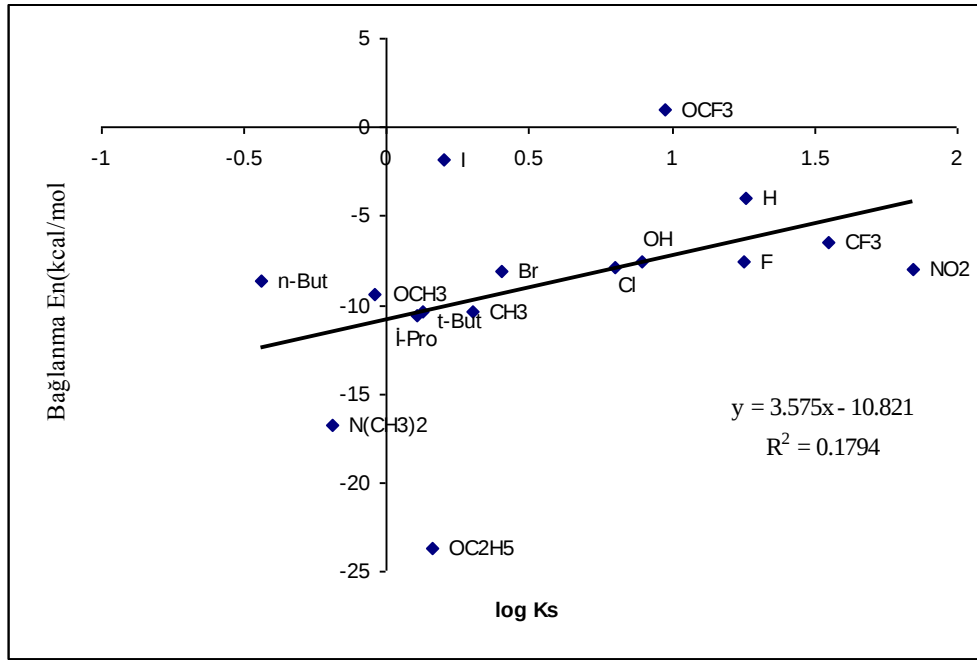
Süstitüentler	$\Delta G_1^\ddagger$ (kcal/mol)
F	51.5
Cl	51.5
Br	51.4
I	51.4
OH	51.0
CH ₃	50.8
OCH ₃	52.1
n-bütil	54.0
iso-pro	51.4
N(CH ₃) ₂	50.1
OC ₂ H ₅	49.5
H	50.8
NO ₂	50.6
CF ₃	
OCF ₃	51.3
t-bütil	50.8
NH ₂	51.6

Yukarıda Tablo IV. 15’te verilen 1. aktivasyon enerji değerlerinin süstitüent sabitine karşı çizilen grafikleri aşağıda Şekil IV. 36’da verilmiştir. Verilen bu grafiklerde korelasyon sabiti R²’nin oldukça düşük değerlere sahip olduğu görülmektedir.

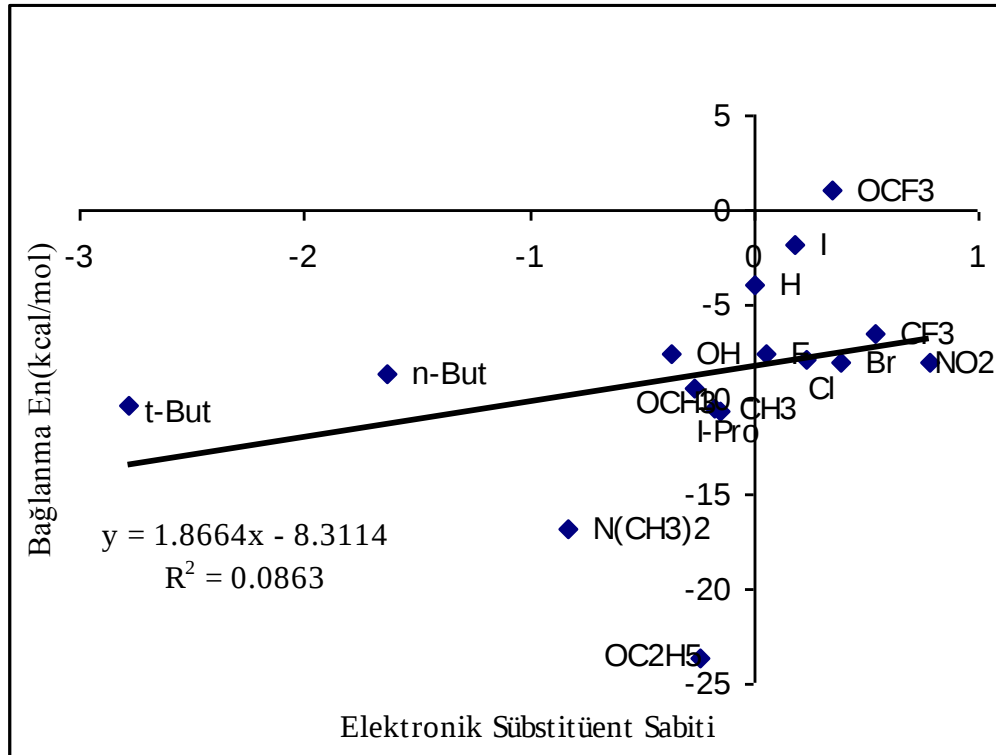


Şekil IV. 36 Flavin + Benzilamin + Tyr407 + Tyr444 + Phe352 Model Yapılı P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin ZPE'li $\Delta H_1^\ddagger$ ve $\Delta G_1^\ddagger$ Değerlerinin Süstitüent Etkisine (σ) Karşı Grafikleri

