

**HIV-1 GLİKOPROTEİN 41 MOLEKÜLÜNÜN AKTİF
BÖLGESİNİN SUBSTRAT-BAĞLAYICI ALANININ
MOLEKÜLER KENETLENME YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

**EXPLORATION OF SUBSTRATE-BINDING REGION OF THE
ACTIVE SITE OF HIV-1 GLYCOPROTEIN 41 MOLECULE
USING MOLECULAR DOCKING METHODS**

ONUR ALTEN

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

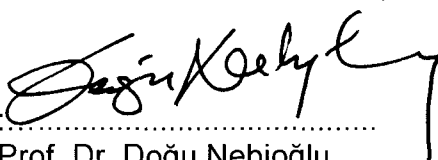
2011

ANKARA

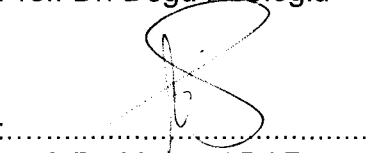
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

Başkan


Prof. Dr. Doğu Nebioğlu

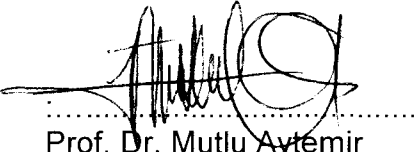
Üye (Danışman)


Prof. Dr. Vildan ADAR

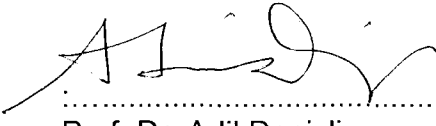
Üye


Prof. Dr. Canan Ünaleroğlu

Üye


Prof. Dr. Mutlu Aytemir

Üye


Prof. Dr. Adil Denizli

ONAY

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

Prof.Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

HIV-1 GLİKOPROTEİN 41 MOLEKÜLÜNÜN AKTİF BÖLGESİNİN SUBSTRAT-BAĞLAYICI ALANININ MOLEKÜLER KENETLENME YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

ONUR ALTEN

ÖZ

HIV'in hücreye giriş mekanizmasında etkin olan yapılardan birisi glikoprotein 41 molekülüdür. Bu glikoprotein HIV virüsünün konak hücreye girişinde etkin rol oynamaktadır. Glikoprotein 41 molekülünün bloke edilmesi sayesinde HIV virüsünün hücre içine girişi ve hücre içinde yayılmasına engel olunabilecektir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda HIV girişine yönelik keşfedilmiş ve satışa sunulmuş olan tek ilacın (Fuzeon) peptid yapılı olması ve dolayısıyla büyük molekül ağırlığına sahip olması ilacın oral yolla kullanımını engellemektedir. Ayrıca büyük peptid yapılı ilacın kullanım maliyetide yüksektir. Bu sebeplerden ötürü peptid yapılı olmayan, küçük ve gp 41 molekülünü hedef alan ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, gp 41 molekülünün hidrofobik cep bölgesinin hedef bölge olabileceğini ve küçük moleküllerle etkileşebileceğini ortaya koymuştur.

Protein data banktan (PDB) alınan bilgiler ışığında gp 41 ile ilgili 170 adet yapı olduğu görülmüştür (Gochin et al., 2010). Bu yapıların hiçbirisi glikoprotein 41 molekülünün tam zincirini içermemektedir. Protein veribankasında yer alan gp 41 ile ilgili X-ışını yapıları gp 41'in NHR ve CHR bölgelerinden türetilen sentetik C-peptid ve N-peptid yapılara aittir. Gp 41 ile ilgili X-ışını yapılarından henüz hiçbirisi gp 41'in küçük molekülle birlikte bulunduğu kristalize kompleks yapıyı bulundurmamaktadır.

Yapılan çalışmanın ilk bölümünde moleküler kenetlenme yöntemi kullanılarak potansiyel HIV inhibitörü olan A_{12} ligandının farklı HIV gp 41 monomer, trimer ve pentamer yapılarıyla etkileşimi Autodock vina programı ile araştırılmıştır. Bunun için protein veribankasından alınan HIV gp 41 NHR yapılarından **2zzo** monomer, **2q7c** trimer, **2r5d** trimer, **1aik** ise hem trimer hem de pentamer olarak kullanılmıştır. Bu sayede A_{12} ligandının monomer, trimer ve pentamer yapılara

bağlanma isteği ve bu yapılarla etkileşimi incelenmiştir. Hesaplamalar sonucunda A12 ligandının gp 41 NHR pentamer yapısı ile monomer ve trimer yapıya göre daha iyi etkileşim verdiği bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise ZINC veritabanından görsel ligand taraması sonucunda elde edilen yeni yapıların en uygun gp 41 yapısı ile kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 210 ligandın sanal ligand taraması sonucunda tespit edilen ve yapısında pirol halkası içeren ilk 20 bileşiğin (ZINC 20030467, ZINC02301313, ZINC02936435, ZINC00636696 v.s kodlu) potansiyel HIV gp 41 inhibitörü olabileceği bulunmuştur.

Yapılan hesaplamaların neticesinde elde edilen verilerin gelecekte tasarlanacak ve gp 41'in hidrofobik bölgesiyle etkileşim gösterecek yeni küçük ve potansiyel moleküllere katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Sözcükler: HIV, Moleküler kenetlenme, Glikoprotein 41, Hidrofobik bölge, A₁₂, Görsel ligand taraması

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

EXPLORATION OF SUBSTRATE-BINDING REGION OF THE ACTIVE SITE OF HIV-1 GLYCOPROTEIN 41 MOLECULE USING MOLECULAR DOCKING METHODS

ONUR ALTEN

ABSTRACT

Glycoprotein 41 molecule has an important role entering HIV to a host cell since glycoprotein 41 is one of the effective structure in entry mechanism of HIV in to the cell. As a result of the blockade of the gp 41 natural outcome of entering and spreading of HIV in to a cell can be inhibited.

Present studies show that the discovered and marketed only drug (Fuzeon) is a peptide structure and it has high molecular weight, therefore prevents orally usage of the drug. Also, the usage cost of this drug is high. Due to all these, non-peptide and targeted to gp 41 molecule drug is needed. Lately investigations show that the hydrophobic pocket area of gp 41 can be a target area for small molecule, thus can interact with small molecule.

According to information from protein data bank (PDB), 170 structures would be observed as related to gp 41. None of these structures contain complete chain of gp 41. The X-ray structure related to gp 41 existing in protein data bank, are belong to synthetic C-peptide and N-peptide derived from the NHR and CHR regions of gp 41. None of the X-ray structures related to gp 41 exist the crystalline complex structure containing small molecule with gp 41.

The first part of the made study, by using molecular docking method, potential HIV inhibitor of A_{12} interaction with different gp 41 monomer, trimer and pentamer structures with Autodock vina software were investigated. Hence, HIV gp 41 NHR structures taken from protein data bank were used **2zzo** as monomer, **2q7c** as trimer, **2r5d** as trimer, **1aik** as both trimer and pentamer. Thus, the binding affinity and interaction of A_{12} ligand with monomer, trimer and pentamer structures were examined. The result of calculation, A_{12} ligand gives better interaction with gp 41 NHR pentamer than the monomer and trimer.

The second part of the made study includes that, new structures which are obtained from ZINC database and virtual ligand screening result, the molecular docking study with most appropriate gp 41 structure were actualized. After virtual ligand screening of 210 ligand, which containing pyrrole ring (ZINC 20030467, ZINC02301313, ZINC02936435, ZINC00636696 etc. code) were determined as potential HIV gp 41 inhibitors.

The results obtained from this study will contribute for designing in future, interaction with gp 41 hydrophobic pocket, new small and potential molecules.

Keywords: HIV, Molecular docking, Glycoprotein 41, Hydrophobic pocket, A₁₂, Virtual ligand screening

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

TEŞEKKÜR

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

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

Bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan Dr. Asim Kumar Debnath, Yun Liao, Dr.Florent Barbault ve Dr.Shibo Jiang'a

Dostlukları ve sonsuz destekleri için değerli arkadaşlarım Merve Senem Avaz'a, Araşt. Gör. Deniz Sarıgöl ve Tayfun Vural'a, Fırat Kayabaşı, Ömer Arslan ve Emre Toprak'a

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölümü çalışanlarına;

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

Ve son olarak, tüm hayatım boyunca bana olan inançlarını asla kaybetmeyip desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan ve beni bu günlere getiren aileme; sevgili annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ONUR ALTEN

DİZİN

Sayfa Numarası

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
DİZİN	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEMEL BİLGİLER	3
2.1 Virüsler ve viral hastalıklar.....	3
2.2 Virüslerin yapısı	5
2.3 HIV ve AIDS nedir?	6
2.3.1 HIV yapısı.....	8
2.3.2 HIV replikasyonu	9
2.3.2.1 Spesifik hücre yüzey reseptörüne bağlanma.....	10
2.3.2.2 Virüsün hücreye girişi	10
2.3.2.3 Viral RNA'nın revers transkripsiyonu	10
2.3.2.4 Provirüsün konak hücre DNA 'sına integrasyonu	10
2.3.2.5 Konak hücre aktivasyonu	11
2.3.2.6 Viryonun tomurcuklanıp ayrılması	11
2.4 HIV giriş hedef yapıları	11
2.4.1 Glikoprotein 41	13
2.4.2 Glikoprotein 41 inhibitörü: Enfuvirtide	16
2.4.3 Enfuvirtide kimyasal yapısı	17
2.4.4 Enfuvirtidenin etki mekanizması	18
2.5 Gp 41 aday inhibitörler	21
2.5.1 Peptit inhibitörler.....	21
2.5.2 Non-peptit inhibitörler	23
2.6 Gp 41 kenetlenme çalışmaları literatür özeti	25
2.7 Protein veritabanı	27

2.8 Bilgisayar- destekli ilaç tasarımı	28
2.9 Moleküler kenetlenme	28
2.9.1 Moleküler kenetlenme yazılımları	29
2.9.1.1 Autodock 4.0	29
2.9.1.2 GOLD	29
2.9.1.3 FlexX	30
2.9.1.4 Dock	30
2.10 Görsel ligand taraması	30
3. MATERYALLER VE METOTLAR	32
3.1 Kullanılan donanımlar	32
3.2 Kullanılan yazılımlar	32
3.2.1 ZINC veritabanı	32
3.2.2 UCSF Chimera	32
3.2.3 Pymol	33
3.2.4 Autodock	33
3.2.5 Raccoon	33
3.2.6 Cygwin	33
3.2.7 Gaussssian	33
3.2.8 Chemoffice	34
3.2.9 Autodock Vina	34
3.3 Çalışma aşamaları	36
3.3.1 Protein veribankasından gp 41 ile ilgili yapıların seçilmesi	36
3.3.2 Ligand molekülü A ₁₂ 'nin hazırlanması	38
3.3.3 HIV giriş yapılarının hazırlanması	40
3.3.3.1 2zzo monomer NHR yapısının hazırlanması	40
3.3.3.2 2q7c trimer NHR yapısının hazırlanması	41
3.3.3.3 2r5d trimer NHR yapısının hazırlanması	42
3.3.3.4 1aik trimer NHR yapısının hazırlanması	44
3.3.3.5 1aik pentamer NHR yapısının hazırlanması	45
3.3.4 Görsel ligand taraması	47
4. SONUÇLAR	50
4.1 HIV gp 41 hedeflerinin A ₁₂ ligandı ile moleküler kenetlenme sonuçları ...	50
4.2 Yeni HIV Giriş İnhibitörleri için görsel ligand taraması sonuçları	57
5. YORUMLAR ve ÖNERİLER	64

KAYNAKLAR DİZİNİ	68
EKLER DİZİNİ.....	72
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa Numarası

Şekil 2.1 Viral enfeksiyonlara bakış	3
Şekil 2.2 İki temel virüs tipinin şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.3 Akut HIV enfeksiyonlarının bulguları	7
Şekil 2.4 HIV yapısı	8
Şekil 2.5 HIV yaşam döngüsü	9
Şekil 2.6 Glikoprotein 41 yapısı	14
Şekil 2.7 Enfuvirtide gösterimi	16
Şekil 2.8 Enfuvirtide'nin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.9 Enfuvirtide'nin etki mekanizması ve HIV –hücre füzyon basamakları	19
Şekil 2.10 Glikoprotein 41 oligomerinin katlanarak 6-sarmal yapıya dönüşümü	20
Şekil 2.11 Glikoprotein 41 C-ve N-peptit demeti.....	21
Şekil 2.12 Gp 41 molekülü ve NHR ile CHR peptitlerinin dizilimi.....	22
Şekil 2.13 Gp 41 hedefli küçük molekül anti-HIV bileşiklerinin kimyasal yapıları.....	23
Şekil 2.14 Protein veritabanı web sayfası.....	27
Şekil 2.15 Proteine kenetlenen küçük molekül gösterimi.....	28
Şekil 3.1 Autodock Vina için hazırlanan tipik konfigürasyon dosyası örneği.	35
Şekil 3.2 Autodock Vina çoklu ligand dosyaları için kenetlenmeyi başlatma komutu	35
Şekil 3.3(a) Chemdraw programında çizilen A ₁₂ ligandının görünümü (b) A ₁₂ Ligandının Gaussian programında optimizasyon sonrası görünümü	39
Şekil 3.4 A ₁₂ ligandının Autodock tools kullanılarak hazırlanması. Molekülün torsiyon sayısının tespit edilmesi.....	39
Şekil 3.5 Monomer 2zzo yapısının görünümü	40
Şekil 3.6 2zzo monomer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği	41
Şekil 3.7 Trimer 2q7c yapısının görünümü	41
Şekil 3.8 2q7c trimer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği.....	42
Şekil 3.9 Trimer 2r5d yapısının görünümü	43
Şekil 3.10 2r5d trimer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği dönüşümü	43

Şekil 3.11 Trimer 1aik yapısının görünümü	44
Şekil 3.12 1aik trimer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği	45
Şekil 3.13 Pentamer 1aik yapısının görünümü	45
Şekil 3.14 1aik pentamer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği	46
Şekil 3.15 ZINC veritabanının web sayfasında molekül arama seçenekleri .	47
Şekil 3.16 ZINC veritabanının web sayfasında A12 ligandı için molekül arama seçenekleri	48
Şekil 3.17 ZINC veritabanında araştırma sonucunda ulaşılan moleküllerden bazılarının kimyasal özellikleri ve sağlayıcı yerleri gösteren web sayfası.....	49
Şekil 4.1a 2zzo monomerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü	51
Şekil 4.1b 2q7c trimerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü	51
Şekil 4.1c 2r5d trimerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü	51
Şekil 4.1d 1aik trimerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü	51
Şekil 4.1e 1aik pentamerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü	51
Şekil 4.2(a) A12 ile 2zzo NHR monomer etkileşiminin iki boyutlu görünümü(b)Etkileşimin üç boyutlu görünümü	52
Şekil 4.3(a) A12 ile 2q7c NHR trimer etkileşiminin iki boyutlu görünümü(b)Etkileşimin üç boyutlu görünümü	53
Şekil 4.4(a) A12 ile 2r5d NHR trimer etkileşiminin iki boyutlu görünümü(b)Etkileşimin üç boyutlu görünümü	54
Şekil 4.5(a) A12 ile 1aik NHR trimer etkileşiminin iki boyutlu görünümü(b)Etkileşimin üç boyutlu görünümü	55
Şekil 4.6(a) A12 ile 1aik NHR pentamer etkileşiminin iki boyutlu görünümü(b)Etkileşimin üç boyutlu görünümü	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa Numarası

Tablo 2.1 HIV giriş inhibitörleri.....	12
Tablo 2.2 Kenetlenme yazılımlarının protein ve ligand esnekliğine göre ayrımı	30
Tablo 3.1 Glikoprotein 41molekülü ile ilgili pdb yapıları	37
Tablo 4.1 Farklı biyolojik birimlere göre A ₁₂ ligandının Autodock Vina ile hesaplanan bağlanma afiniteleri	57
Tablo 4.2 Sanal Ligand taraması sonucu keşfedilen ligandların yapısı ve bağlanma afiniteleri	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
HIV	Human immunodeficiency virus
Gp 41	Glikoprotein 41
Gp 120	Glikoprotein 120
Gp 160	Glikoprotein 160
X-Ray	X-ışınları
NMR	Nükleer magnetik rezonans
MS	Milattan sonra
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
p24	Temel kapsit protein
p7/p9	Nükleokapsit protein
p17	Dış matriks protein
CD4	İmmün sisteminin bir parçası olan reseptörlere sahip hücreler
CCR5	T- hücreleri üzerinde bulunan bir reseptör
CXCR4	T- hücreleri üzerinde bulunan bir reseptör
kD	Kilo dalton
NHR	N- heptad repeat
CHR	C- heptad repeat
PDB	Protein data bank
FDA	Food and Drug Administration
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartik asit
Cys	Sistein
Glu	Glutamik asit
Gln	Glutamin
Gly	Glisin
His	Histidin
Ile	İzolösin

Leu	Lösin
Lys	Lizin
Met	Metionin
Phe	Fenilalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
Val	Valin
C	Karbon
H	Hidrojen
O	Oksijen
N	Azot
CH ₃ CO-	Asetil
Phe-	Fenil
NH ₂ -	Amino
HR1	Heptad repeat 1
HR2	Heptad repeat 1
IC ₅₀	50% Inhibitory concentration
NB-2	N-(4-karboksi-3-hidroksi) fenil-2,5-dimetilpirol
NB-64	N-(3-karboksi-4-kloro) fenilpirol
RMSD	Root mean square deviation
DFT	Density functional theory
H-bağı	Hidrojen bağı
Å	Angstrom
kcal	Kilo kalori
mol	Molekül

1. GİRİŞ

HIV virüsünün hücreye giriş aşaması son yıllarda AIDS tedavisindeki temel hedef bölgelerinden birisidir. Virüsün hücreye girişi engellendiği takdirde giriş aşamasından sonraki bölgelere yönelik hedef moleküllere ihtiyaç azalabilecek ve daha etkili tedavi yöntemleri ortaya çıkabilecektir. Fakat HIV virüsünün giriş bölgesiyle ilgili olan çözülmüş X-ray yapısında inhibitör yer almaması bir dezavantaj olup çalışmalarda güçlük yaratmaktadır.