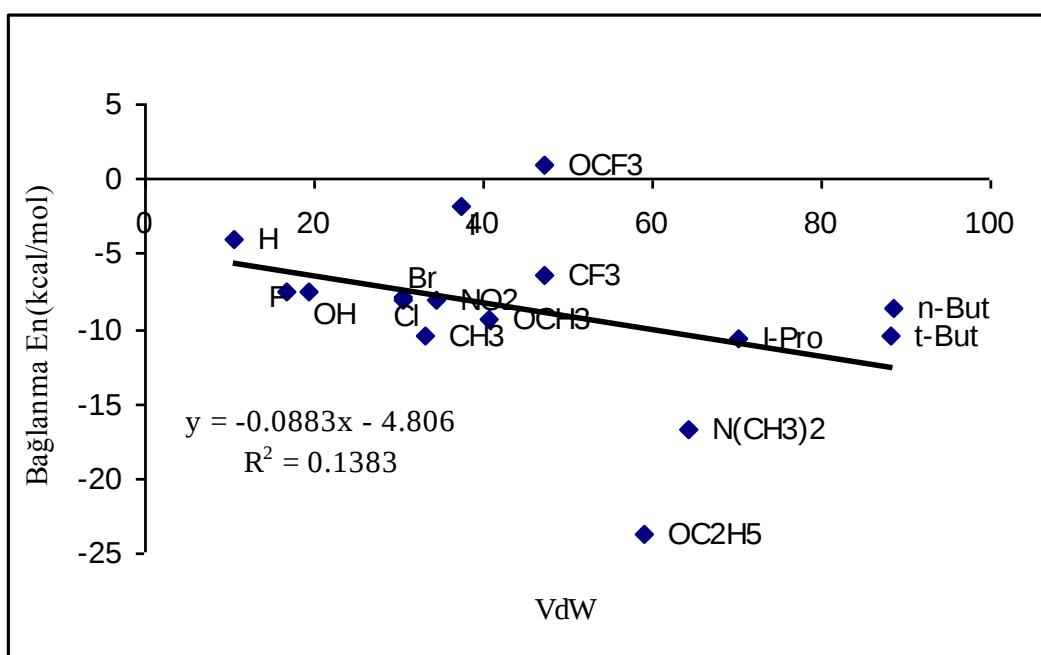
IV.5.3. Aktif Bölgenin İçine P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin Yerleştirilmesinden Elde Edilen Sonuçlar



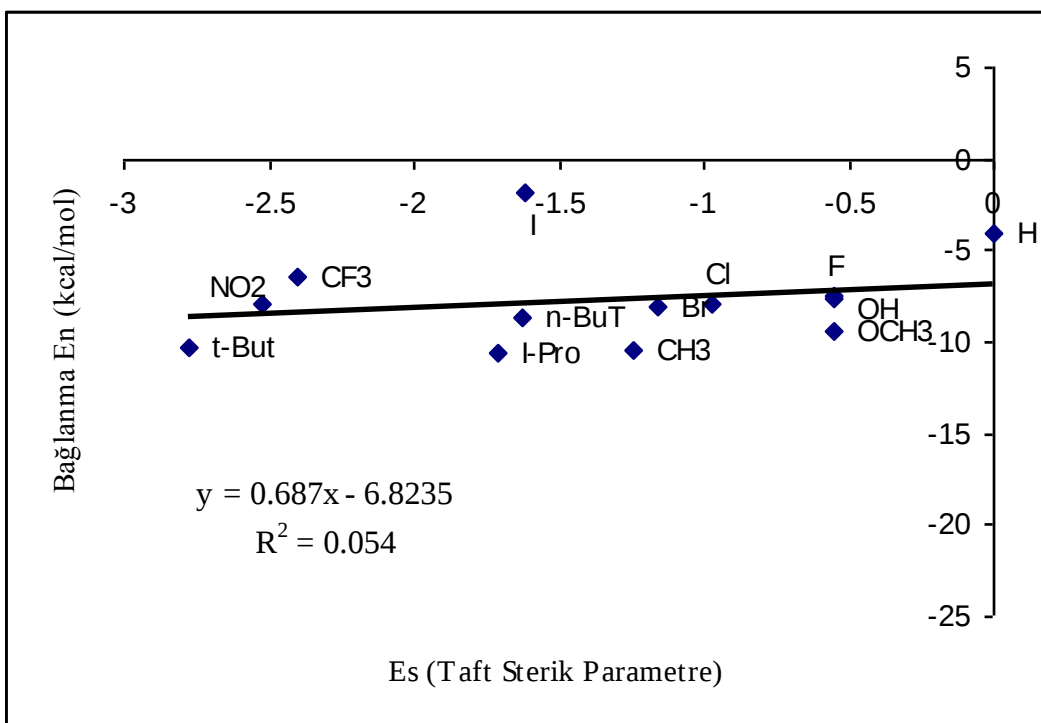
(a)



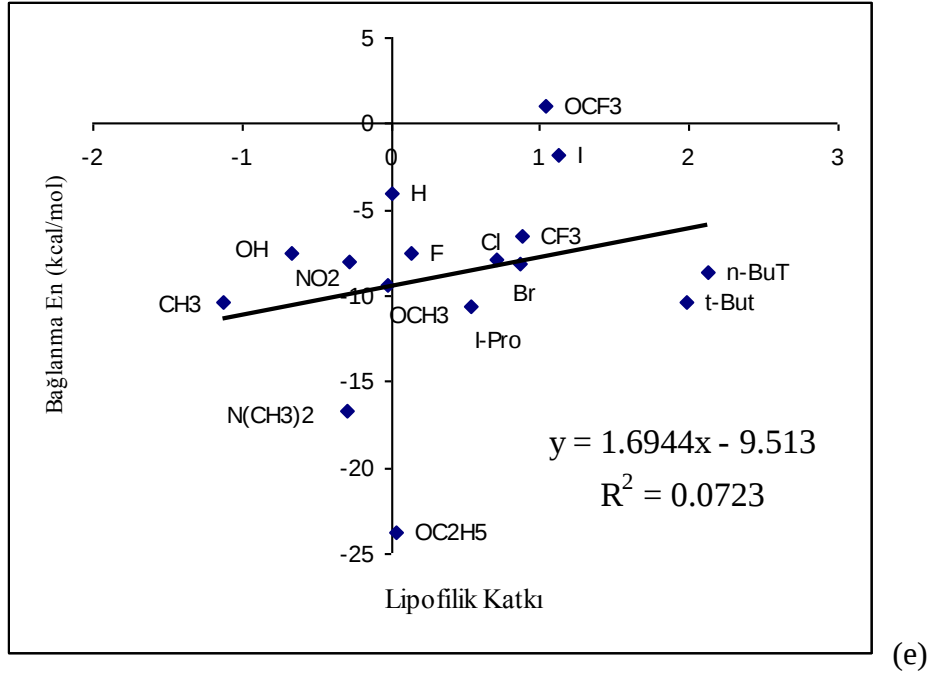
(b)



(c)



(d)



Şekil IV. 37 Aktif Bölge İçinde P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin Optimizasyon Çalışmalarından Çizilen Grafikler

Yukarıdaki Şekil IV.35, IV.36 ve IV.37’de verilen grafikler incelendiğinde sadece Flavin ve benizaminden oluşan PM6 ile optimize edilen model için Süstitüent etkisi ile iyi bir korelasyon bulunmuştur. Yapılan model PM3 ve aktif bölge PM3 çalışmalarından elde edilen, bağlanma enerjileri ile süstitüent etkisi ve diğer parametreler arasında bir korelasyona rastlanamamıştır.

Tablo IV. 18 Aktif Bölgede PM3 ile Yöntemi ile Yapılan p-Süstitüe Benzilamin Çalışmalarından Elde Edilen Değerler

	Subs(Au)	Enzim (Au)	Subs+En. (Au) (Freeze)	Subs-En Komp (Au) (Free)	Bağlanma En. (kcal)	log Ks	Elek- Subs σ	VdW- Volume A ³	Es (Taft Sterik P)	Lipofilik Katki Π
F	-0.03777788	-2.06053508	-2.09831296	-2.11039211	-7.6	17.9	0.06	16.68	-0.55	0.14
Cl	0.0209463	-2.06053508	-2.03958878	-2.05209994	-7.8	6.28	0.23	30.5	-0.97	0.71
Br	0.04397124	-2.06053508	-2.01656384	-2.02947472	-8.1	2.54	0.39	30.54	-1.16	0.86
I	0.06574323	-2.06053508	-1.99479185	-1.99775404	-1.9	1.59	0.18	37.38	-1.62	1.12
OH	-0.04041676	-2.06053508	-2.10095184	-2.11295928	-7.5	7.84	-0.37	19.34	-0.55	-0.67
CH₃	0.01655483	-2.06053508	-2.04398025	-2.06059388	-10.4	2.01	-0.17	33.14	-1.24	-1.12
OCH₃	-0.02914872	-2.06053508	-2.0896838	-2.10468491	-9.4	0.91	-0.27	40.72	-0.55	-0.02
CF₃	-0.2203748	-2.06053508	-2.28090988	-2.29122983	-6.5	35.1	0.54	47.19	-2.4	0.88
OCF₃	-0.29194913	-2.06053508	-2.36457279	-2.3629347	1.0	9.39	0.35	47.2		1.04
n-Butil	-0.00772327	-2.06053508	-2.06825835	-2.08206638	-8.7	0.36	-1.63	88.56	-1.63	2.13
ter- Butil	-0.00550446	-2.06053508	-2.06603954	-2.08256746	-10.4	1.33	-2.78	88.25	-2.78	1.98
NO₂	0.0180692	-2.06053508	-2.04246588	-2.05518366	-8.0	69.9	0.78	34.3	-2.52	-0.28
iso-pro	0.00298145	-2.06053508	-2.05755363	-2.07442924	-10.6	1.28	-0.15	70.14	-1.71	0.54
N(CH₃)₂	0.02573999	-2.06053508	-2.03479509	-2.06148461	-16.7	0.64	-0.83	64.16		-0.3
OC₂H₅	-0.03681238	-2.06053508	-2.09734746	-2.1351284	-23.7	1.45	-0.24	59.18		0.03
H	0.03158785	-2.06053508	-2.02894723	-2.03533301	-4.0	18.1	0	10.49	0	0

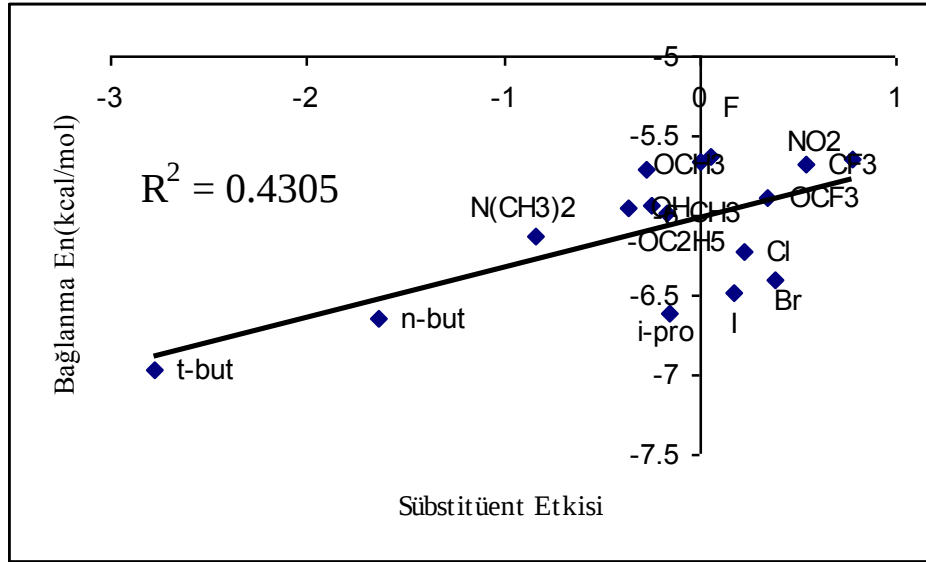
IV. 5. 4. Docking Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

Bölüm III. 6. 4'te anlatıldığı gibi 20 adet p-sübsititüe benzilamin türevi MOA A enziminin 2Z5X pdb kodlu x-ışını yapısına dock edildi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda Tablo IV.19'de verilmiştir.