AIDS tedavisinde kullanılan ve HIV giriş bölgesine yönelik ilaç bulunmasına rağmen molekülün büyük yapılı peptid olmasından dolayı oral yolla alınmasının mümkün olmaması ve satış fiyatının yüksekliği ilacın dezavantajları arasında yer almaktadır. Bu yüzden HIV giriş bölgesini hedef alan, küçük yapılı moleküllere gereksinim duyulmaktadır. Bunun içinde HIV virüsünün hücreye girişinde etkin rol oynayan yapılardan gp 41 hedef yapı olarak seçilebilir. Gp 41, üç N-peptid ve üç C-peptid zinciri içermektedir. Bu peptid zincirleri HIV 'in hücreye girişi sırasında altılı sarmal yapı meydana getirmektedir. Bu sarmal yapının oluşumu engellendiği takdirde virüsün hücreye girişi engellenmiş olacaktır. Yapılan deneysel ve teorik çalışmaların ışığında Gp 41 yapısında yer alan hidrofobik bölge küçük moleküllerin etkileşebileceği aktif bölge olarak önerilmiş ayrıca bu aktif bölgenin küçük moleküllerle etkileşmeye uygun büyüklüğe ve potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle yapılacak olan çalışmada gp 41'in aktif bölgesiyle etkileşim gösteren, küçük yapılı, oral olarak kullanılabilen ve daha az yan etkiye sahip yeni HIV giriş moleküllerinin tasarlanması amaçlanmaktadır.

İlacın keşfedilmesi uzun bir süreci kapsamaktadır. Bu keşif sürecini kısaltmak için kullanılan yöntemlerden birisi bilgisayar destekli ilaç tasarımıdır. İlaç tasarımı yapı ile küçük molekülün modellenmesi ve aralarındaki etkileşimin incelenmesi gerçekleştirilebilir. Çalışmamızda molekülün konformasyonlarının protein yapısının aktif bölgesine bağlanmasını tahmini olarak gösteren kenetlenme yöntemi ile yeni küçük HIV giriş inhibitörlerinin tasarlanması ele alınmaktadır.

Bu tez çalışması iki farklı bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde moleküler kenetlenme programı kullanılarak farklı HIV gp 41 yapılarını temsil eden kristal yapılardan en uygunu tespit edilmeye çalışılmıştır. İkinci bölümde ise moleküler kenetlenme için tespit edilen en uygun gp 41 yapısı kullanılarak görsel ligand taraması ile yeni HIV giriş inhibitörlerinin tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının ilk bölümünde HIV gp 41 yapılarının inhibitör içeren X-ray kristal yapıları bulunmadığından literatürde önerilen gp 41 yapısının aktif bölgesi programda belirlenerek moleküler kenetlenme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu prosedürün amacı HIV gp 41 için önerilen birçok X-ray yapısından inhibitörün aktif bölgeye en fazla yerleştiği ve inhibitörün en fazla etkileştiği yapıyı dolayısıyla en iyi yapıyı tespit etmektir.

İkinci bölümde ise kimyasal veritabanlarının araştırılması sonucunda ilaç-benzeri olarak tespit edilen küçük moleküllerin görsel ligand taraması olarak adlandırılan metod ile güvenilir olabilecek yeni HIV giriş inhibitörlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

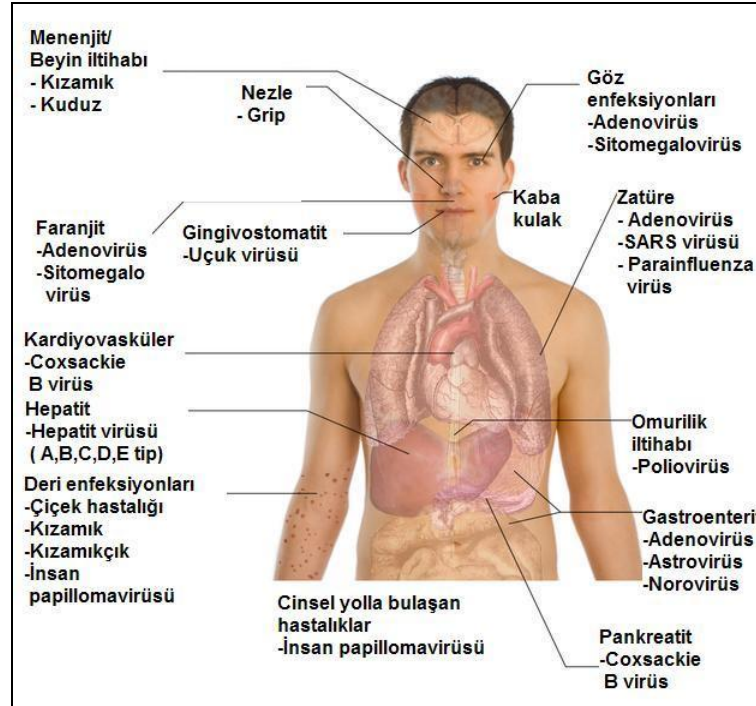
Bu çalışmanın amacı, HIV virüsünün hücreye girişinde önemli rol oynayan gp 41 proteininin aktif bölgesini hedef alan ve bu sayede HIV virüsünün hücreye girişine engel olacak ve mevcut ilacın dezavantajlarını azaltmaya yönelik belirtiler gösteren yeni moleküllerin tasarlanmasına katkıda bulunmaktır. Araştırma sonucunda elde edilen verilerin moleküler kenetlenme için en uygun gp 41 yapısının belirlenmesine ve yeni moleküllerin keşfine katkı sağlaması beklenmektedir.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Virüsler ve viral hastalıklar

Virüsler hücreye sahip olmayan, bulaşıcı ajanlardır. Yaşamak ve çoğalmak için konak hücreye ihtiyaç duyarlar, bu yüzden de gerçek canlı organizmalar sınıfında yer almazlar. Bakteri, bitki, ve hayvan hücrelerini enfekte etme yeteneğine sahip birçok farklı virüs çeşitleri bulunmakla beraber 400'ün üzerinde virüsün insanları enfekte ettiği bilinmektedir (Patrick, 2009).

Virüsler çeşitli yollarla yayılabilir. Grip, suçiçeği, kızamık, kabakulak, zatüre, kızamıkçık, ve çiçek hastalığı hava ile yayılır, öksürük ya da hapşırmaya belirtileriyle konak yapıyı enfekte eder. AIDS, soğuk algınlığı, genital iltihap, kuduz gibi virüsler fiziksel temas ile bulaşır ve konak hücre dışında uzun süre hayattta kalamazlar. Son olarak ağızdan alınan gıdalar ve sularla bulaşan virus tiplerine hepatit A ve E, çocuk felci, viral mide ve bağırsak iltihabı örnek olarak verilebilir. Şekil 2.1'de viral enfeksiyonların insan vücudunda etki ettiği bölgelere göre bir ayırım yer almaktadır (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Viral_infections_and_involved_species.png, 2009).



Şekil 2.1 Viral enfeksiyonlara genel bakış

Tarihsel olarak viral enfeksiyonların yıkıcılığı ve tahrip ediciliği insan popülasyonu üzerinden ispatlanmıştır. Çiçek hastalığının, Roma İmparatorluğu'nun MS 165-180 ve MS 251-266 yılları arasında zayıflamasına yol açan salgının sorumlusu olduğu ileri sürülmektedir. Çiçek hastalığı ayrıca Kuzey ve Güney Amerika 'da Avrupa sömürgesi devam ederken yerli halkın büyük kısmının yok olmasına yol açmıştır. Bazı bölgelerde tahmini olarak nüfusun %90'ı hastalık yüzünden hayatını kaybetmiştir. Çeşitli grip salgınları yıkıcı etkiler göstermiştir. 1918-1919 yılları arasında 20 milyonun üzerinde insan grip salgınından hayatını kaybetmiştir ki bu rakam 1. Dünya Savaşı süresince ölen insan sayısından çok daha fazladır.

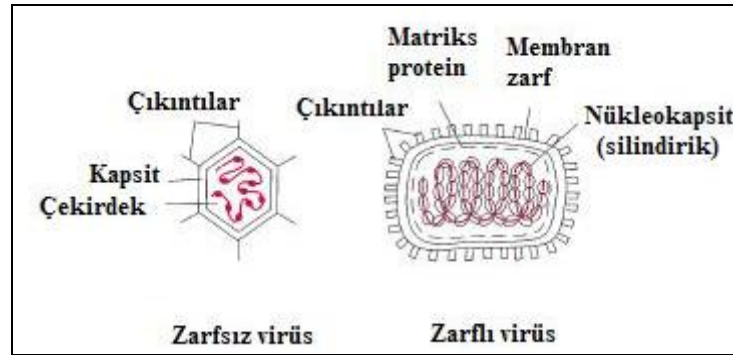
Afrika kıtasında ebola ve sarı humma virüslerini de kapsayan öldürücü virüsler sıklıkla görülmektedir. Geçmişte, izole edilmiş topluluklarda bunun gibi viral hastalıklar görülürdü ve bu hastalıklar kolayca kontrol altına alınırdı. Günümüzde, turistler hava yolu seyahatleriyle beraber uzak ülkelere ucuz ve kolaylıkla seyahat edebilmektedir. Bu da viral hastalıkların tüm dünyada yayılmasına fırsat tanır. Bundan dolayı, dünya sağlık yetkililerinin potansiyel riskleri izlemeleri ve gerektiği zaman uygun önlemleri almaları önemlidir. 2003 yılında patlak veren akut solunum yetmezliği sendromu, göz ardı edilseydi evrensel boyutta yıkıcı etki gösterebilirdi. İyi ki, dünya toplulukları süratle hareket ettiler ve hastalık hızla kontrol altına alındı. Yine de, akut solunum yetmezlik virüsü viral enfeksiyonların ne kadar tehlikeli olabileceğini güncel uyarıyla göstermiştir.

Bilimadamları kabus senaryoları kapsamında bir super virüsün olası evrimine karşı uyarılmıştır. Bunun gibi ajanlar grip gibi bulaşma yöntemine ve yayılma hızına sahip olabilir fakat ondan daha yüksek can kaybına yol açabilir. Buna benzer öldürücü virüsler mevcut olup hızlıca yayılabilirler ve yüksek oranda can kaybına yol açabilirler. Özellikle izole toplumlarda, enfeksiyon ve saptanabilir belirtiler arasındaki gizli kalma süresinin kısa olması ve kapsadığı alanda patlak vermesi şanstır. Eğer buna benzer viral enfeksiyonların gizli kalma süresi AIDS gibi uzun olursa netice ortaçağdaki veba salgınına eşit yıkıcı etkiyle sonuçlanabilir.

Virüslerin topluluklar üzerindeki potansiyel tahribat etkisi göz önüne alınırsa terör yanlılarının sivillere yönelik öldürücü virüs türleri kullanmalarına yönelik korkular bulunmaktadır. Bu terminoloji de biyoterörizm olarak adlandırılır. Şu ana kadar böyle bir eylem gerçekleşmedi fakat riskleri göz ardı etmek yanlış olacaktır. Şu açıktır ki, medisinal kimyanın önemli ve öncelikli araştırma konularından birisi etkili antiviral ilaçları araştırmaktır (Patrick, 2009).

2.2 Virüslerin Yapısı

Virüsler, enfekte ettiği hücrelerden yaklaşık olarak 100 ile 1000 kat arasında daha küçüktür. Virüslerin boyutları 20 ile 300 nm arasında değişkenlik göstermektedir. Virüsler zarfsız veya zarflı olabilir. Zarflı ve zarfsız virüslerin yapısı Şekil 2.2 de gösterilmektedir (Ryan and Ray, 2003).



Şekil 2.2 İki temel virüs tipinin şematik gösterimi

Bütün virüslerin yapısında bulunan, viral nükleik asiti kapsayan ve korunmasını sağlayan protein tabakasına **kapsit** adı verilir. Kapsit kapsomer adı verilen protein alt ünitelerden, kapsomerler ise bir araya gelmiş tekrarlayan polipeptit ünitelerden oluşur. Zarfsız virüslerden farklı olarak zarflı virüslerdeki zarf yapısı glikoprotein ve fosfolipitlerden oluşmuş lipoprotein yapısında membran içerir. Ayrıca zarflı virüsler dış kapsit içerir. Dış kapsit proteinleri genetik materyali korur ve virüsün konak hücre yüzeyinde bulunan özgül reseptörlere tutunmasına yardım eder. Zarflı virüslerde bulunan bir diğer protein de matriks proteinleridir. Zarfın altında bulunan bu proteinler kapsit proteinleriyle zarfın etkileşimine aracılık eder (Tünger vd., 2005). Zarflı virüslerde görülen bir diğer yapıda nükleokapsittir. Nükleik asit ve kapsomer

kompleksi nükleokapsit olarak adlandırılır. Nükleik asitin kapsit ile çevrili olması nükleik asiti çevresel zararlardan korur. Hücre ile ilk iletişimde kapsayan, protein ya da glikoprotein yapılara çıkıntılar adı verilir.