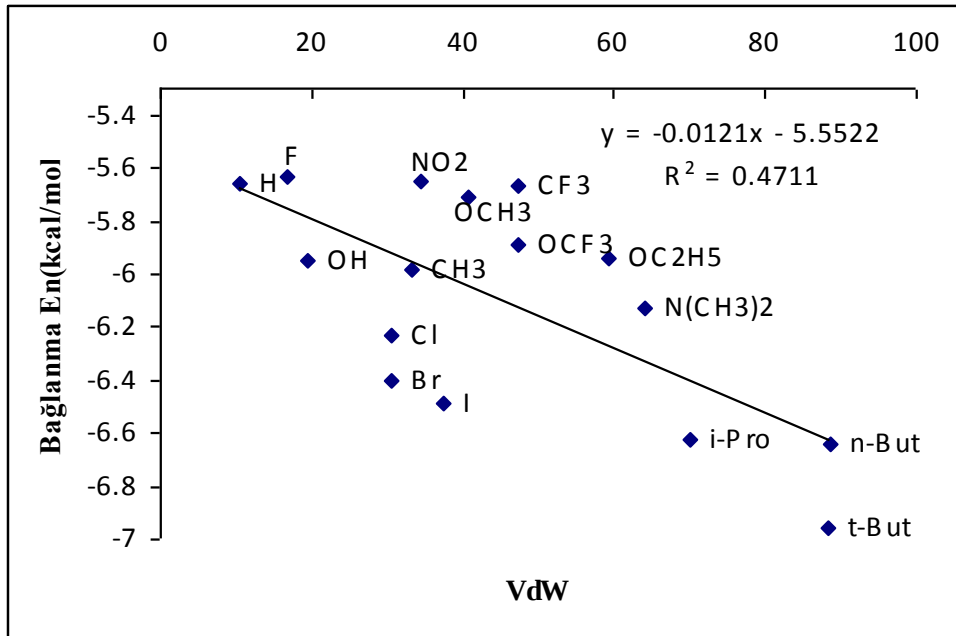
Tablo IV. 19 Docking İşlemi İle elde edilen Ki ve Bağlanma Enerjileri

	Ki/uM	Docking Bağlanma En (kcal/mol)	Aktif Bölge PM3 Bağlanma En (kcal/mol)	Elek-Subs σ
H	71.49	-5.7	-4.0	0
F	74.06	-5.6	-7.6	0.06
Cl	27.06	-6.2	-7.8	0.23
Br	20.41	-6.4	-8.1	0.39
I	17.52	-6.5	-1.9	0.18
OH	43.73	-5.9	-7.5	-0.37
CH₃	41.23	-6.0	-10.4	-0.17
OCH₃	65.5	-5.7	-9.4	-0.27
C₂H₅	11.48	-6.7		
OC₂H₅	44.12	-5.9	-23.7	-0.24
CF₃	69.7	-5.7	-6.5	0.54
OCF₃	48.33	-5.9	1.0	0.35
n-Büt	13.5	-6.6	-8.7	-1.63
ter-Büt	7.88	-7.0	-10.4	-2.78
izo-pro	14	-6.6	-10.6	-0.15
N(CH₃)₂	32.04	-6.1	-16.7	-0.83
NH₂	19.15	-6.4		
NO₂	72.51	-5.6	-8.0	0.78
COH	30.72	-6.2		
COOH	143.4	-5.2		

Yukarıdaki Tablo IV.19'de yer alan Docking bağlanma enerjilerinin σ değerlerine (Şekil IV. 38) ve Van der Waals hacmine (Şekil IV. 39) karşı grafikleri çizildi.



Şekil IV. 38 P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin AutoDock Hesaplamalarından Elde Edilen Bağlanma Enerjilerine Karşı Elektronik Süstitüent Etkisi Grafiği



Şekil IV. 39 P-Süstitüe Benzilamin Türevlerinin AutoDock Hesaplamalarından Elde Edilen Bağlanma Enerjilerine Karşı Van der Waals Hacmi Grafiği

BÖLÜM V

DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA

Bu tez çalışılmasında MAO A izo enzimi temel alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Bunun yanısıra, MAO B ve flavo enzim ailesindeki diğer enzimlerin katalizleme mekanizmalarına ışık tutabilecek küçük model yapılar da tasarlanıp modellenmiştir. Yapılan çalışmalar beş başlık altında toparlanabilir:

1. Doğal Enzim Optimizasyon Çalışmaları

Bu bölümde MAO A enziminin aktif bölgesini kapsayan bir yapı oluşturularak, substrat olarak seçilen benzilamin ve p-NO₂ benzilamin, reaksiyonun gerçekleştiği flavin yapısının re-yüzüne hareketi boyunca olan yolda ONIOM yöntemi ile modellendi. Elde edilen optimize yapılara tek nokta enerji hesabı yaptırılarak reaksiyon yolu boyunca substratın etkileştiği aminoasitlerin atom yükleri üzerindeki etkileri incelendi. Tyr407 ve Tyr444'ten oluşan aromatik kafesin oksitleme mekanizması üzerindeki etkileri incelendi. Yapılan hesaplamaların sonucunda substratın dik konformasyonun planar konformasyonundan daha kararlı olduğu; aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerinin konformasyonun benzilaminin flavine hareketi boyunca değiştiğini ve bu değişimin substrat için yolu genişlettiğini; Tyr444 aminoasidinin konformasyonun daha fazla değiştiği ve bunun sonucu olarak Tyr407'nin substrat ile daha fazla etkileşime girip amin N'unun yük değişimi üzerinde daha etkin olduğu bulunmuştur.

2. Aromatik Aminoasitlerin Mutasyon Çalışmaları

Benzilamin substratı flavine doğru ilerlerken aromatik kafesin içinden geçmek zorundadır. Literatürde deneysel olarak yapılmış aromatik kafesi oluşturan Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerine dair kinetik çalışmaların olması, MAO B için mutasyon çalışmalarının olması MAO A için de mutant enzimlerin modellenmesini gerektirdi. Dört farklı aminoasit ile Tyr407 ve Tyr444 aminoasitlerinin mutant enzimleri modellendi. Tyr444'ün mutasyonu amin N'unun elektronik yükünde doğal enzim hesaplamalarından elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında ciddi farklılıklar taşımazken Tyr407 mutasyonundan elde edilen sonuçlar

doğal enzim hesaplamalarının sonuçlarından farklılıklar göstermektedir. Bu Tyr407'nin substrat üzerindeki etkisini bir kez daha farklı bir yol ile ispatlamıştır.

3. Amin Oksitleme Mekanizmalarının İncelenmesi

Bu tez çalışmasının ağırlıklı konusunu amin oksitleme mekanizmaları oluşturmaktadır. Aktif bölgenin tamamının dahil edildiği, reaksiyon yolunun taranması ile yarı deneysel ve ONIOM yöntemi ile yapılan çalışmalarının yanında 17 atom içeren yüksek seviye yöntem çalışmalarına kadar bir çok yöntem ve model yapı ile çalışmalar yapılmıştır. Grubumuz tarafından en çok üzerinde durulan polar nükleofilik mekanizmanın yanında hidrür mekanizma da çalışmalarımıza dahil edilerek önerilen mekanizmaların kıyaslanması yapılmıştır. Ancak kullanılan yöntemlerin iki mekanizmayı birlikte modellemede eksik kalması, küçük model yapılar üzerinde çalışmak zorunda kalmamız, mekanizma çalışmalarında çok net bir şekilde katalizin hangi oksidasyon mekanizması üzerinden yürüdüğüne karar verebilmemizi güçleştirmiştir. Sadece PM6 yöntemi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar her iki mekanizmaya ait yapıları birlikte optimize etti. Sonuçlar incelendiğinde polar nükleofilik mekanizma için 36.6 kcal/mol'lük bir aktivasyon enerjisi bulunurken hidrür mekanizma için ise 34.48 kcal/mol'lük bir enerji değeri hesaplanmıştır. Ancak yüksek seviye yöntemlerde hidrür mekanizma 16-34 kcal/mol'lük aktivasyon bariyerleri ile daha olası görünmektedir.

4. Yeni Amin Oksitleme Mekanizmalarının Önerilmesi

X-ışını yapılarının aydınlatılması aktif bölge yapısındaki H₂O moleküllerinin hangi koordinatta, kaç tane olduklarını göstermiştir. Flavın yapısının re yüzünde substrat ve önemli amino asitler ile etkileşimde olan sekiz adet H₂O molekülü tespit edilmiştir. Bu moleküllerin oksitleme mekanizmasını kolaylaştırıcı bir etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. H₂O moleküllerinin yerleri değiştirilmeden sadece yönelmeleri H köprü bağı yapacak şekilde düzenlendiğinde aktivasyon enerjisini arttıran bir etki yapmıştır. Ayrıca, yeni bir mekanizma önerilerek polar mekanizmadaki H⁺ değişiminin H₂O üzerinden yürüdüğü bir model reaksiyon oluşturulmuştur. Aynı şekilde bu mekanizma için de çok sayıda model yapı ve yöntem çalışmaları yapıldı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde PM6 yöntemi ile 37 kcal/mol'lük bir aktivasyon enerjisi hesaplanırken daha küçük yapı ile daha yüksek seviye çalışmalarda bu değer yaklaşık 26 kcal/mol'lük değerlere inmektedir.

Önerilen bu yeni mekanizmanın yanında flavindeki karbonil grubu üzerinden yürüyebilecek literatürde yer almayan yeni bir mekanizma daha önerildi. Bu mekanizma da flavin yapısına olan H⁺ transferinin karbonil grubunun karbonunun daha fazla pozitif yük taşıması sebebiyle karbonil grubu üzerinden olabileceği fikrinden hareketle hazırlanmıştır. Bu

mekanizma da H₂O'lu ve H₂O'suz olmak üzere farklı yollar için iki yarı deneysel yöntem ile modellenmiştir. Tez çalışmasının başlangıcında çalışılan mekanizmaların hepsinin birlikte modellenemediği güvenilir bir yöntem bulma problemi yaşanmıştır, çünkü güvenilir bir yöntem olarak bilinen DFT (B3LYP/6-31+G**) yöntemi ile polar nükleofilik mekanizmaya ait durağan noktalar (geçiş konumu ve ara ürün) optimize edilememektedir. Son yıllarda geliştirilen PM6 yönteminin DFT yöntemine yakın sonuçlar verdiği literatürde raporlanmıştır [53, 54]. PM6 yöntemi ile çalışılan mekanizmaların hepsi modellenemediğinden karşılaştırma imkanı doğmuştur. Karbonil Mekanizmasının hız belirleme basamağı aktivasyon enerjisi yaklaşık 29 kcal/mol olarak bulunmuştur (Tablo IV.14). Polar nükleofilik ve hidrür mekanizmaları için ise hız belirleme basamağı aktivasyon enerjileri 34-37 kcal/mol (Tablo IV.10) arasında değişmektedir. Flavın ve benzilamin molekülleri kullanılarak yapılan bu modelleme sonuçlarına göre Karbonil Mekanizma'nın diğerlerinde daha olası olduğu anlaşılmaktadır. Ancak, MAO inhibitörleri arasında deneysel yöntemlerle yapılan araştırmalarda karbonil grubuna bağlanan bir inhibitör bilinmemektedir. Diğer yandan, deneysel QSAR çalışmalarına göre p-süstitüentlerin elektron çekme özelliği arttıkça enzimin katalizleme hızının artması Karbonil Mekanizma için de destekleyici bir kanıttır, çünkü burada da hız belirleme basamağında α C üzerinde negatif yük birikmektedir. Bu bulgular Karbonil Mekanizmanın da dikkate alınarak üzerinde daha detaylı çalışılması gerektiğini göstermektedir.

5. p-Süstitüe Benzilamin Türevleri ile Yapılan QSAR Çalışmaları

Benzilamin substratının para pozisyonunda $\bar{e}$ çeken ve veren grupların önerilen mekanizmaların üzerinde etkisi incelendi. Benzilamin 15 farklı süstitüent ile iki farklı model yapı ve yöntem ile çalışıldı. Aynı zamanda ilaç tasarımında sıkça başvuru alan, olası inhibitörlerin bağlanma enerjilerini hesaplayan “docking” yöntemi ile de enzimin tamamı alınarak p-süstitüe benzilamin türevleri enzime dok edildi. Deneysel çalışmaların mevcut olması elde edilen teorik verilerin deneysel veriler ile kıyaslanmasını sağlamıştır. Flavın ve benzilamin modelinden oluşan PM6 yöntemi ile yapılan çalışmalarda $\Delta G_1^\ddagger$ değerleri ile süstitüent etkisi(σ) arasındaki korelasyon $R^2=0.82$ 'lik bir değer olarak bulunmuştur. Şekil IV.34b'de görüldüğü üzere süstitüentin elektron çekme kuvveti arttıkça aktivasyon enerji engeli azalmaktadır. Edmondson ve grubunun kinetik deneylerinde de süstitüentin elektron çekme kuvveti arttıkça enzimatik tepkime sırasında flavinin indirgenme hızı artmakta olduğundan elde edilen korelasyon deneysel bulgulara uymaktadır. Bu bulgular, mekanizmanın hız belirleme basamağında α C üzerinde biriken negatif yükün elektron çeken

p-sübstitüent etkisi ile dağıtılarak geçiş konumunun kararlı hale dönüştüğü fikrini desteklemektedir. Enzimin tamamının dahil edildiği docking çalışmalarından elde edilen bağlanma enerjileri ile sübstitüent etkisi arasında ise en fazla 0.43'lük bir korelasyon ile önemli bir ilişki bulunamamıştır.