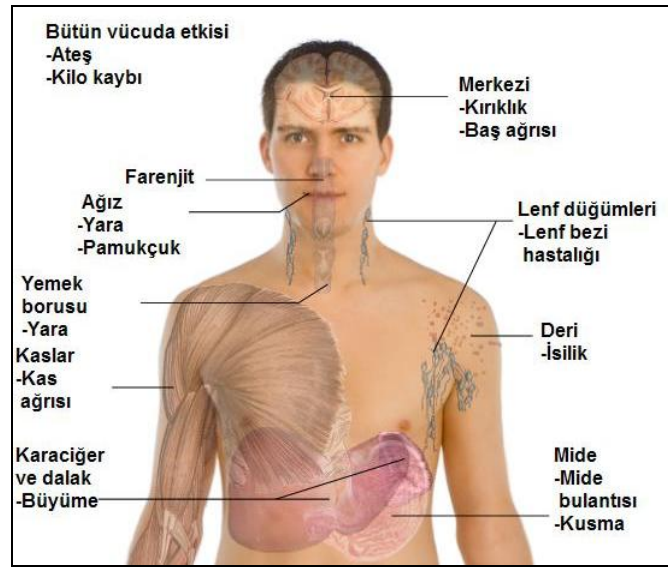
Genetik materyal açısından da virüsler incelenebilir. Virüslerin genomu **DNA** ya da **RNA** içerir fakat her ikisini beraber içermeyiz. Deoksiribonükleik asit (**DNA**), tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir nükleik asittir. DNA'nın başlıca rolü bilginin uzun süreli saklanmasıdır. Protein ve RNA gibi hücrenin diğer bileşenlerinin inşası için gerekli olan bilgileri içermesinden dolayı DNA bir kalıp, şablon veya reçeteye benzetilir. Bu genetik bilgileri içeren DNA parçaları gen olarak adlandırılır, ama başka DNA dizilerinin yapısal işlevleri vardır, diğerleri ise bu genetik bilginin kullanılmasının düzenlenmesine yararlar (<http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA>, 2011). Ribonükleik asit veya RNA bir nükleik asittir, nükleotitlerden oluşan bir polimerdir. RNA pekçok önemli biyolojik rol oynar, bunların arasında DNA'da taşınan genetik bilginin proteine çevirisi (translasyon) ile ilişkili çeşitli süreçlerde de yer alır. RNA tiplerinden olan mesajcı RNA, DNA'daki bilgiyi protein sentez yeri olan ribozomlara taşır, ribozomal RNA ribozomun en önemli kısımlarını oluşturur, taşıyıcı RNA ise protein sentezinde kullanılmak üzere kullanılacak aminoasitlerin taşınmasında gereklidir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/RNA>, 2011). DNA ya da RNA tek veya çift sarmallı, lineer veya halkasal olabilir. Tek sarmallı RNA virüslerinde RNA aynı zamanda mesajcı RNA (mRNA) görevi görüyorsa bu virüslere (+) sarmallı RNA virüsü, bunun karşılığı sarmallı taşıyan virüslere ise (-) sarmallı RNA virüsü adı verilir (Tünger vd., 2005). RNA virüslerinin çoğu tek sarmallıdır, ama küçük bir kısmıda çift sarmallı RNA içerir. Buna karşın DNA virüslerinin çoğu çift sarmallıdır, yalnızca küçük bir kısmı çift sarmallı yapıya sahiptir.

2.3 HIV ve AIDS nedir?

HIV (Human Immunodeficiency Virus), Türkçe'de 'İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü' olarak nitelendirilir. Virüs bağışıklık sistemini zayıflatarak vücudun direnç gösterebileceği hastalıklara karşı savunmasız kalmasını sağlar. HIV'in iki türü

bulunmaktadır. HIV-1 Amerika , Avrupa ve Asya' da görülürken, HIV-2 daha çok Batı Afrika ve Hindistan' da görülür. HIV'in kazanılmış immun yetmezlik sendromu (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) oluşumuna yol açtığı bilinmektedir.

Kazanılmış immun yetmezlik sendromu (AIDS) ilk kez 1981 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde bildirildi. İlk AIDS vakaları Los Angeles, San Fransisco ve New York City gibi büyük şehir merkezlerinde görüldü. Bir grup genç erkek eşcinsel hasta *Pneumocystis carinii*'nin (genellikle zararsız olan ökaryotik mikroorganizma sebep olduğu ciddi pnömoni, Kaposi sarkomu (genellikle nadir olan bir kanser formu), ani kilo kaybı, lenf nodüllerinin şişmesi ve immun fonksiyonlarının baskılanmasını da içeren alışılmışın dışında belirtiler göstermiştir (Harvey et al., 2006). Şekil 2.3'de ise akut HIV enfeksiyonunun temel bulguları görülmektedir ([http :// en.wikipedia.org /File: Symptoms_of_acute_HIV_infection.png](http://en.wikipedia.org/File:Symptoms_of_acute_HIV_infection.png), 2009).



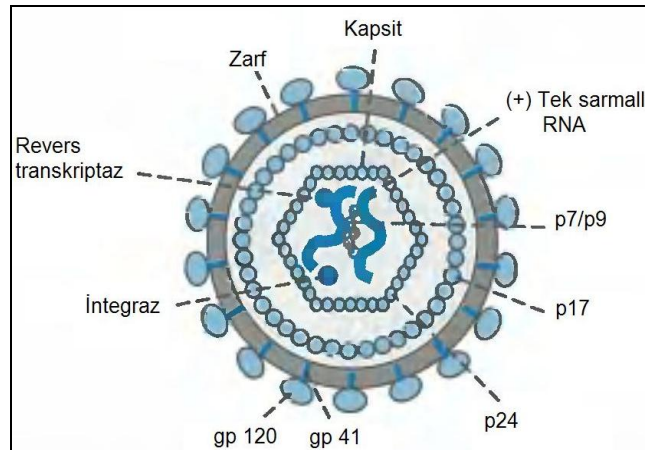
Şekil 2.3 Akut HIV enfeksiyonlarının bulguları

Hastalıkla ilişkili olan bu semptom ve belirtilerin hepsi kazanılmış immun yetmezlik sendromu (AIDS) olarak bilinir. Hastalığın anlaşılması için yapılan ilk çalışmalarda kronik damariçi ilaç kullanımı veya enfeksiyon sonucu oluşan bağışıklığın baskılanması olasılığı üzerinde durulmuştur. Ancak bir süre sonra transfüzyonla kan ve kan ürünleri almış olanlar, eşcinsel olmayan, damar içi ilaç bağımlısı olmayan hastalarda da vakalar bildirilmiştir. 1984'te AIDS, AIDS'li bir hastadan izole edilen HIV

ile oluşan enfeksiyöz bir hastalık olarak tanımlanmıştır. İlk tanımlanmasından sonraki on yıl içinde Amerika'da Kore ve Vietnam savaşlarında ölenlerin toplamından daha fazla sayıda kişi hayatını kaybetmiştir (Harvey et al., 2006). Bugüne kadar 27 milyondan fazla kişinin AIDS yüzünden hayatını kaybettiği kaydedilmiştir. Yayımlanan rakamlara göre yılda 2 milyon kişi bu hastalığın sonucunda yaşama veda etmektedir. Global olarak, 33 milyon insan HIV ile birlikte yaşamakta olup her gün 7500 yeni HIV vakası ile karşılaşmaktadır (Wang et al., 2010). 2008 yılı istatistiklerine göre ülkemizde 599' u kadın ve 2206' sı erkek olmak üzere toplam 3175 AIDS hastası bulunmaktadır (http://www.erdemlidh.gov.tr/dosyalar/hiv_aids_veri_tabloları.pdf, 2008). Amerika Birleşik Devletleri ve diğer gelişmiş ülkelerde kullanılan ilaç kombinasyonlarının hastalığın AIDS'e ilerlemesini anlamlı bir şekilde yavaşlattığı görülürken lojistik ve finansal nedenlerden dolayı gelişmekte olan ülkelerde HIV'le enfekte kişilerin çok azı bu ilaçları kullanabilmektedir. AIDS, toplumdaki fakir ve imkanları kısıtlı olanları hedef almakla, toplumun dokusunu yok etmektedir. AIDS'in toplumda sosyal ve ekonomik etkisi bir süre daha artan şekilde devam edecektir (Harvey et al., 2006).

2.3.1 HIV yapısı

HIV zarflı bir RNA virüsüdür ve yapısı şekil 2.4'te görülmektedir (Patrick, 2009).

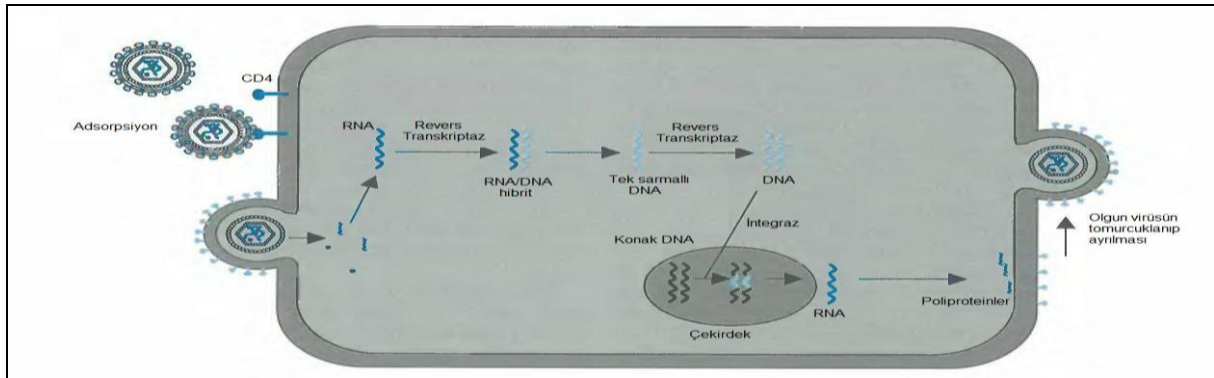


Şekil 2.4 HIV yapısı

Virüsün kapsiti ana temel kapsit protein p24, nükleokapsit protein p7/p9, iki kopya tek sarmallı (+) RNA, revers transkriptaz, integraz ve proteaz enzimlerinden meydana sahiptir. Bu protein en kolay saptanabilen viral antijendir. Konik biçimli kapsit konak hücre zarından kaynaklanan bir zarfla çevrelenmiştir (Tünger vd., 2005). Kapsit ve zarf arasında çekirdekteki çift iplikli provirüs DNA 'sına giren ve sonra virüsün toplanması aşamasında gerekli olan dış matriks protein p17 vardır. Bunların yanında konak hücre membranından oluşan viral zarf 72 adet çıkıntı içerir (Harvey et al., 2006). Zarfın üzerindeki topuz biçiminde görülen **gp120** yüzey proteini ya da bağlanma protein olarak adlandırılır. Görevi infeksiyon sırasında hücre reseptörüne bağlanmaktır; gp 120'ye karşı nötr antikolar oluşur. **Gp 41** ise füzyon protein ya da transmembran protein olarak adlandırılır, hidrofobik membran sapı olma özelliği gösterir (White and Fenner, 2000). Görevleri hücreler arası füzyonu arttırmak ve virüsün konak hücreye girişinden sorumlu olmaktır.

2.3.2 HIV replikasyonu

HIV replikasyonunun ilk fazında virüsün girişi, revers transkripsiyon, virüsün konak hücre genomuna integrasyonu, virüs tarafından sağlanan proteinler aracılığıyla gerçekleştirilir. Viral genom, mRNA'ların ve yapısal proteinlerin sentez ve oluşumunu içeren replikasyonun ikinci fazında, konak hücre mekanizmaları kullanılır. Birçok hücre tipinde HIV replikasyonu hücrenin ölümüyle sonuçlanır (Harvey et al., 2006). Aşağıda yer alan şekil 2.5'te HIV molekülünün konak hücre içindeki yaşam döngüsü görülmektedir (Patrick, 2009).



Şekil 2.5 HIV Yaşam Döngüsü

HIV'nin hücreye girişi, replikasyonu ve hücreden ayrılması birkaç aşamada meydana gelmektedir. Bu aşamalar sırasıyla şu şekilde gerçekleşir.

2.3.2.1 Spesifik hücre yüzey reseptörüne bağlanma

Virüsün konak hücrenin CD4 molekülüne bağlanması (adsorpsiyon) HIV yüzeyinde bulunan gp 120 sayesinde gerçekleşir. Bu sayede virüs hücre membranında CD4 molekülünü taşıyan yardımcı T hücrelerini ve diğer CD4 hücrelerini enfekte eder.

2.3.2.2 Virüsün hücreye girişi

Virüsün hücreye girebilmesi için kemokin reseptörleri denilen ve koreseptör olarak da adlandırılan CXCR4 ve CCR5 reseptörleri de gereklidir. Makrofajlar ve T hücrelerinde bu fonksiyonu gerçekleştiren kemokin reseptörleri bulunur.

Koreseptörle de bağlanma sonucunda viral gp 41 (füzyon) aktive olur ve viral zarf ile hücre membranı arasında füzyon gerçekleşir.

2.3.2.3 Viral RNA'nın revers transkripsiyonu

HIV RNA'sı konak hücreye girdikten sonra translasyon olmaz. Revers transkriptaz, RNA bağımlı DNA polimeraz enzimi ile viral genomik RNA'nın karşıt DNA sarmalı sentezlenir. Sonrasında aynı enzimin RNAz aktivitesi ile RNA yıkılır ve yine revers transkriptaz enziminin DNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi ile tek sarmallı DNA'dan çift sarmallı cDNA (proviral DNA) oluşturulur.

2.3.2.4 Provirüsün konak hücre DNA'sına integrasyonu

Viryonun kor bileşenleri ile birlikte bulunan ve provirüs olarak adlandırılan yapı matriks proteinlerinin yardımıyla çekirdeğe iletilir. Çekirdekte viral integras kromozomal DNA yapısını böler, kovalent olarak provirüs bağlanır.

2.3.2.5 Konak hücre aktivasyonu

İntegrasyon işleminin ardından konak hücrenin aktivasyonu ile DNA, mRNA ve viral RNA genomuna transkribe olur. Viral mRNA'lar, viral enzimlere ve yapısal proteinlere çevrilir.

2.3.2.6 Viryonun tomurcuklanıp ayrılması

Viryon yüzeyden tomurcuklandıkça viral proteaz aktive olur ve poliproteinleri sonradan olgun viryonda toplanacak olan protein bileşenlerine parçalar. Olgun retrovirüs, enfekte konak hücreden tomurcuklanırken zarfı oluşur (Anğ, 2006).

2.4 HIV Giriş Hedef Yapıları

HIV tedavisi ile ilgili geliştirilen birçok ilaç piyasada bulunmasına rağmen, bu ilaçların viral dirençleri ve yan etkileri eksiklikleridir. Ayrıca mevcut ilaçların tedavi sürecinin masrafları da çok fazladır. Bununla beraber bu ilaçlar enfeksiyonun sonraki aşamalarını kapsamaktadır. Bu nedenle, viral yaşam döngüsünü ilk aşamada engelleyebilecek ve HIV girişini hedefleyen anti-HIV ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu süreci hedefleyen yapılara giriş (füzyon) inhibitörleri adı verilmektedir. Sayfa 12'de yer alan tablo 2.1'de HIV giriş inhibitörleri ve etki ettikleri bölgeler yer almaktadır (Jiang et al., 2002).

Tablo 2.1 HIV giriş inhibitörleri

Giriş hedef yapıları	Hedef proteinler	İlaç^a (Firma)	İlaç^b (Firma)
Zarf proteinleri	gp 41	T-1249 (Roche/Trimeris) SJ-2176 (New York BloodCenter) ADS-J1(New York Blood Center) C-34 (Medical College of Cornell University, New York) T-1144 (Roche/Trimeris) Sifuvirtide (FusoGen) N36 (Weill Medical College of Cornell University, New York)	Fuzeon (Roche/Trimeris)
	gp 120	PRO542 (Progenics)	
Ev sahibi hücre proteinleri	CD4	PRO 2000 (Procept)	
	CCR5	SCH-D (Schering- Plough) UK 427,857 (Pfizer)	
	CXCR4	AMD070 =AMD 11070(AnorMED) ALX40-4C (NPS Allelix Corp.)	

^a : Klinik aşamada ^b : FDA onaylı

Giriş inhibitörleri vücuttaki sağlıklı T hücrelerine HIV'in yerleşmesini engellemeye çalışmaktadır. Giriş inhibitörleri etkinliklerini HIV veya T hücrelerinin yüzeyindeki proteinlere **(CD4)** bağlanarak gerçekleştirirler. Araştırmaların sonucunda giriş inhibitörlerinin hedeflediği birkaç yapı tespit edilmiştir. Bu hedeflerden birincisi **glikoprotein 120**'dir. Glikoprotein 120, yüzey proteini veya viral tutunma proteini olarak adlandırılır. Glikoprotein 120, virüsün hücreye girişi için gerekli olan spesifik hücre yüzey reseptörünün arayıp bulunmasında önemli rol oynamaktadır (http://en.wikipedia.org/wiki/Envelope_glycoprotein_GP120, 2010). Gp 120 ayrıca doku tropizminden sorumludur; gp 120'ye karşı nötralizan antikorlar oluşur (Tünger vd., 2005). Diğer bir hedef yapı ise **CD4** molekülüdür. CD4, primer reseptör olarak da adlandırılır. CD4, HIV'in özgül hücre reseptörüdür yani virüsün hücreye girişi başlamadan önce tutunduğu yapılardan birisi CD4 hücreleridir. Tutunma işlemi yüzey glikoproteininin (gp 120) CD4 moleküllerine bağlanması sayesinde gerçekleşir. Fakat virüsün sadece CD4 reseptörlerine bağlanması enfeksiyonun başlaması için yetersiz kalacağından koreseptörler olarak adlandırılan diğer hücre yüzeyi moleküllerine de bağlanması gerekmektedir(Tünger vd., 2005). Bu süreç içinde gp 120 molekülünün CD4'ten sonra **CXCR4** ve **CCR5** adlı kemokin reseptörlerine de bağlanması gerekir. T hücrelerine tropizm gösteren virüs kökenleri CXCR4'e bağlanma yaparken, makrofajlara tropizm gösteren virüsler CCR5'e bağlanır. Bu etkileşim sayesinde gp 120'nin bağlanma bölgesindeki kemokin reseptörleri CXCR4 ve CCR5 açığa çıkarılmış olur. Bu hedef yapıların haricindeki hedef yapı ise çalışmamıza da kaynak olan **glikoprotein 41** molekülüdür.