Enzimin tamamının dahil edildiği docking çalışmalarından elde edilen bağlanma enerjileri ile sübstitüent elektronik parametresi(σ) arasında zayıf bir ilişki ($R^2=0.43$) görülmektedir. Ancak, deneysel QSAR çalışmasında bağlanma enerjisi ile sigma arasındaki ilişki araştırılmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Diğer yandan, sübstitüentin bağlanma enerjisi ile Van der Waals hacmi arasında gözlenen ($R^2=0,47$) korelasyon zayıf olmasına rağmen deneysel verilerle tamamen örtüşmektedir [12]. Şekil IV. 39'da görüldüğü gibi, sübstitüentin kapladığı hacim arttıkça substrat enzime daha sıkı bağlanmaktadır. Bu ilişki, MAO A enziminin geniş bir substrat bağlanma bölgesine sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim kristal yapıları incelendiğinde, MAO B aktif bölgesinin dar ve uzun, MAO A'ninkinin ise daha geniş olduğu görülmüştür. Elde edilen korelasyonlar, diğer istatistiksel parametreler de dikkate alınarak daha detaylı incelenecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Bach, A. W. J.; Lan, N. C.; Abell, C. W.; Bembenek, M. E.; Kwan, S. W.; Seeburg, P. H.; Shih, J. C.: 'cDNA Cloning of Human Liver Monoamine Oxidase A and B: Molecular Basis of Differences in Enzymatic Properties', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85 (1988) 4934.
- [2] X. Lu, M. Rodriguez, H. Ji, R. B. Silverman, A. P. B. Vintem, R. R. Ramsay, in *Flavins and Flavoproteins 2002*, eds. S. Chapman, R. Perham and N. Scrutton, *Rudolf Weber Agency for Scientific Publications*, Berlin, (2002), p.817.
- [3] L. De Colibus, M. Li, C. Binda, A. Lustig, D. E. Edmondson and A. Mattevi, "Three-Dimensional Structure of Human Monoamine Oxidase A(MAO-A): Relation to the Structures of Rat MAO and Human MAO-B", *PNAS*, (2005), 102, 12684-12689:
- [4] R. K. Nandigama, J. R. Miller and D. E. Edmondson, *Biochemistry*, 40, (2001), 14839-14846.
- [5] Knoll, J.: 'Pharmacological basis of the therapeutic effect of (-) deprenyl in age-related neurological diseases', *Med. Res. Rev.*, 12 (1992) 505.
- [6] Yu, J.: "Synthesis and mechanistic studies on the monoamine oxidase (MAO) catalyzed oxidation of 1,4-disubstituted-1,2,3,6-tetrahydropyridines", *PhD Thesis*, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA, (1998) 13-26.
- [7] Rinne, U. K.: "Recent advances in research on Parkinsonism", *Acta Neurol Scand Suppl.*, 67 (1978) 77.
- [8] Tetrad, V. W.; Langston, J. W.: "The effect of deprenyl on the natural history of Parkinson's disease", *Science*, 245 (1989) 519
- [9] Erdem, S. S.; Karahan, Ö.; Yıldız, İ. and Yelekçi, K.: "A Computational Study on the Amine-Oxidation Mechanism of Monoamine Oxidase: Insight to the Polar Nucleophilic Mechanism", *Organic&Biomolecular Chemistry*, 4, (2006), 646-658.
- [10] Edmondson, D. E.; Mattevi, A.; Binda, C.; Li, M. and Hubalek, F.: *Current Medicinal Chemistry*, 11, (2004), 1983-1993.

- [11] Edmondson, D. E.; Mattevi, A.; Binda, C.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464, **(2007)** 269-276.
- [12] Miller, J.R.; Edmondson, D.E.: "Structure-Activity Relationships in the Oxidation of Para-Substituted Benzylamine Analogues by Recombinant Human Liver Monoamine Oxidase A", *Biochemistry.*, 38 **(1999)** 13670.
- [13] Binda, C.; Li, M.; Hubalek, F.; Retselli, N.; Edmondson, D. E. and Mattevi, A.: "Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high resolution crystal structures", *PNAS*, 100 **(2003)** 9750-9755.
- [14] Li, M.; Binda, C.; Mattevi, A.; and Edmondson, D. E.: "Functional role of the "aromatic cage" in human monoamine oxidase B: Structures and catalytic properties of Tyr435 mutant proteins", *Biochemistry*, 45 **(2006)** 4775-4784.
- [15] Akyüz, M. A.; Erdem, S. S.; and Edmondson, D. E.: *J. Neural Transm.*, 114 **(2007)** 693-698.
- [16] Erdem, S. S.; Yelekçi, K.: *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 572 **(2001)** 97-106.
- [17] Daprigh, S.; Komaromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J.: "A New ONIOM Implementation in Gaussian98. Part I. The Calculation of Energies, Vibrational Frequencies and Field Derivatives", *Theochem*, 1-21 **(1999)** 461-462.
- [18] Champe, P. C.; Harvey, R. A.: *Biyokimya* , Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, **(1997)** 47-58.
- [19] Lehninger, A. L.: *Principles of Biochemistry*, *Worth Publishers, Inc.*, New York , USA **(1986)** 95-274.
- [20] Silverman, R. B.: *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Sec. Ed. *Elsevier Academic press*, London, UK **(2004)**
- [21] Bugg, T.D.H.: *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, *Second Edition Blackwell Publishing* , UK **(2004)**
- [22] Silverman, R. B.: "Radical Ideas About Monoamine Oxidase", *Acc. Chem. Res.*, 28 **(1995)** 335-342.
- [23] Silverman, R. B.: *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, *Academic press*, London, UK **(1992)**
- [24] Binda, C.; Newton-Vinson, P.; Hubalek, F.; Li, M.; Edmondson, D.E.; Mattevi, A.: "Structure of Human Monoamine Oxidase B, a Drug Target for the Treatment of Neurological Disorders" *Nat.Struct.Biol.*, 9 **(2002)** 22-26.