2.4.1 Glikoprotein 41

HIV-1 zarf glikoproteini olan gp 41 molekülü, gp 160 yapısının proteolitik kırılması sonucunda meydana gelmektedir .Gp 41 yapısı 345 aminoasitten (512-856) oluşur ve molekül ağırlığı 41 kD 'dur (Jiang et al., 2002). Glikoprotein 41 yapısı şekil 2.6'da görülmektedir (Huang et al., 2007).

Gp41 C-terminal
(40a.a)

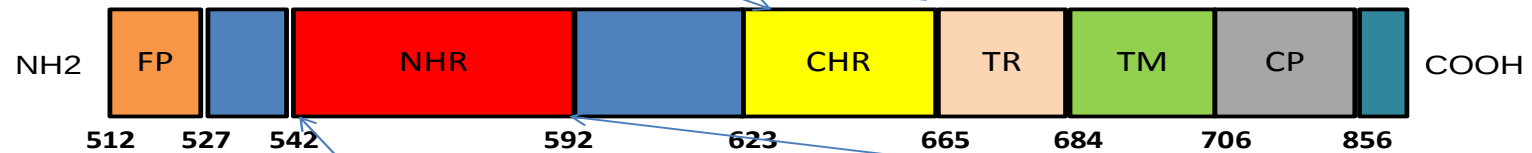
IWNHTT WMEWDREINNYTSLIHS LIIESQNQQEKNEQELLE
623 628 638 663

T20 (Fuzeon)
(36a.a)

YTS LIHS LIIESQNQQEKNEQELLE DKWASLWNWF
638 663 673

C34(628-661)
1aik(t),2zzo (m)

WMEWDREINNYTSLIHS LIIESQNQQEKNEQELL
628 638 661



Gp41 N-terminal
(50a.a)

RQLL SGIVQQQNNLRAIEAQQH LLQLTVWGIKQLQARIL *AVERYLKDQQ*
542 546 565 581 592

N46 (537-582)
2r5d(t)

RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK LLQLTVWGIKQLQARIL N
537 565 582

N45 (537-581)
2q3i(m),2q7c(t)

RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK LLQLTVWGIKQLQARIL
537 565 581

N36 (546 -581)
2zzo(m),1aik(t)

SGIVQQQNNLRAIEAQQH LLQLTVWGIKQLQARIL
546 565 581

Şekil 2.6 Glikoprotein 41 yapısı

Gp 41 yapısı üç bölgeden oluşur. Birinci bölge ekstrasellüler bölge ya da dış bölge olarak adlandırılan bölgedir. 512 ile 683 arasındaki aminoasitler bu bölgeye dahildir. İkinci bölge transmembran bölge olarak adlandırılır, buradaki aminoasitler ise 684-704 arasındadır. Üçüncü ve son bölge ise intrasellüler ya da iç bölge olarak adlandırılır; 705 ile 806 arasındaki aminoasitler bu bölgenin kapsamında yer almaktadır.

Gp 41'in dış bölge olarak adlandırılan kısmı, kendi aktiviteleri ile ilişkili olarak üç önemli fonksiyonel alana sahiptir. Birinci alan, gp 41'in N-uç bölgesinde yer alan ve füzyon peptid olarak bilinen kısım olup, hidrofobik ve glisine zengin aminoasitler içerir. Bu aminoasitlere, virüsün hedef hücre membranının içine ilk kez girerken ihtiyaç duyulur. Hezamerik biyolojik birime sahip olan gp 41'in ikinci ve üçüncü alanında ise üç N-terminal bölgeyle (NHR) üç C-terminal bölge (CHR) yer almaktadır. NHR bölgesi 542 ile 592 arasındaki aminoasitlerden oluşurken, CHR bölgesi 623 ile 663 arasındaki aminoasitlerden oluşmaktadır. Gp 41 NHR bölgesinin aktif alanı olarak tanımlanan hidrofobik cep 565(29) ile 581(45) arasındaki aminoasitlerden meydana gelmektedir (Weissenhorn et al., 1997)

HIV füzyonu, gp 41 üç N-terminal bölgesinin konak hücre membranına eklenmesini ve sonrasında da üç C-terminal bölgenin N-terminale bağlanarak altılı sarmal yapının oluşumunu kapsamaktadır. N-terminal bölgesi altılı sarmal demetin oluşmasında ve viral girişte önemli rol oynayan ve hidrofobik cebi bulunduran hidrofobik oluğu içermektedir. Sonuçta, N-terminal peptidin hidrofobik cebi gp 41 için potansiyel ilaç hedefidir.

2.4.2 Glikoprotein 41 inhibitörü: Enfuvirtide

Şu ana kadar Amerika İlaç ve Gıda Dairesi (FDA)'den onaylı 28 anti –HIV ilacı bulunmaktadır (Liu et al ., 2008). Fakat hastalığı ortadan kaldıracak ilaç henüz bulunamamıştır. Bu antiretroviral ilaçların beraber kullanılması sonucunda önemli derecede etkili oldukları bulunmuştur. Bununla beraber, bu ilaçların ciddi yan etkilerinin ve ilaç dirençlerinin olması kullanımlarındaki sorunlardır. Bu nedenle HIV girişini hedef alan yeni anti-HIV ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

HIV giriş inhibitörü olarak geliştirilen ve FDA onayına sahip olan tek ilaç enfuvirtide ya da diğer bilinen adlarıyla fuzeon, T-20 yer almaktadır. Enfuvirtidenin, HIV enfeksiyonu ve AIDS hastalarının tedavileri için yapılan klinik denemelerde kuvvetli in vivo aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer HIV ilaçlarıyla beraber kullanılması önerilmektedir. İlk olarak Trimeris firmasının çalışanları tarafından T-20 olarak adlandırılan enfuvirtidenin sonraki ürün geliştirme çalışmaları Roche firması ile beraber yapılmıştır. Enfuvirtide,13 Mart 2003 tarihinde Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Enfuvirtide>, 2010).

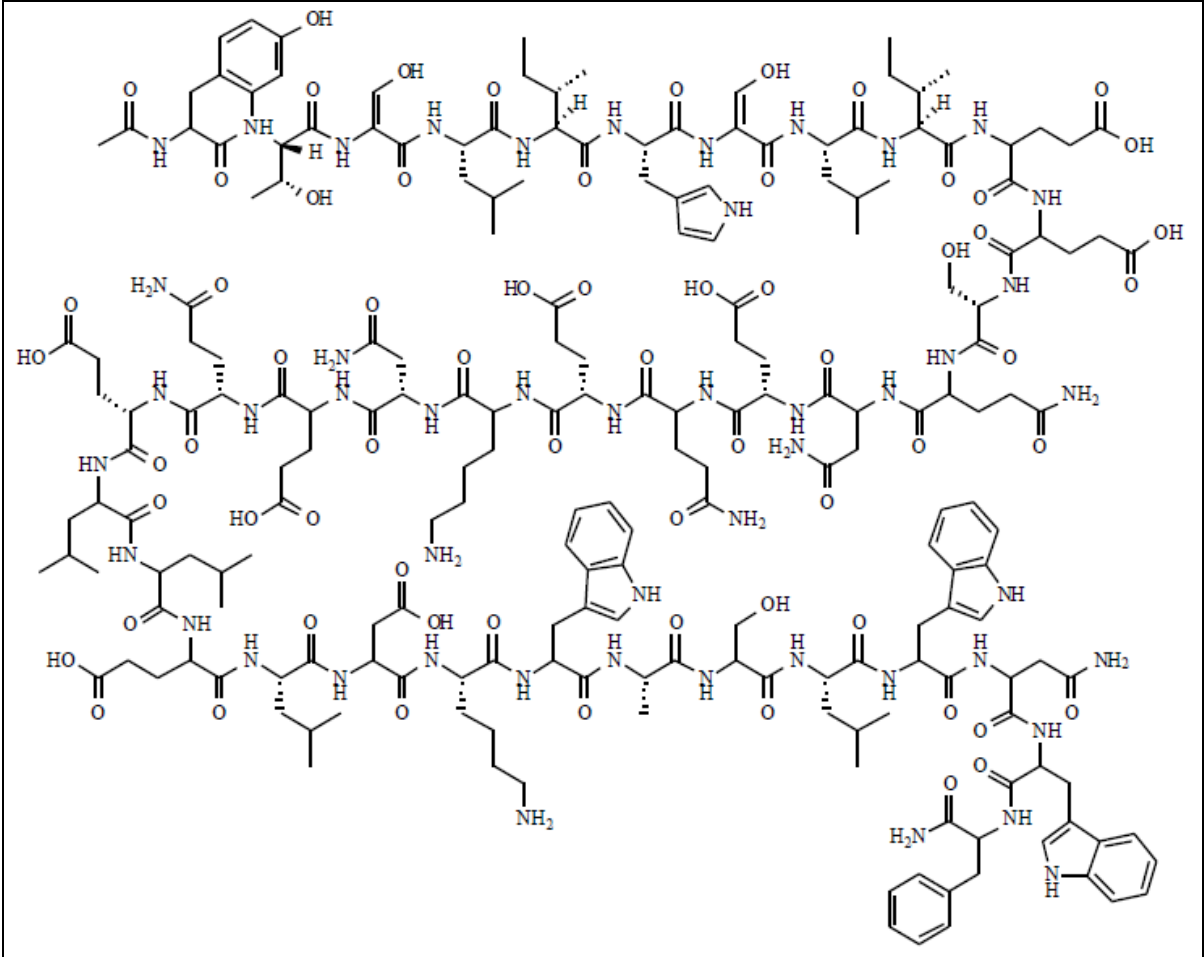
Şekil 2.7'de (http://www.aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailNT.aspx?int_id=306, 2010) görülen enfuvirtide, antiretroviral enjekte edilebilir bir ilaç olup vakumda kurutulmuş toz şeklinde ve küçük şişelerde sunulmaktadır. Enfuvirtide ülkemizde henüz satışa sunulmamıştır.



Şekil 2.7 Enfuvirtide gösterimi

2.4.3 Enfuvirtide kimyasal yapısı

Enfuvirtide 36 aminoasit içeren, oldukça büyük bir sentetik polipeptid molekül olup tamamen yeni bir antiretroviral etkenler sınıfında yer almaktadır. Enfuvirtidenin molekül formülü $C_{204}H_{301}N_{51}O_{64}$ olup molekül ağırlığı 4492 g/mol'dür. Enfuvirtide gp 41'in dış bölgesinde yer alan C-peptid alanındaki (CHR) 643-678 arasında bulunan aminoasitleri içerir. Bu dizilim şu şekildedir: $CH_3CO-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH_2$ (Fung et al., 2004). Enfuvirtide'nin yapısı şekil 2.8'de görülmektedir (Manfredi and Sabbatani, 2006).



Şekil 2.8 Enfuvirtide'nin kimyasal yapısı

Bu çok karışık 36 aminoasite sahip enfuvirtidenin final yapısını elde etmek için 106 farklı sentez basamağına ihtiyaç duyulmaktadır (Manfredi and Sabbatani, 2006).

2.4.4 Enfuvirtidenin etki mekanizması

HIV'in hücreye girişinde açıklanan CD4 reseptörleri (örnek olarak T hücreleri, makrofajlar) kompleks bir yapıdır, HIV'in hücre içine füzyonu viral zarf glikoprotein ve insan hücresel reseptörleri arasındaki etkileşim serilerini kapsayan çok basamaklı süreci kapsamaktadır (Fung et al., 2004).

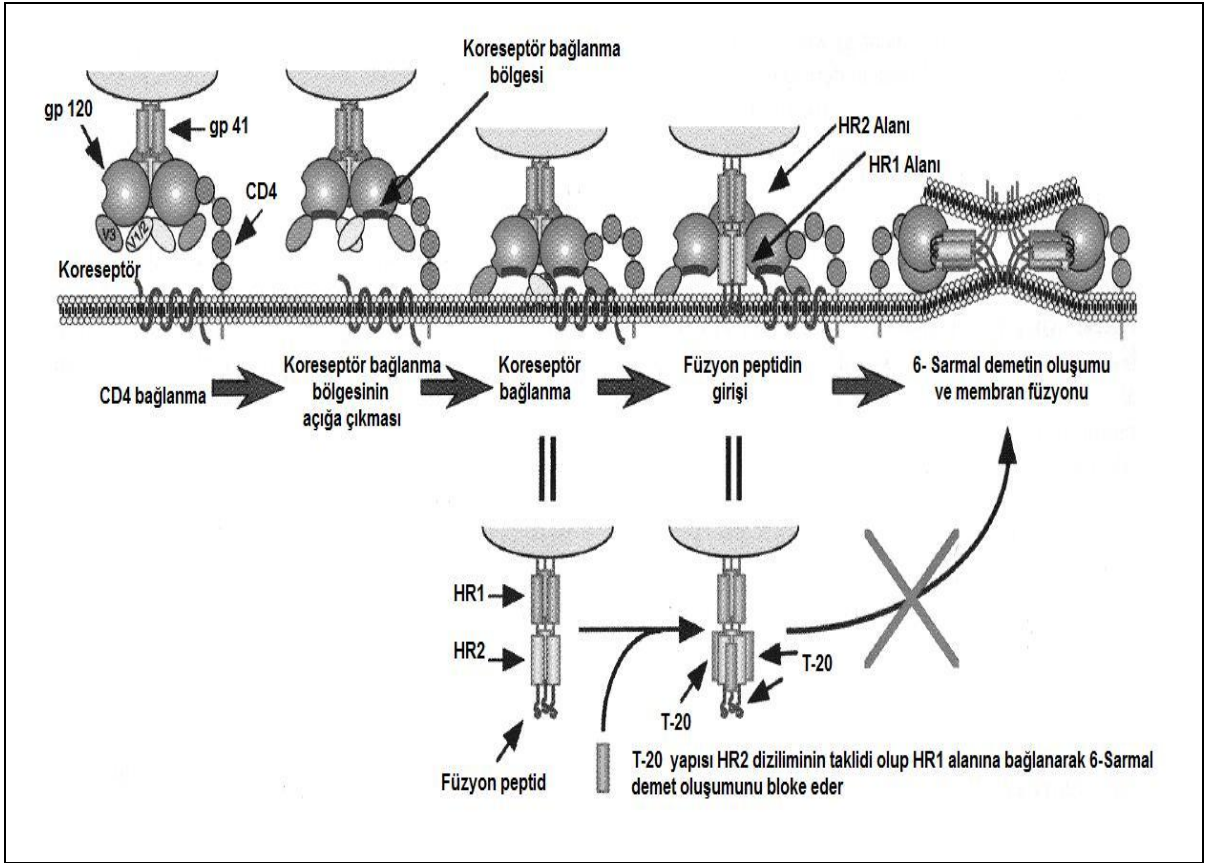
HIV-1'in sahip olduğu viral zarf birçok altbirimden meydana gelmektedir, bu altbirimlerin herbiri gp 120 yüzey proteininin gp 41 transmembran proteini ile kovalent olmayan bağlarla bağlanması sonucunda oluşmaktadır.