- [25] Bach, A. W. J.; Lan, N. C.; Abell, C. W.; Bembenek, M. E.; Kwan, S. W.; Seeburg, P. H.; Shih, J. C.: “cDNA Cloning of Human Liver Monoamine Oxidase A and B: Molecular Basis of Differences in Enzymatic Properties”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85 **(1988)** 4934.
- [26] Gaál, J.; Hermecz, I.: Pharmacology and Clinical Use in Neurodegenerative Disorders, In *Inhibitors of Monoamine Oxidase B*, Szelenyi, I., Ed.: Birkhauser, Boston, Berlin, **(1993)**
- [27] Hubalek, F.; Binda, C.; Khalil, A.; Li, M.; Mattevi, A.; Castagnoli, N.; and Edmondson, D. E.: “Demonstration of isoleucine 199 as a structural determinant for the selective inhibition of human monoamine oxidase B by specific reversible inhibitors” *J. Biol. Chem.*, 280 **(2005)** 15761–15766.
- [28] Edmondson, D. E.; Binda, C.; Wang, J.; Upadhyay, A. K. and Mattevi, A.: “Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases”, *Biochemistry*, 48 **(2009)** 4220–4230.
- [29] Edmondson, D. E.; Binda, C.; Mattevi, A.: “The FAD Binding Site of Human Monoamine Oxidase A and B”, *Neuro Tox.*, 25 **(2004)** 63-72.
- [30] Binda, C.; Mattevi, A.; Edmondson, D. E.: “Structure-Function Relationships in Flavoenzymedependent Amine Oxidations”, *The J. of Biol. Chem.*, 277 **(2002)** 23973-23976.
- [31] Trickey, P.; Basran, J.; Lian, L. Y.; Chen, Z.; Barton, J. D.; Sutcliffe, M. J.; Scrutton, N. S.; Mathews, F. S.: “Structural and Biochemical Characterization of Recombinant Wildtype and a C30A Mutant of Trimethylamine Dehydrogenase from *Methylophilus methylotrophus*”, *Biochemistry*, 39 **(2000)** 7678-7688.
- [32] Edmondson, D.; Binda, C.; Mattevi, A.: “Structural Insights Into The Mechanism of Amine Oxidation by Monoamine Oxidase A and B”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 464 **(2007)** 269-276.
- [33] Walker, M. C.; Edmondson, D. E.: “Structure-activity relationships in the oxidation of benzylamine analogues by bovine liver mitochondrial monoamine oxidase B”, *Biochemistry*, 33 **(1994)** 7088.
- [34] Miller, J. R.; Edmondson, D. E.; Grissom, C. B.: “Mechanistic Probes of Monoamine Oxidase B Catalysis: Rapid-Scan Stopped Flow and Magnetic Field Independence of the Reductive Half-Reactions”, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 **(1995)** 7830.

- [35] Castagnoli, N. Jr.; Kuttub, S.; Rimoldi, A. J.; Anderson, A; Bloomquist, J.; Castagnoli, K.: “Dopaminergic Neurotoxicity: Chemical and Biological Requirements”, The Role of The Environment in Parkinson’s Disease Workshop, Research Triangle Park, North Carolina, September 18-19, **(1995)**
- [36] Scrutton, N., S: “Chemical aspects of amine oxidation b flavoprotein enzymes”, *Nat. Prod. Rep.*, 21 **(2004)** 722-730.
- [37] Paul F. Fitzpatrick: Oxidation of amines by flavoproteins Archives of Biochemistry and Biophysics 493 **(2010)** 13-25.
- [38] Paul F. Fitzpatrick: “Carbanion versus Hydride Transfer Mechanisms in Flavoprotein- Catalyzed Dehydrogenations”, *Bioorganic Chem.*, 32 **(2004)** 125-139.
- [39] Kim, J. M.; Bogdan, M. A.; Mariano, P. S.: “Mechanistic Analysis of the 3-methylflavin-promoted Oxidative Deamination of Benzylamine. A Potential Model for Monoamine Oxidase Catalysis”, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 **(1993)** 1059.
- [40] Kim, J. M.; Bogdan, M. A.; Mariano, P. S.: “Flavin Chemical Models for Monoamine Oxidase Inactivation by Cyclopropylamines, α -Silylamines, and Hydrazines”, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 **(1995)** 100.
- [41] Yu, J.: “Synthesis and mechanistic studies on the monoamine oxidase (MAO) catalyzed oxidation of 1,4-disubstituted-1,2,3,6- tetrahydropyridines”, *PhD Thesis*, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, USA, **(1998)** 13-26.
- [42] Walker, M. C.; Edmondson, D. E.: “Structure-activity relationships in the oxidation of benzylamine analogues by bovine liver mitochondrial monoamine oxidase B”, *Biochemistry*, 33 **(1994)** 7088.
- [43] Erdem, S.: “Hesapsal Organik Kimya Ders Notları”, **(2006)**
<http://fbe.marmara.edu.tr> (2006)
- [44] Levine, I. N.: Quantum Chemistry Fifth Edition; Prentice Hall, New Jersey, USA, **(2006)**
- [45] Erkişi A.: “Bazı Bileşiklerin Elektronik ve Titreşim Özelliklerinin Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi İle İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, **(2007)**
- [46] Jensen, F.: Introduction To Computational Chemistry, Wiley, London, UK, **(1999)** 70.
- [47] Parr, R. G.; Yang, W.: Density-Functional Theory of Atoms and Molecules, Oxford University Pres, Newyork, USA, **(1999)**