HIV'in hücreye girişi gp 120'nin CD4 hücrelerine konak hücrede bağlanmasıyla başlamaktadır. CD4 hücrelerinin çok önemli olduğu düşünülmesine rağmen bir kemokin reseptörü olan CCR5 ya da CXCR4 molekülleride giriş mekanizması için gerekli yapılardır. Gp 120'nin CD4'e bağlanması sonucunda gp 120'de konformasyonel değişiklikler ve yapısında yeniden düzenleme meydana gelmektedir, gp 120'deki bu farklılıklar koreseptör bağlanma bölgeleri ve konak hücre yüzeyindeki bir kemokin reseptörüyle (CCR5 ya da CXCR4) izinli etkileşimi sonucunda açığa çıkmaktadır. Gp 120'nin hem CD4 hem de kemokin reseptörleriyle bağlanması gp 41'in yapısındaki konformasyonel değişikliklerin ana tetikleyicisi olup, konak hücre plazma zarına füzyon peptidin girmesini açığa çıkarmakta ve neticesinde getirdiği füzyon sürecini kapsamaktadır.

Zarf glikoproteini olan gp 41, üç gp 41 oligomerinden oluşan bir trimerik yapıdır. Kristalografik çalışmaların gösterdiğine göre, füzyon peptid hücre membranına yerleştikten sonra gp 41 oligomerlerinin kendileri katlanarak 6-sarmal demet formuna dönüşür. Bu demet yapısı merkezde üç N-terminal bölgeden (NHR ya da HR1) ve üç C-terminal bölgeden (CHR ya da HR2) meydana gelmektedir, ayrıca dışarıda paketlenmiş halde ve antiparalel konumda bulunan N –terminal bölge tarafından

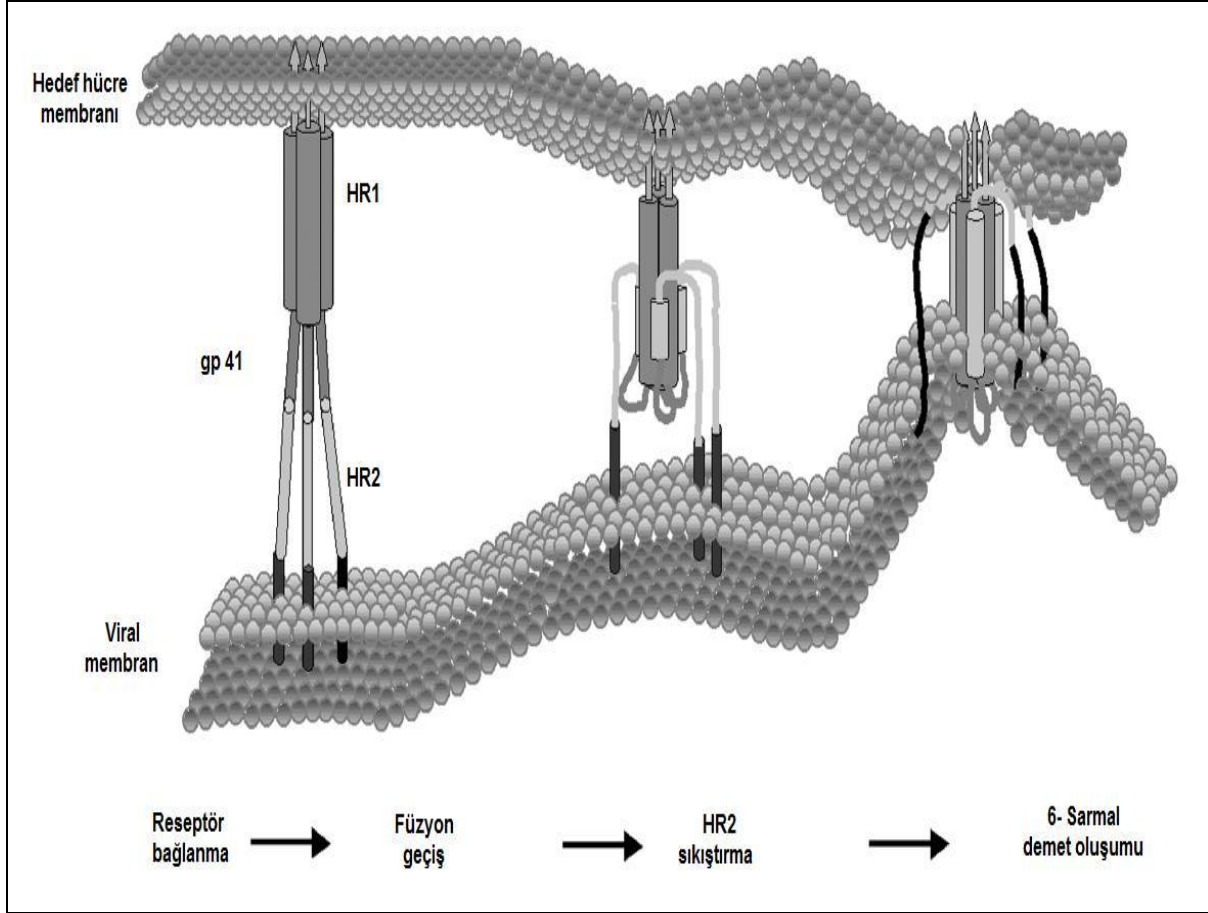
oluşturulan oluklarda demetin yapısında yer almaktadır. Bu altılı sarmal demetin oluşumu sonucunda, viral ve hücrel zarlar biraraya gelir ve böylece birleşmeleri için gerekli zemin sağlanmış olur. Altılı sarmal demet oluşumu ile ilgili serbest enerjinin membran füzyonunu ortaya çıkardığına inanılır. Membran füzyonu tamamlandıktan sonra viral içeriğin konak hücreden ayrıldığı gözlenmektedir.

HIV füzyon basamakları ve 6-sarmal demet yapısının oluşumu Şekil 2.9 ve Şekil 2.10'da belirtilmektedir. Şekil 2.9'da (Fung et al.; 2004) sırasıyla gp 120'nin CD4 'e bağlanması, koreseptör bağlanma bölgesinin açığa çıkması, koreseptörün bağlanması, füzyon peptidin girişi ve en sonunda 6-sarmal yapının oluşumuyla membran füzyonu gösterilmektedir. Füzyon peptid gerçekleşmeden, gp 41 'in HR1 bölgesine HR2 bölgesini taklit eden enfuvirtide molekülünün bağlanmasıyla 6-sarmal demet oluşumu ve dolayısıyla HIV giriş süreci engellenmektedir.



Şekil 2.9 Enfuvirtide'nin etki mekanizması ve HIV- hücre füzyon basamakları

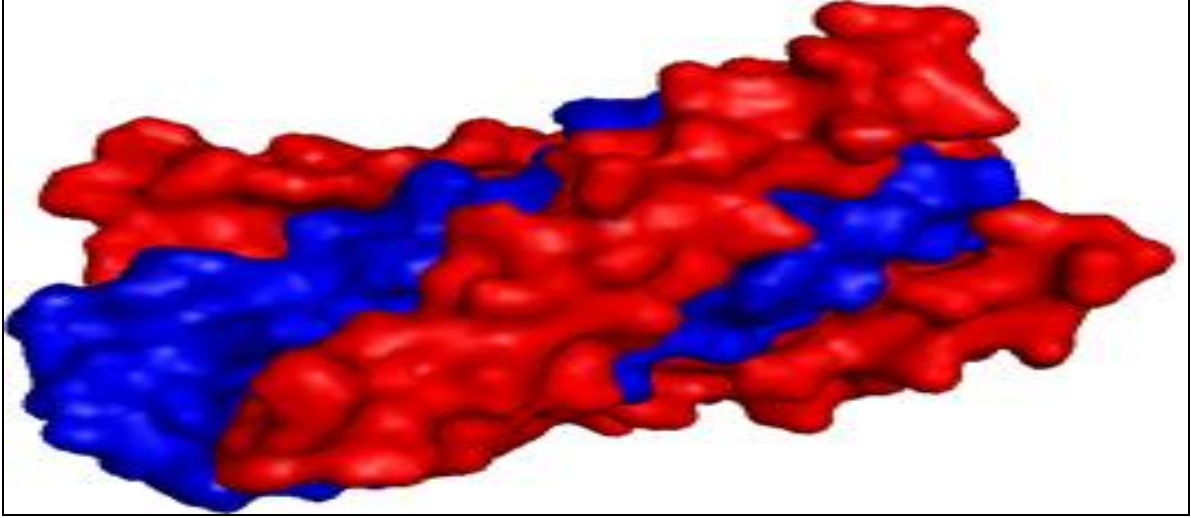
Şekil 2.10'da ise (Fung et al., 2004) gp 41'in sırasıyla hedef hücre membranına bağlanması, füzyon geçişi, HR2 yapısının sıkışması ve neticede 6-sarmal demet oluşumu belirtilmektedir. Bunun sonucunda viral membran hedef hücre membranına yerleştiği gözlenmektedir.



Şekil 2.10 Glikoprotein 41 oligomerinin katlanarak 6-sarmal yapıya dönüşümü

Bütün bunların yanında Enfuvirtide'nin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. İlk olarak ilacın kullanım maliyeti oldukça yüksektir. Bir hastanın yıllık kullanım maliyeti 25,000 dolar civarındadır. İkincisi ilacın oral yolla kullanılmasının eksikliği yüzünden hasta yüksek dozlara maruz kalmaktadır. Bu yüzden küçük yapıli gp 41 yapısını hedef alan anti HIV-1 bileşiklerine çok ihtiyaç duyulmaktadır. Ama şekil 2.11'de (Wang et al., 2010) görülen, gp 41 kırmızı renkli C –peptidi ile mavi renkli N –peptidi arasındaki

çok kuvvetli protein-protein etkileşimlerini küçük yapıli moleküllerin bloke etmesi oldukça zordur.



Şekil 2.11 Glikoprotein 41 C - ve N- peptid demeti

Bunun yanında gp 41 N-peptid demetinin yüksek hidrofobiklikte olması ve derin bir cebe sahip olmaması küçük moleküllerin kuvvetli bağlar yapmasına imkan tanır; bu da onu zor bir ilaç hedefi haline getirmektedir.

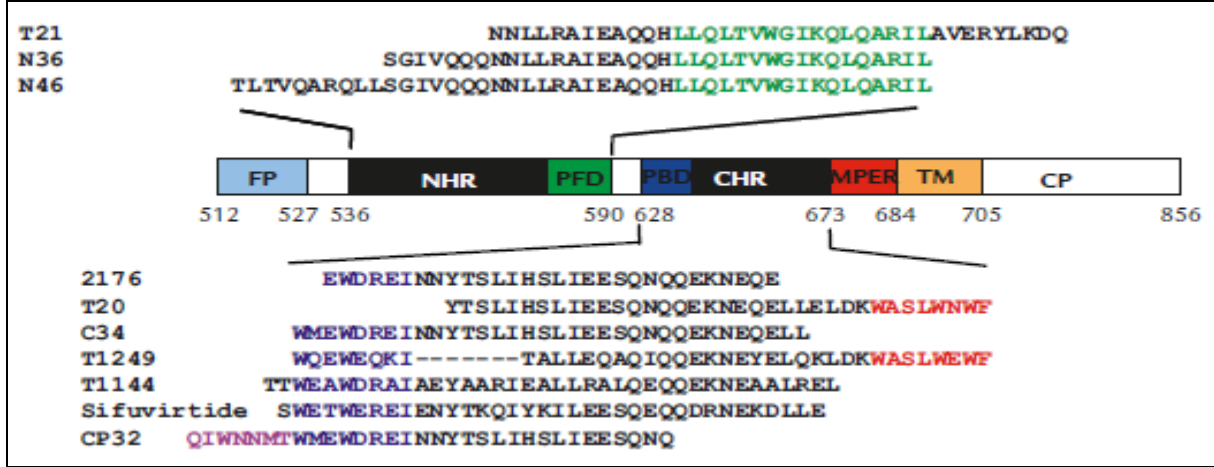
2.5 Gp41 Aday İnhibitörler

Glikoprotein 41 hedef alınarak geliştirilen inhibitörler peptit ve non-peptit olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

2.5.1 Peptit inhibitörler

Gp 41 molekülünün NHR ve CHR bölgelerinden türetilen peptitlere N-peptit ve C-peptit adları verilir (Debnath et al.,1999). 1990' lı yıllarda Jiang ve arkadaşlarının keşfettiği ilk güçlü anti - HIV peptit SJ-2176 olup, HIV-1 gp 41' in CHR bölgesinden (630-659 a.a) türetilmiştir (Pan et al ., 2010). Daha sonra, Wild ve arkadaşlarının önerdiği başka bir CHR peptit, T-20 (638-673 a.a), HIV füzyonuna karşı etkili inhibitör aktivitesine sahiptir (Wild et al.,1994) Protein tahlil stratejisi kullanılarak, Lu ve arkadaşları NHR seri peptitler tanımlamıştır; bunlar arasında N51(540-590 a.a), N36

(546-581 a.a) ve N34 (546-579 a.a) ve CHR peptit olarak da C43(624-666 a.a), C34 (628-661 a.a) ve C28 (628-655 a.a) tanımlanmıştır. Bütün bu yapılar şekil 2.12 'de (Pan et al ., 2010) yer almaktadır.



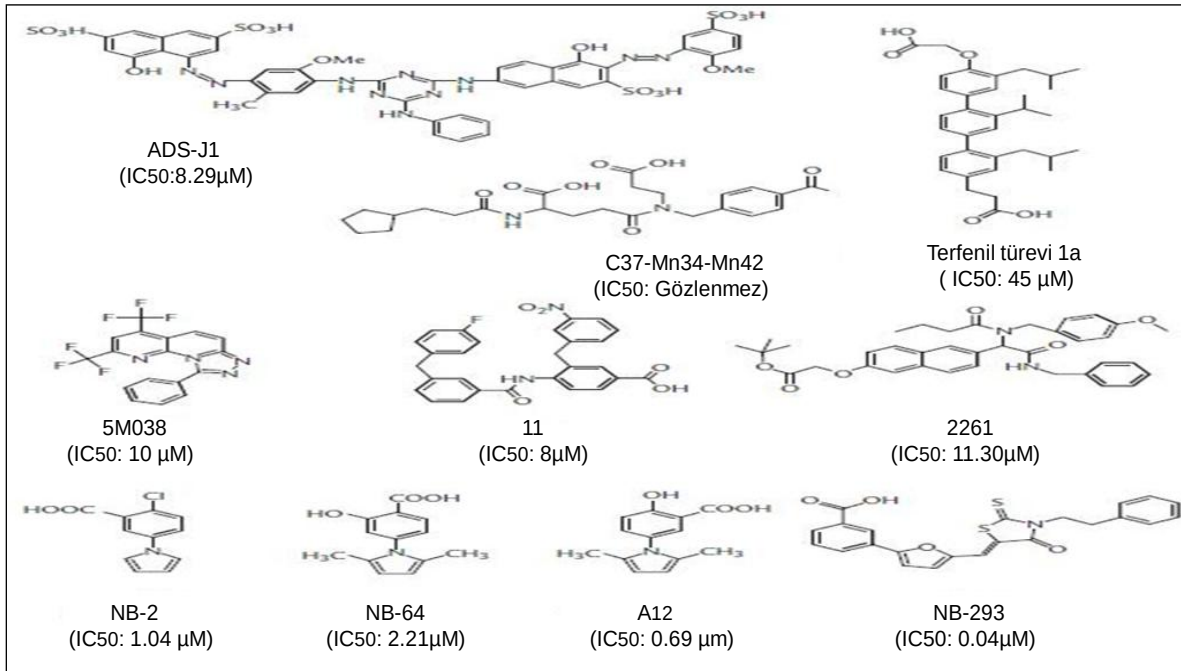
Şekil 2.12 gp 41 molekülü ve NHR ile CHR peptitlerinin dizilimi

SJ-2176 ve C34' ün her ikisi de viral gp 41 NHR bölgesiyle etkileşerek, virüs-hücre füzyonunda kritik basamak olan altılı sarmal yapının oluşumunu engellerler (Pan et al ., 2010). T20 Trimeris ve Roche tarafından geliştirilen ilk HIV füzyon/giriş inhibitörü olup 2003 yılından beri HIV hastalarında kullanılmaktadır. T20 için elde edilen IC₅₀ değeri nanomolar seviyesinde 3.0 'dır (Liu et al ., 2005). IC₅₀ değeri HIV 'in hücreye füzyon etkisini 50% oranında inhibe eden peptit konsantrasyonudur. T1249 'da Trimeris tarafından geliştirilmiş ikinci-nesil HIV füzyon inhibitörüdür. 39 aminoasit içeren bir yapıdır (a.a 628-635,643-673). Ön-klinik çalışmalar T1249' un T20 'ye göre daha büyük anti-HIV potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Fakat formülasyonundaki güçlükler yüzünden klinik çalışmalara ara verilmiştir (Melby et al ., 2007). T1144 Trimeris' in geliştirdiği başka bir peptit moleküldür. Aminoasit dizilimi C38 (626-673) arası olup T20 'ye göre kuvvetli anti-HIV aktivite göstermiştir. T1144, ilerideki geliştirmeler için ilgi çekici bir adaydır. FusoGen farmasötik firmasının geliştirdiği Sifuvirtide yeni nesil HIV füzyon inhibitörüdür. Aminoasit dizilimi C36 (627-662 a.a) arası olup HIV-1 gp41' in üç boyutlu yapı bilgileri ve bilgisayar modelleme analizleri temel alınarak yaratılmıştır. Sifuvirtide'nin klinik çalışmaları şu an Faz 2

aşamasındadır (<http://www.fusogen.com/en/indexen.asp.html>, 2010). CP32 ise 32 aminoasite (621-652) sahip olan CHR türevli bir peptitdir ve kuvvetli antiviral aktivite sunmaktadır. Bu moleküllerin yanında N-peptit karakterli moleküllere bakıldığında T21 ve N36 gibi HIV füzyon peptit inhibitörleri bulunmaktadır. T21 553 ile 590 arasındaki aminoasitlerden meydana gelmektedir. Fakat T21' in sadece ilk 25 aminoasiti CHR bölgesine bağlanır, kalan 13 aminoasitte bağlanma gözlenmez (Qadir and Malik, 2009). Aminoasit dizilimi 546 ile 581 arasında olan N36 peptiti, insan CD4 hücreleri ile viral membranın füzyon inhibisyonu için kullanılmaktadır.

2.5.2 Non-peptit inhibitörler

Anti-HIV peptitleri haricinde diğer bir sınıfta non-peptit anti-HIV bileşikler yer almaktadır. T20 etkili bir ilaç olmasına rağmen yıllık kullanım maliyeti, kandaki proteolitik enzimler tarafından kolayca degradasyona uğraması ve günde iki defa enjeksiyon sonucu çoğu hastada yan etkiler görülmesinden dolayı gp 41 hedefli, düşük kullanım maliyetli ve oral yollardan kullanılabilen küçük molekül HIV füzyon/giriş inhibitörlerine ihtiyaç vardır Şekil 2.13 (Pan et al ., 2010).



Şekil 2.13 Gp 41 hedefli küçük molekül anti-HIV bileşiklerinin kimyasal yapıları

HIV füzyon/giriş inhibitörü olarak geliştirilen ilk küçük molekül **ADS-J1**' dir (Debnath et al .,1999). **ADS-J1** HIV membran füzyonunu ve HIV replikasyonunu düşük μM aralığında IC_{50} ile engellemektedir. Moleküler kenetlenme analizleri neticesinde **ADS-J1** gp 41 N –heliks trimer yapısının derin hidrofobik cebine yerleştiği ve bu cepte yer alan aminoasitlerle etkileştiği görülmüştür. **ADS-J1**, gp 41 yapısını hedef alan uygun bir inhibitör olsa da yapısında bulunan azo grupları ve sülfonik asit gruplarının tümör oluşturma potansiyelleri yüzünden ilaç geliştirme için ideal öncü molekül değildir. İlaç-benzeri molekülleri içeren kimyasal kütüphanelerin yüksek veri taraması (high-throughput screening) tekniği kullanılarak 33,040 molekülün incelenmesi sonucunda kuvvetli anti –HIV aktiviteye sahip iki N-substitue pirol, **NB-2** ve **NB-64** tanımlanmıştır (Jiang et al ., 2004). Her iki molekülde efektif biçimde HIV füzyonuna engel olmaktadır. Bilgisayar destekli moleküler kenetlenme analizleri de her iki molekülün gp 41 hidrofobik cebine yerleştiğini göstermektedir. **NB-2** ve **NB-64** yapısını baz alarak, Xie ve meslektaşları tasarlayıp sentezledikleri N-karboksifenilpirol türevlerinin bazılarında umut verici anti-HIV aktiviteleri tespit etmişlerdir. En aktif bileşik **A₁₂** kodlu yapıdır; altılı sarmal yapı oluşumunda (EC_{50} 37,36 μM) ve gp 41HIV enfeksiyonunu durdurmada (IC_{50} 0,69 μM) sahip olduğu değerler onu etkili ve aktif bileşik yapmaktadır. Ayrıca HIV hücre-hücre füzyonunda da etkili olduğu tespit edilmiştir. Moleküler kenetlenme analizi sonucunda **A₁₂** 'nin karboksil grubu gp41' in NHR bölgesiyle etkileşmektedir. Ayrıca sahip olduğu iki grupta gp41'in hidrofobik aminositleriyle etkileşmeye uygundur (Liu et al ., 2008). Bu sebeple gp 41 molekülünü hedef alan daha etkili olabilecek yeni moleküllerin tasarımında **A₁₂**'nin öncü molekül olabileceğine inanılmaktadır. Bunların haricinde geliştirilen diğer bir molekül **C7-Mn34-Mn42** gözlenebilir anti –HIV aktivitesine sahip değildir. Katritzky ve arkadaşlarının sentezlediği moleküllerden biri olan **NB-293** yapısının önemli anti-HIV aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiş olup bu molekül yeni geliştirilecek yapılara önderlik edebileceği söylenebilir. **Terfenil türevi 1a, 11, 2261** ve **5M038** diğer önemli anti-HIV aktivitesi gösteren küçük moleküllerdir. Bütün bu bilgilerin ışığında, **A₁₂** molekülü gp 41'in NHR hidrofobik cebine yerleşmesi ve bu ceple etkileşmesi, önemli anti–HIV aktivitesi göstermesi ve küçük yapıli olmasından dolayı önder molekül olarak seçilmesi ve moleküler kenetlenme çalışmamızda kullanılması uygun görülmüştür.

2.6 Gp 41 Kenetlenme Çalışmaları Literatür Özeti

HIV gp 41 yapısını hedef alan çalışmalara literatürde çok sık rastlanmamaktadır. Gp 41 molekülünün karmaşıklığı ve HIV giriş mekanizmasının oldukça komplike olması etkili bir inhibitörün geliştirilmesine engel olmaktadır. Fakat son yıllardaki gelişmelere paralel olarak bu konu üzerine çeşitli makaleler yayınlanmaktadır. Protein yapılarını temel alan ilaç tasarımı kenetlenme yöntemi kullanılarak küçük bir molekülün proteine bağlandığı konformasyonlar görülebilmekte ve ikisi arasındaki etkileşimler incelenebilmektedir. Ayrıca gelecekte gp 41 proteini ile ilgili X-ışını üç boyutlu yeni yapıların keşfi sayesinde de araştırmacılar daha güvenilir sonuçlara ulaşma şansı yakalayabileceklerdir.

2004 yılında Jiang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ChemBridge şirketine ait olan kimyasal kütüphanede ilaç-benzeri olabilecek yapıların taranması sonucunda ilaç-benzeri iki N-substitue pirol türevi olan NB-2 ve NB-64 molekülleri tanımlanmıştır. Sonrasında gp41'in X-ışını kristal yapısı olarak 1aik protein veritabanından alınmıştır. Hegzamer olan bu yapının hedef bölgesi olan NHR 'deki hidrofobik alanı açığa çıkarmak için bir C-zinciri ve su molekülleri yapıdan uzaklaştırılmıştır. NB-2 ve NB-64 molekülleri fizyolojik pH için iyonlaştırma işleminden geçirilmiştir. NB-2 ve NB-64 moleküllerinin ve gp 41 yapısı olan 1aik'nın kenetlenme simülasyonuna hazırlanması ve moleküler kenetlenme işleminin gerçekleştirilmesi için Glide 2.5 programı kullanılmıştır. Yapılan moleküler kenetlenme çalışması sonucunda her iki bileşiğin karboksilik asit grubunun gp 41 yapısındaki pozitif yüklü Lys 574 aminoasitiyle tuz köprüsü oluşturduğu ve her iki bileşiğin biraz farklılık olsa da gp 41'in Trp 571 ve Ile 573'ten oluşan hidrofobik bölgesine yerleştiği görülmüştür.

2008 yılında Teixeira ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise NB-2 ve NB-64 moleküllerinden hareket edilerek yeni iskelete ve yüksek etkiye sahip moleküllerin tasarlanması gerçekleştirilmiş olup tasarlanan moleküller arasında A₁₂ yapısıda bulunmaktadır. Protein veritabanından gp41'in X-ışını kristal yapısı olarak 1aik seçilmiştir. Hegzamer olan bu yapının hedef bölgesi olan NHR 'deki hidrofobik alanı açığa çıkarmak için bir C-zinciri ve su molekülleri yapıdan uzaklaştırılmıştır. A₁₂

molekölü fizyolojik pH için iyonlaştırma işleminden geçirilmiştir. A_{12} molekülünün ve gp 41 yapısı olan 1aik'nin kenetlenme simülasyonuna hazırlanmasıyla moleküler kenetlenme işlemini gerçekleştirmesi için Autodock 3.0.5 programı kullanılmıştır. Yapılan moleküler kenetlenme çalışması sonucunda en aktif bileşik olan A_{12} yapısının gp 41'in Trp 571, Gln 575, Arg 579, Leu 581, Gln 577, Lys 574 ve Ile 573'ten oluşan hidrofobik cebe yerleştiği görülmüştür. Ayrıca A_{12} 'nin karboksilat grubu ile Gp 41'in Arg 579 aminoasiti arasında elektrostatik etkileşim ve Gln 575 aminoasiti ile de hidrojen bağı tespit edilmiştir.

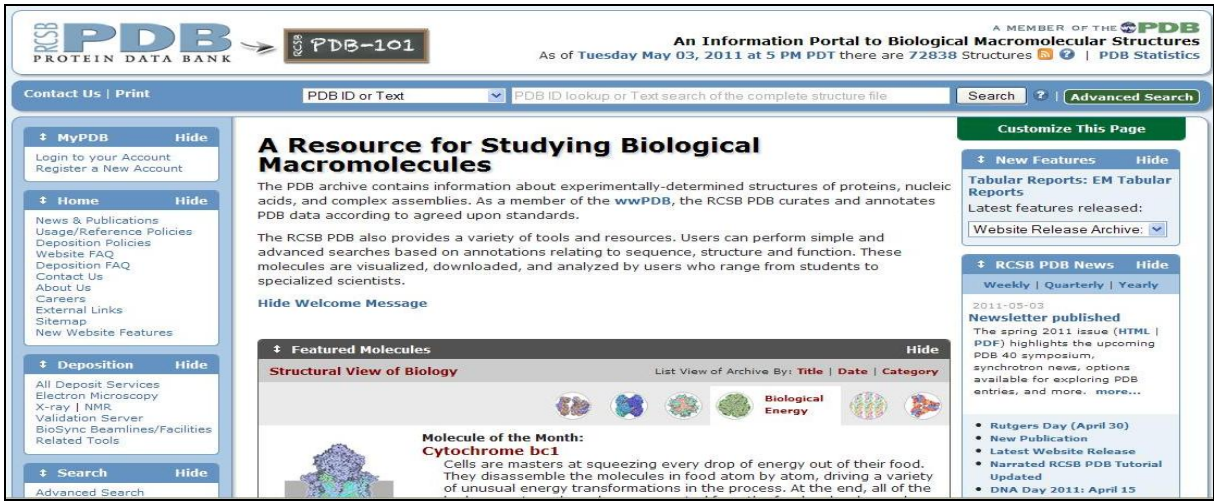
2009 yılında Wang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise A_{12} yapısının gp 41 molekülü ile etkileşimi ve molekülde yerleştiği bölge incelenmiştir. Protein veritabanından gp41'in X-ışını kristal yapısı olarak 2r5d seçilmiştir. Bu yapının hedef bölgesi olan NHR 'deki hidrofobik alanı açığa çıkarmak için üç mutant zincir ve su molekülleri yapıdan uzaklaştırılmıştır. A_{12} molekülü fizyolojik pH için iyonlaştırma işleminden geçirilmiştir. A_{12} molekülünün ve gp 41 yapısı olan 1aik'nin kenetlenme simülasyonuna hazırlanmasıyla moleküler kenetlenme işlemini gerçekleştirmesi için Autodock 4.0 programı kullanılmıştır. Moleküler kenetlenme işlemi sonucunda A_{12} 'nin daha önceki çalışmalara göre farklı bir bağlanma moduna sahip olduğu ortaya konmuştur. A_{12} 'nin negatif yüklü karboksilik asit grubuyla gp 41'in pozitif yüklü Lys 574 aminoasiti arasında tuz köprüsü olduğu, gp 41'in Gln 41 aminoasiti ile A_{12} 'nin aynı karboksilik grubuyla hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Ayrıca A_{12} yapısının Leu 29, Leu 32, Thr 33, Val 34 ve Ile 37'den oluşan hidrofobik cebe yerleştiği görülmüştür.

2010 yılında Gochin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise 1-5i olarak gruplandırılan ligandların gp 41 molekülü ile etkileşimi ve molekülde yerleştiği bölge incelenmiştir. Gp 41 yapısı olarak üç farklı pdb yapısı 3p7k, 2r5d ve 2kp8 seçilmiştir. Ligandlara kenetlenme işlemi için iyonlaştırma uygulanmamıştır. Kenetlenme işlemi autodock 4.2 ve autodock vina ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan işlemin sonuçlarına göre ligandların gp 41 ile etkileştiği ve gp 41'in hidrofobik bölge aminoasitlerinden Lys 574 ya da Arg 579 ile hidrojen bağı veya tuz köprüsü oluşturabilecekleri görülmüştür.

2.7 Protein Veritabanı

Protein veritabanı (PDB) proteinler ve nükleik asitler gibi büyük biyolojik moleküllerin 3-boyutlu yapılarının bulunduğu zengin bir kaynaktır. Protein data bankta yer alan bilgilerin kaynağını X-ışını kristalografi veya NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi sağlamaktadır. Protein data bank toplamda 63306 X-ışını ve 8858 NMR karakterli yapı içermektedir (http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_Data_Bank, 2011).

Dünyanın dört bir yanından biyologların ve biyokimyacıların sunduğu yapı bilgilerine eğitimciler, öğrenciler ve araştırmacılar <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do> adlı web sayfasından erişebilmektedir. Şekil 2.14' te protein veri tabanı web sayfasının görünümü yer almaktadır.



Şekil 2.14 Protein veritabanı web sayfası

Protein data bankta yer alan makromoleküller pdb uzantısına sahip biçimlerde bulunmaktadır. Pdb dosyalarını tanımlamak için dört adet karakter kullanılır. 4hhb, bu tanımlamaya bir örnek olup, her molekül için ilk karakter rakamdan meydana gelmektedir. Protein veritabanındaki yapılar .pdb formatında yer almaktadır. Bu format makromolekül olan proteinin atomik koordinatları, birincil ve ikincil yapı bilgileri, kristalografik yapı faktörleri ve NMR bilgilerini içerir. Pdb formatı ilaç tasarımında kullanılan programların birçoğunda tanınmaktadır.

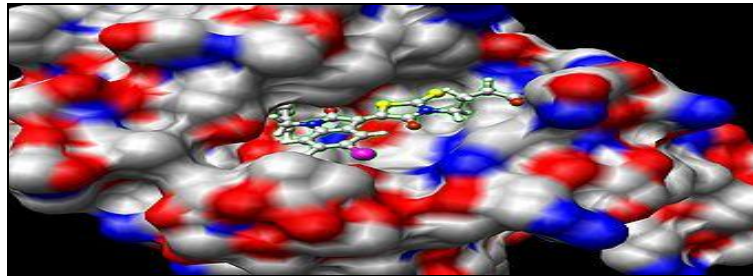
2.8 Bilgisayar-Destekli İlaç Tasarımı

İlaç tasarımı, biyolojik yapılar ve hedef moleküller temel alınarak yeni ilaç geliştirilmesi için izlenen adımlar bütünüdür. İlaç tasarımı kapsamında değişik ilaç moleküllerinin tasarımı yer alır ; bu moleküller biyolojik yapılara bağlanarak ve onlarla etkileşerek farmakolojik etkilerin oluşmasını sağlamaktadırlar. İlaç tasarımının modern uygulaması ise bilgisayar yardımıyla gerçekleşir ve bilgisayar destekli ilaç tasarımı olarak bilinir. Teorik kimyayı kullanarak ilaçları ve ilaçlarla ilgili biyolojik aktifliğe sahip molekülleri ve aktif molekül parçalarını araştırır. Temel amaç belirlenen küçük molekülün hedefe bağlanıp bağlanmadığını ve farmakolojik etkiye neden olup olmadığını araştırmaktır. Bu çalışmaları gerçekleştirmek için birçok program bulunmaktadır.