- [48] Parr, R. G.; Yang, W.: *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press, Newyork, USA, **(1989)**
- [49] Gürünlü, H.: “Kübik Gan (001) Yüzeyinin Elektronik Yapısı”, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,Türkiye, **(2008)**
- [50] Erdoğan, E.: “4-Benzilpiperidin Molekülünün Titreşimlerinin Teorik Yöntemler İle İncelenmeleri”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, **(2007)**
- [51] Hehre, W.J.; Radom, L.; Schleyer, P.v.R.; Pople, J.A.: “Ab Initio Molecular Orbital Theory”, 1 st Ed, Wiley-Interscience Publication, New York, USA, **(1986)** 350-359.
- [52] Lowe, J. P.: “Quantum Chemistry”, *Academic Press*, New York, USA **(1978)**
- [53] Stewart, J. J. P.: “Application of the PM6 method to modeling the solid state”, *J Mol Model*, 14(6) **(2008)** 499–535.
- [54] <http://openmopac.net/MOPAC2009brochure.pdf>
- [55] Joshi, Y. V.; Thomson, K. T.: “Embedded Cluster (QM/MM) Investigation of C6 Diene Cyclization in H2SM-5”, *Journal of Catalysis*, 230 **(2005)** 440-463.
- [56] Karadakov, P. B.; Morokuma, K.: “ONIOM as an Efficient Tool for Calculating NMR Chemical Shielding Constants in Large Molecules”, *Chemical Physics Letters*, 317 **(2000)** 589–596.
- [57] <http://mgl.scripps.edu/people/gmm/# DOCKING>
- [58] Lengauer, T; Rarey, M: "Computational methods for biomolecular docking". *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6** (3) **(1996)** 402–406.
- [59] Kitchen, D. B.; Decornez H; Furr, J. R.; Bajorath, J.: “Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications”, *Nature reviews. Drug discovery* 3 (11) **(2004)** 935–49.
- [60] Kearsley, S.K.; Underwood, D.J.; Sheridan, R.P.; Miller, M.D.: “Flexibases: a way to enhance the use of molecular docking methods” *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **8** (5) **(1994)** 565–82.
- [61] Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren. T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; Shaw, D.E.; Francis, P.; Shenkin, P.S.: “Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy”, *J. Med. Chem.*, 47 (7) **(2004)** 1739–49.
- [62] Wang, Q.; Pang, Y.P.: “Preference of small molecules for local minimum conformations when binding to proteins”, *PLoS ONE*, 2 (9) **(2007)**

- [63] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, J. T.; Kudin, Burant, K. N. J. C. Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Ortiz, J. V.: "Gaussian 03", *Gaussian, Inc.*, Pittsburgh PA, **(2003)**
- [64] Gaussian 09, Revision **A.1**, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian, Inc.*, Wallingford CT, **2009**.
- [65] Chen, X.; Qiao, Q.A.; Jin, Y.Q.; Jing, J.; Liu, Q.W.; Sun, L.X.; Wang, M.S.; Yang, C.L.: "Theoretical study of the scavenging mechanism to 1,4-dicarbonyls by pyridoxamine: The water-assisted reaction", *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 911 **(2009)** 70-74.
- [66] Qiao, Q.A.; Cai Z.T.; Feng, D.C.; Jiang, Y.S.: "A quantum chemical study of the water-assisted mechanism in one-carbon unit transfer reaction catalyzed by glycineamide ribonucleotide transformylase", *Biophysical Chemistry* 110 **(2004)** 259–266.

- [67] Li, Q.G.; Xue, Y.; Yan, G.S.: “Water-assisted enol-to-keto tautomerism of a simple peptide model: A computational investigation”, *Journal of Molecular Structure THEOCHEM*, 868 (2008) 55–64.
- [68] Markov, N.; Enchev, V.: “Water-assisted proton transfer in formamide, thioformamide and selenoformamide”, *Journal of Molecular Structure Theochem*, 679 (2004) 195–205.
- [69] Guo, Z.; Lin, X.; Zhao, C.; Phillips, D.L.: *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 848 (2008) 119–127.
- [70] Yıldız İ.: “Mono Amin Oksidaz Enziminin Ekleme Eliminasyon Mekanizmasının Hesapsal Yöntemler İle İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (2003)
- [71] Karahan Ö.: “Mono Amin Oksidaz Enziminin Aminleri Oksitleme Mekanizmasının Hesapsal Yöntemler İle İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (2004)
- [72] Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C.: “A new hybrid exchange–correlation functional using theCoulomb-attenuating method (CAM-B3LYP)”, *Chemical Physics Letters* 393 (2004) 51–57.
- [73] Chai, J.D.; Gordon, M.H.: “Systematic optimization of long-range corrected hybrid density functionals”, *The Jour. Of Chem. Phy*, 128 (2008) 84-106.
- [74] Chai, J. D.: “Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom-Atom Dispersion Corrections”, *Lawrence Berkeley National Laboratory: Lawrence Berkeley National Laboratory*, (2009)
- [75] Shao, Y.; Molnar, L.F.; Jung, Y.; Kussmann, J.; Ochsenfeld, C.; Brown, S.T.; Gilbert, A.T.B.; Slipchenko, L.V.; Levchenko, S.V.; O’Neill, D.P.; DiStasio Jr., R.A.; Lochan, R.C.; Wang, T.; Beran, G.J.O.; Besley, N.A.; Herbert, J.M.; Lin, C.Y.; Van Voorhis, T.; Chien, S.H.; Sodt, A.; Steele, R.P.; Rassolov, V.A.; Maslen, P.E.; Korambath, P.P.; Adamson, R.D.; Austin, B.; Baker, J.; Byrd, E.F.C.; Dachsel, H.; Doerksen, R.J.; Dreuw, A.; Dunietz, B.D.; Dutoi, A.D.; Furlani, T.R.; Gwaltney, S.R.; Heyden, A.; Hirata, S.; Hsu, C-P.; Kedziora, G.; Khalliulin, R.Z.; Klunzinger, P.; Lee, A.M.; Lee, M.S.; Liang, W.Z.; Lotan, I.; Nair, N.; Peters, B.; Proynov, E.I.; Pieniazek, P.A.; Rhee, Y.M.; Ritchie, J.; Rosta, E.; Sherrill, C.D.; Simmonett, A.C.; Subotnik, J.E.; Woodcock III, H.L.; Zhang, W.; Bell, A.T.; Chakraborty, A.K.; Chipman, D.M.; Keil, F.J.; Warshel, A.; Hehre, W.J.; Schaefer, H.F.; Kong, J.;

- Krylov, A.I.; Gill, P.M.W.; and Head-Gordon, M.: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8** (2006) 3172.
- [76] Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S. and Olson, A. J.: *J. Comput. Chem.* in press. "Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility." (2009)
- [77] Hansch, C.; Leo, A. And Hoekman, D.: *Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*, ACS, Washington, USA, (1995)

ÖZGEÇMİŞ

1980 tarihinde İstanbul’da doğdu. İlköğrenimini İcadiye İlköğretim Okulu’nda, orta ve lise öğrenimini Üsküdar Kız Lisesi’nde tamamladı. 1997-2001 yılları arasında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği’nde eğitim gördü. 2001-2003 yıllarında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde, Kimya A.B.D. Fiziko Kimya programında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2004-2005 eğitim yılında Haydarpaşa Anadolu Teknik Lisesi’nde vekil kimya öğretmeni olarak görev yaptı. 2005 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde, Kimya A.B.D. Organik Kimya programında doktora eğitimine başladı.