2.9 Moleküler Kenetlenme

Kenetlenme, bir molekülün başka bir moleküle bağlandığında beraberce kararlı kompleks oluşturlarken tercih edilen yönlenmelerini tahmin etmeye yarayan bir metottur. Tercih edilen yönlenme bilgisi sayesinde iki molekül arasındaki bağlanma afinitesi elde edilebilir.

Kenetlenme, çoğunlukla küçük molekül ilaç adaylarının hedef protein yapılarına bağlanma yönelimini tahmin etmeye ve bunun sonucunda küçük moleküllerin afinitesini ve aktivitesini öngörmeyi sağlamaktadır. Aşağıda yer alan şekil 2.15'te (http://en.wikipedia.org/wiki/Docking_molecular, 2010) proteine kenetlenen küçük molekül görülmektedir.



Şekil 2.15 Proteine kenetlenen küçük molekül gösterimi

2.9.1 Moleküler Kenetlenme Yazılımları

Bir bilgisayarın ilaç tasarımını gerçekleştirebilmesi için ihtiyaç duyduğu yazılımlardan bazıları aşağıda yer almaktadır.

2.9.1.1 Autodock 4.0

Autodock, otomatik kenetlenme yazılımı olup 3 boyutlu yapısı bilinen bir moleküle küçük moleküllerin (substrat ya da ilaç adayı gibi) bağlanması için kullanılan bir yazılımdır. Morris ve arkadaşları tarafından 1998 yılında geliştirilmiş olup (Morris et al., 1998) iki farklı programdan oluşmaktadır. Bunlardan ilki autodock olup, protein yapısına sahip olan hedef moleküle ligandın kenetlenmesini sağlar. İkincisi ise autodock ile kenetlenme hesaplamaları hedef yapı için afinite haritalarını oluşturmayı sağlayan yani grid değerlerinin ayarlandığı autogrid olup bu program hedef moleküle ligandı bağlayan ön hesaplamayı gerçekleştirir. Autodock tools olarak adlandırılan grafik arayüzü sayesinde de kenetlenme çalışmaları için ligandın, proteinin, grid dosyalarının, grid kutusunun ve kenetlenme parametrelerinin yer aldığı dosyaların hazırlanması ve kenetlenme sonuçlarının incelenmesi gerçekleştirilir. Autodock uygulamaları arasında X-ışını kristalografi, yapı-temelli ilaç tasarımı, sanal tarama ve kimyasal mekanizm çalışmaları vardır. Autodock yazılımına ücretsiz olarak <http://autodock.scripps.edu> adresinden erişilebilir.

2.9.1.2 GOLD

GOLD bir kenetlenme yazılımı olup Sheffield Üniversitesi, GlaxoSmithKline ve Cambridge Kristalografik Data Merkezi tarafından geliştirilmiştir. GOLD ilaç sanayinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Protein-ligand kenetlenmesi için hızlı bir genetik algoritma kullanır, bu algoritma ligand esnekliğini ve aktif bölge esnekliğini ölçmeyi sağlamaktadır. [Http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/](http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/) adresinden ulaşılabilecek bir yazılım olan GOLD ücretlidir.

2.9.1.3 FlexX

FlexX ticari bir yazılım olup temel uygulamaları arasında, üç boyutlu yapısı bilinen protein ve küçük ligand molekülü için protein-ligand kompleksinin geometrisini tahmin etmek ve bir milyonun üzerinde bileşiği sanal olarak taramak yer almaktadır. <http://www.biosolveit.de/licence/evaluation.html?product=flexx> adresinden lisans bilgilerine erişilebilir.

2.9.1.4 Dock

Dock ilaç tasarımı üzerine geliştirilen ilk yazılım olup 1980' lerde Tack Kuntz ve grubu tarafından başlangıcı sağlanmıştır. Küçük moleküllerin bağlanma modunu genetik algoritma kullanarak tahmin eder. <http://dock.compbio.ucsf.edu/> adresinden ücretsiz olarak erişilebilecek bir yazılım olan Dock 2006 yılından beri altıncı versiyon olarak kullanılmaktadır. Tablo 2.2' de yazılımların protein ve ligand esnekliği bakımından sınıflandırması yer almaktadır.

Tablo 2.2 Kenetlenme Yazılımlarının Protein ve Ligand esnekliğine göre ayrımı

Yazılım	Esnek protein?	Esnek ligand?
AutoDock	Evet	Evet
FlexX	Hayır	Evet
GOLD	Kısmen	Evet
Dock	Hayır	Evet

2.10 Görsel Ligand Taraması

Moleküler kenetlenme için ihtiyaç duyulan potansiyel ligandları ve hedef proteinin bağlanma bölgelerine kenetlenmeleri bilgisayar destekli ilaç tasarımının ana görevidir. Görsel tarama olarak adlandırılan bu metot, ilaç keşif süreçlerinde sıkça kullanılmaktadır. Moleküler kenetlenme programları otomatik olarak databanklardan küçük molekülleri alır ve onların hedef proteindeki bağlanma bölgelerine kenetlenmelerine aracılık eder. Ligand-yapı sistemi için kenetlenme sanal bir ligandın

yapıyla nasıl etkileştiğinin cevabıdır. Bilgisayar programlarındaki çeşitli filtrelemeler kullanılarak istenmeyen bileşiklerin sanal taramadan çıkarılması sağlanmaktadır (Liu and Jiang, 2004). Walter ve arkadaşları, görsel taramayı kısaca bilgisayar programları kullanarak bileşik kütüphanelerinin otomatik olarak değerlendirilmesi olarak tanımlamıştır.

Görsel taramada, hedef proteinin detaylı kristalografik yapıya sahip olması çok önemlidir. Eğer proteinde yüksek ayırıcılığa sahip bağlanma bölgesi bulunmuyorsa, kenetlenme ya da skor sonuçları doğru olmayacak ve genellikle yanlış sonuçlar açığa çıkacaktır. Genellikle 1.5 Å' ün altındaki değerler yüksek ayırıcılığı ifade eder (Davis et al., 2003).

3.MATERYALLER VE METODLAR

3.1 Kullanılan Donanımlar

AMD Opteron 885 donanımlı işlemciye sahip Sun iş istasyonu, kenetlenme işlemleri ve sonuçlarının analizinde kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Yazılımlar

Moleküler kenetlenme işlemini gerçekleştirebilmek için birçok yazılım bulunmaktadır. Kullanılan yazılımlar aşağıda yer almaktadır.

3.2.1 ZINC veritabanı

ZINC veritabanı 13 milyonun üzerinde satın alınabilir ve moleküler kenetlenme işlemine hazır bileşik içermektedir. Veritabanı üzerinden ücretsiz olarak indirilebilen yapılar ticari olarak da satın alınabilmektedir. Shoichet laboratuvarları tarafından geliştirilen veritabanı kullanılırken çeşitli parametrelere göre indirme işlemleri yapılabilmektedir. Örneğin oral yolla aktif olabilecek bir ilaç adayı için Lipinski' nin beşler kuralı uygulanmalıdır. Bu kurallar arasında yapının molekül ağırlığı 500 g/mol'den az olmalı, 5' ten fazla H-bağı yapan elektron verici ve 10' dan fazla H-bağı yapan elektron çekici gruba sahip olmamalı ayrıca partiyon katsayısı logP 5'ten küçük olmalıdır (Heesen et al., 2007). Bunun yanında referans bir bileşik varsa bu bileşiği siteye yükleyerek benzer karakterdeki yapılar tespit edilebilmektedir. <http://zinc.docking.org/> adresinden siteye ulaşılabilir.

3.2.2 UCSF Chimera

UCSF Chimera, geniş bir uygulama alanına sahip yazılımdır. Moleküler yapıların ve ilgili bilgilerin interaktif görselleştirilmeleri kapsamında yoğunluk haritaları, seri hizalama, kenetlenme sonuçları, yörüngeler ve konformasyonel gruplar yer almaktadır. Chimera yazılımı akademik ve yönetimler tarafından kazanç sağlamayacak şekilde ücretsiz olarak kullanılabilir. <Http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> adresinden yazılıma ulaşılabilir.

3.2.3 Pymol

Pymol yazılımı 3-boyutlu biyomoleküler şekilleri isteğe göre düzenlemek için kullanılan bir yazılımdır. Bu biyomoleküllerin görünümüleri pymol kullanılarak küre, şerit, çubuk vb.. şeklinde görülebilir. Ayrıca ligand kenetlenme görünümüleri de yazılımın özellikleri arasındadır. Kentlenme sonucu ligand ve molekül arasındaki etkileşimleri incelemek için de kullanılır. Akademik kullanım için ücretsiz bir yazılımdır. [Http://www.pymol.org/](http://www.pymol.org/) adresinden yazılıma erişilebilmektedir.

3.2.4 Autodock

Autodock yazılımı, 3 boyutlu yapıya sahip reseptörlere küçük moleküllerin bağlanması ile ilgili tahminde bulunan bir yazılımdır. Autodock akademik, yönetim kuruluşları için ücretsizdir. Yazılıma <http://autodock.scripps.edu/> adresinden erişilebilmektedir.

3.2.5 Raccoon

Raccoon yazılımı, Autodock sanal taraması için grafik arayüz hazırlığının yapılmasını sağlar. [Http://autodock.scripps.edu/resources/raccoon](http://autodock.scripps.edu/resources/raccoon) adresinden ücretsiz olarak elde edilebilir.

3.2.6 Cygwin

Cygwin, <http://www.cygwin.com/> adresinden temin edilebilen ücretsiz bir yazılım olup Linux komutlarını Windows temelli bilgisayarlara adapte etmeye yarar.

3.2.7 Gaussian

Gaussian yazılımı, enerji, moleküler yapı ve moleküler sistemlerin titreşimsel frekanslarını temel hesaplama çeşitlerini baz alarak tahmin eder. Moleküllerin, reaksiyonların ve deneysel olarak gözlenmesi mümkün olmayan ya da zor olan kısa-ömürlü geçiş moleküllerinin anlaşılmasında kullanılabilir. Gaussian ücretli bir yazılım olup, lisans bilgilerine <http://www.gaussian.com/> adresinden ulaşılabilir.

3.2.8 Chemoffice

Cambridgesoft tarafından geliştirilen Chemoffice yazılımı özellikle kimya akademisyenlerine hitap eden bir yazılımdır. İçerdiği Chemdraw yazılımı ile kimyasal moleküllerin şekilleri kolayca çizilebilir. Chem3D yazılımıyla da bu şekiller 3 boyutlu olarak kaydedilebilir ve moleküllerin enerji minimizasyonu yapılabilir. Ayrıca Gaussian yazılımı için giriş dosyaları da Chem3D yazılımıyla hazırlanabilir. Kimyacılar için içerdiği yazılımlar arasında ChemFinder ve ChemACX 'de yer almaktadır. Chemoffice ücretli yazılım olup lisans bilgileri <http://www.cambridgesoft.com/software/chemoffice> adresinden ulaşılabilir.

3.2.9 Autodock vina

Autodock Vina, ilaç keşfi, moleküler kenetlenme ve sanal tarama için kullanılan çoklu çekirdek kapasite seçeneği sunabilen yüksek performans ile geliştirilmiş doğruluğa sahip ve kolay kullanıma sahip bir yazılımdır. Autodock Vina Dr.Oleg Trott tarafından tasarlanmış ve geliştirilmiş olup <http://vina.scripps.edu> adresinden yazılıma erişilebilmekte ve ücretsiz olarak kullanılabilir.

Vina yazılımı, Autodock yapı dosyalarından PDB biçiminin genişletilmiş bir hali olan PDBQT biçimine uygun olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu sayede, Autodock için geliştirilen yardımcı yazılımlar ile dosya hazırlama, kenetlenme yapılacak bölgeyi belirleme ve sonuçları inceleme açısından vina yazılımında kullanım kolaylığı sağlanmış olur. Ayrıca, grid haritaları için manuel olarak atom tiplerinin seçimi ile grid harita dosyalarının AutoGrid ile hesaplanması ve kenetlenme sonrasında sonuçların küme şeklinde toplanmasına gerek yoktur çünkü Vina bunları otomatik olarak kendisi yapmaktadır. Sonuçları da kendisi gruplandırarak kullanıcıyı detaylara maruz bırakmaz (Trott and Olson, 2010).

Autodock Vina, Windows XP ve sonraki versiyonlarda kullanılabilir. Fakat Autodock Vina'yı Windows'ta kullanmak için işletim sistemine Cygwin isimli program yüklenmesi gereklidir. Autodock Vina Linux ve Mac platformlarında da kullanılabilir.

Programı Windows' ta başlatmak için Cygwin açılarak gelen ekrana "\\Program Files\\The Scripps Research Institute\\Vina\\vina.exe" yazılarak kenetlenme işlemi çalıştırılabilir. Autodock Vina programını çalıştırmak için gerekli minimum giriş dosyaları reseptör, ligand ve konfigürasyon olarak adlandırılan ve kenetlenmenin yapılacağı alanın belirtildiği dosyalardan oluşmaktadır. Tipik bir konfigürasyon dosyasının içeriği şekil 3.1'de görülmektedir.

```
receptor = hsg1/rigid.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

center x = 2
center_y = 6
center_z = -7

size x = 25
size y = 25
size_z = 25

energy_range = 4
```

Şekil 3.1 Autodock Vina için hazırlanan tipik konfigürasyon dosyası örneği

Konfigürasyon dosyasında reseptör.pdbqt, ligand.pdbqt ve kenetlenmenin kapsayacağı alan (merkez ve boyut olarak) belirtilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuç konformasyonlarının aralarındaki enerji farkını tanımlamak için enerji dağılımı da dosyaya eklenebilir. Kenetlenme sonucunda bağlanma afinitesi kcal/mol biriminden ifade edilir. RMSD hesabı ise en iyi moda göre ve sadece hareketli ağır atomların kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Moleküler kenetlenme ile tek bir ligand denenirken sanal tarama ile birçok ligandı tek bir yapıya kenetlemek Vina ile mümkündür. Bunu Windows platformunda gerçekleştirirken öncelikle reseptör ve çoklu ligand dosyaları aynı dizine alınır, sonrasında da cygwin yazılımının ekrana gelen satırına şekil 3.2'deki komutlar yazılır.

```
for f in ligand_*.pdbqt; do
    b=`basename $f .pdbqt`
    echo Processing ligand $b
    mkdir -p $b
    vina --config conf.txt --ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log
    ${b}/log.txt
done
```

Şekil 3.2 Autodock Vina çoklu ligand dosyaları için kenetlenmeyi başlatma komutu

Bu işlemin tek ligand kenetlenmesine göre farklılığı, birden çok ligandın f olarak gruplanmasından dolayı konfigürasyon dosyasına tekrar ligand.pdbqt eklenmesine ihtiyaç duyulmamasıdır.

3.3 Çalışma Aşamaları

Tez çalışması iki aşamada gerçekleştirilecek olup ilk olarak HIV gp 41 ile ilgili mevcut X-ışını kristal yapıları arasından görsel ligand taraması için en uygun yapının seçilmesi tamamlanacak ve ikinci aşamada ise HIV gp 41 hedefli yeni küçük inhibitör adayları tasarlamak için görsel ligand taraması gerçekleştirilecektir.

3.3.1 Protein veribankasından gp 41 ile ilgili yapıların seçilmesi

Protein data banktan (PDB) alınan bilgiler ışığında gp 41 ile ilgili 170 adet yapı olduğu görülmüştür (Gochin et al., 2010). Bu yapıların hiçbiri glikoprotein 41 molekülünün tam zincirini içermemektedir. Protein veribankasında yer alan gp 41 ile ilgili X-ışını yapıları gp 41'in NHR ve CHR bölgelerinden türetilen sentetik C-peptid ve N-peptid yapılara aittir. Gp 41 ile ilgili X-ışını yapılarından henüz hiçbiri gp 41'in küçük molekülle birlikte bulunduğu kristalize kompleks yapıyı bulundurmamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız ve gp 41 ile ilgili protein yapıları tablo 3.1'de yer almaktadır (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>,2010). Bu yapılarda bulunan aminoasitlerde eksikliklere ve bazılarında da mutasyonlara rastlanmaktadır. Her ikisinde trimer yapı olarak kullanılan **2r5d** ve **2q7c** 50 aminoasit içeren gp 41 NHR bölgesiyle yalnızca 16 aminoasit benzerliği gösterir ve diğer aminoasitleri orjinal yapıdan farklıdır. Hegzamer yapıya sahip olan **1aik** ve dimer yapıdaki **2zzo** ise orjinal gp 41NHR bölgesinden 36 aminoasit ve CHR bölgesinden 34 aminoasit ile aynı aminoasit dizilimine sahiptirler.

Tablo 3.1 Glikoprotein 41 molekülü ile ilgili pdb yapıları

	N-uç birim [*]			C-uç birim ^α			
pdb	Zincir1	Zincir2	Zincir3	Zincir4	Zincir5	Zincir6	Ayırıcılık
1aik (hegzamer)	N36 (36a.a)	N36 (36a.a)	N36 (36a.a)	C34 (34a.a)	C34 (34a.a)	C34 (34a.a)	2.00 Å
2zzo (dimer)	N36 (36a.a)	-	-	C34 (34a.a)	-	-	2.20 Å
2r5d (trimer)	N46 (16a.a)	N46 (16a.a)	N46 (16a.a)	-	-	-	1.66 Å
2q7c (trimer)	N45 (16a.a)	N45 (16a.a)	N45 (16a.a)	-	-	-	2.00 Å

* Gp 41'in NHR bölgesi (50 aminoasit)

^α Gp 41'in CHR bölgesi (40 aminoasit)

Parantez içinde verilen değerler orijinal gp 41 ile özdeş aminoasite sahip numaraları göstermektedir.

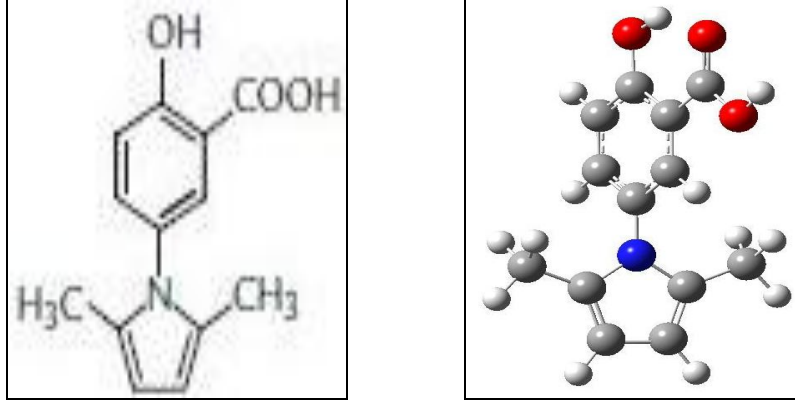
Daha önce yapılmış olan çalışmalarda gp 41'in NHR bölgesinin pentamer olarak kabul edildiği gözlenmiştir. Literatürde NHR bölgesi pentamer haricinde ele alan bir çalışma bulunmadığından NHR bölgelerinin bağlanma yerlerini araştırmak için farklı yapılar ele alınmıştır. Bunun içinde NHR monomer olarak **2zzo**, trimer olarak **2q7c**, **2r5d** ve **1aik** ile önceki çalışmalarda kullanılan pentamer yapıda çalışmaya dahil edilmiştir. 2zzo bir N-peptid ve bir C-peptid içerir. **2r5d** üç ve **2q7c** üç N-peptid içerir. Son olarak **1aik** üç N-peptid ve üç C-peptid içerir. Hedef alınan bölge gp 41'in N-terminal bölgesidir. Bu yüzden **2zzo** yapısından bir C-zinciri uzaklaştırılarak monomer yapı, 1aik yapısından da bir C-zinciri uzaklaştırılarak pentamer yapı elde edilmiştir. NHR trimer hedef yapıyı oluşturmak içinde **1aik** yapısından üç C-peptid uzaklaştırılmıştır. Bunun sebepleri arasında X-ışını yapılarında gerçekleştirilen değişikliklerin kenetlenme sonuçlarına etkisini gözlemlemek yer almaktadır. **2r5d** yapısı **2q7c** yapısına göre bir fazla aminoasit içermesine rağmen her ikisinde gp 41 NHR bölgesindeki 50 aminoasitten sadece 16 aminoasit ile aynı dizilime sahiptir. Bunun yanında trimer 1aik ise NHR bölgesindeki 50 aminoasitten 36 'sı ile aynı dizilimi göstermektedir. Bütün bu bilgilerin ışığında gp 41 molekülüne maksimum benzerlik gösteren yapı **1aik** olduğundan bu yapı hem trimer hem de pentamer olarak incelenmiştir.

3.3.2 Ligand molekülü A₁₂'nin hazırlanması

Ligand molekülü A₁₂'nin Autodock Vina kenetlenme çalışması için hazırlanması ilk aşamada Chemdraw programı ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle yapısı bilinen A₁₂ Chemdraw programında çizilmiştir. Şekil 3.3 a'da ligand giriş yapısı görülmektedir. Daha sonra bu yapının optimizasyon işlemi DFT seviyesinde 6-31G/B3LYP seçeneği kullanılarak Gaussian programında gerçekleştirilmiştir.

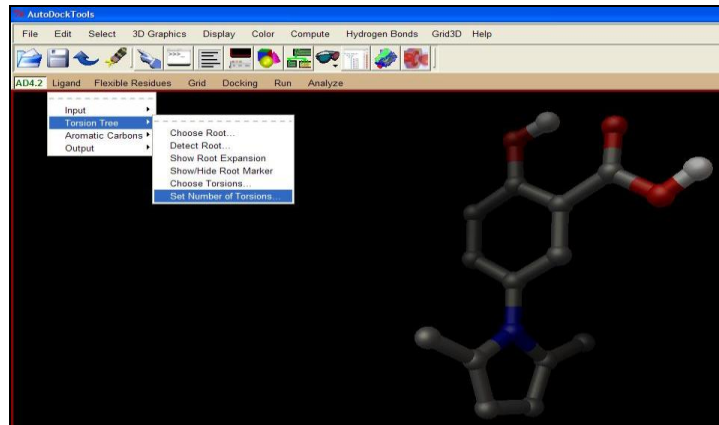
Ek 1'de Gaussian programındaki ligandın optimizasyon parametreleri görülmektedir. DFT (Density Functional Theory) çoklu bağ sistemlerinin elektronik yapısını incelemek için kullanılan kuantum mekanik modelleme metodları arasında yer alır. B3LYP ise DFT'ye uygulanan hibrid fonksiyonel yaklaşımlardandır. DFT metodunda

bir temel tanımlanması gereklidir bu da eksiksiz temel set olarak adlandırılan 6-31G ile gerçekleştirilir.



Şekil 3.3 (a) Chemdraw programında çizilen A₁₂ ligandının görünümü (b) A₁₂ Ligandının Gaussian programında optimizasyon sonrası görünümü

Optimizasyon işlemi tamamlandıktan sonra ligand yapısı Gaussian'da *.pdb formatında kaydedilir. Bu formatta kaydedilen yapı Şekil 3.3 b'de görülmektedir. Ardından ligand yapısı autodock tools kullanılarak açılmış, Gasteiger yükleri belirlenmiş ve polar olmayan hidrojenler birleştirilmiştir. Sonrasında torsiyon kökleriyle beraber ligand molekülündeki torsiyon sayısı tespit edilmiştir. Bu işlemlerin ardından ligand yapısının *.pdbqt formatında kaydedilmesiyle beraber moleküler kenetlenme işlemine hazırlanma süreci sona ermiştir (Şekil 3.4). Ligandın karboksilik asit grubunda yer alan proton yapıdan uzaklaştırılmamıştır.



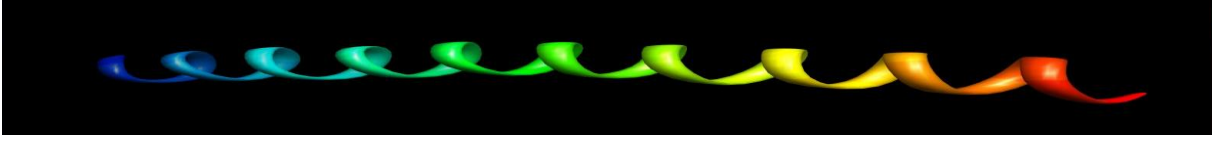
Şekil 3.4 A₁₂ ligandının Autodock tools kullanılarak hazırlanması. Molekülün torsiyon sayısının tespit edilmesi

3.3.3 HIV giriş yapılarının hazırlanması

HIV gp 41 NHR bölgesinin hedef alan olarak seçilmiş olan 2zzo, 2q7c ,2r5d ve 1aik yapılarının moleküler kenetlenme işlemine hazırlık aşamaları birkaç basamakta gerçekleşmektedir.

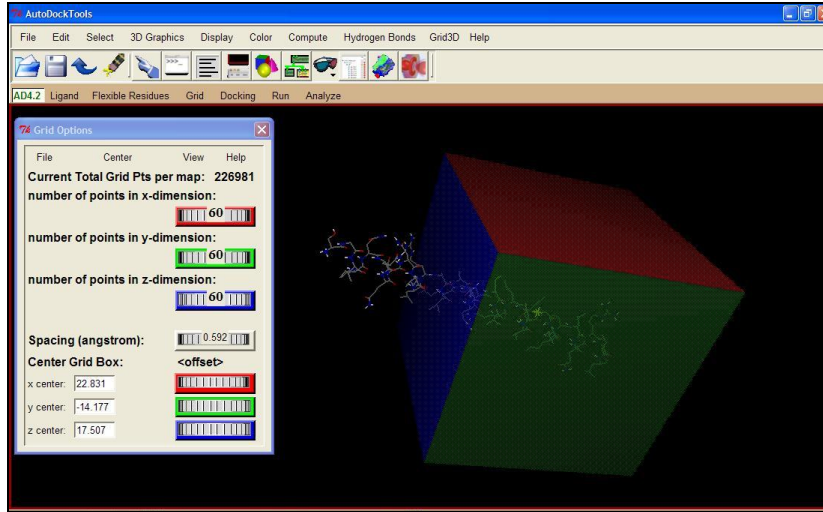
3.3.3.1 2zzo monomer NHR yapısının hazırlanması

HIV gp 41 yapılarından 2zzo bir N-peptid ve bir C-peptid içermektedir. Bu yapının aktif hidrofobik bölgesini açığa çıkarmak için bir C-zinciri ve yapıdaki su molekülleri UCSF Chimera programı yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.5)



Şekil 3.5 Monomer 2zzo yapısının görünümü

UCSF Chimera programında yapı *.pdb formatında kaydedilir, ardından Autodock tools açılarak yapıya polar hidrojenler eklenir bunun yanında yapıda yer alan aminoasitlerin yükleri kontrol edilir ve makromolekül *.pdbqt formatında kaydedilir. Gp 41'in hidrofobik bölgesi hedef bölge olduğundan kenetlenme grid bölgesinin gp 41'in aktif hidrofobik cebinde yer alan Leu 55 ile Leu 71 aminoasitleri arasında yer alan bölgeyi kısmen kapsayacak yeterlilikte olması gereklidir. Kenetlenme bölgesini tanımlamak için hedef makromolekül üzerinde grid kutusu oluşturulmuş ve bu kutudaki noktaların sayısı x,y ve z kartezyen koordinatlarında 60x60x60 Å³ olarak, bu noktaların arasında kalan arama boşluğu adındaki kısımda 0.592 Å olarak ve merkez grid kutusu x koordinatları için 22.831, y koordinatları için -14.177 ve z koordinatları için 17.507 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6 ve Ek 2).



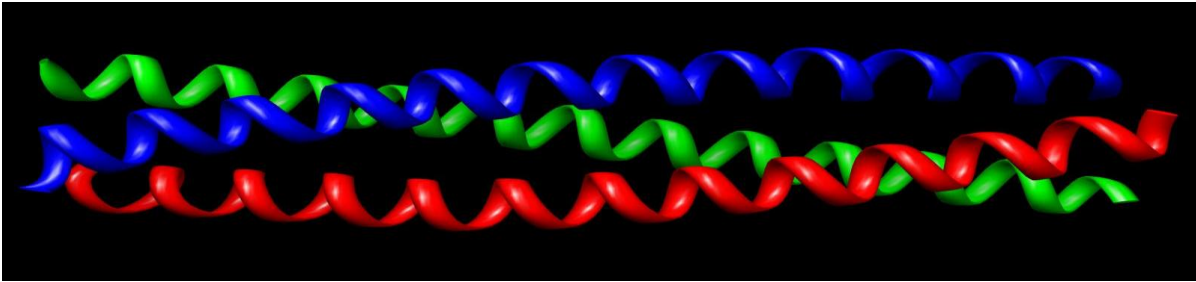
Şekil 3.6 2zzo monomer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği

Ligand ve makromolekül yapısı *.pdbqt formatında hazırlandıktan sonra Autodock Vina programının moleküler kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli olan konfigürasyon dosyasında makromolekül, ligand, ligand sonuç konformasyonları, grid kutusundaki nokta sayısı(x,y ve z koordinatlarında) ve merkez grid kutusu (x,y ve z koordinatlarında) tanımlanmalıdır (Ek 3).

Moleküler kenetlenme işlemi için gerekli dosyalar hazırlandıktan sonra cygwin programı ile Autodock vina kenetlenme işlemi başlatılır. Autodock Vina kenetlenme işlemi için 2zzo makromolekülü esnemez kabul edilmiştir.

3.3.3.2 2q7c trimer NHR yapısının hazırlanması

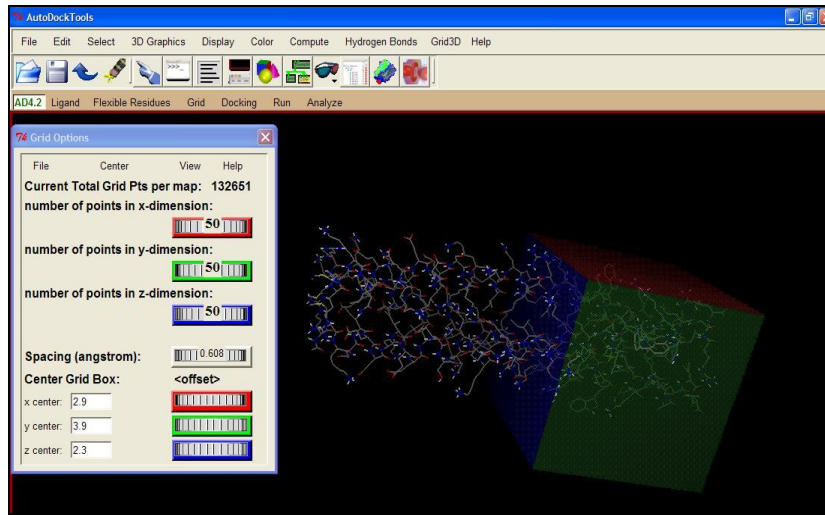
HIV gp 41 yapılarından 2q7c üç N-peptid içermektedir. Bu yapıdan su molekülleri UCSF Chimera programı yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.7)



Şekil 3.7 Trimer 2q7c yapısının görünümü

UCSF Chimera programında yapı *.pdb formatında kaydedilir, ardından Autodock tools açılarak yapıya polar hidrojenler eklenir bunun yanında yapıda yer alan aminoasitlerin yükleri kontrol edilir ve makromolekül *.pdbqt formatında kaydedilir.

Gp 41'in hidrofobik bölgesi hedef bölge olduğundan kenetlenme grid bölgesinin gp 41'in aktif hidrofobik cebinde yer alan Leu 29 ile Leu 45 aminoasitleri arasında yer alan bölgeyi kısmen kapsayacak yeterlilikte olması gereklidir. Kenetlenme bölgesini tanımlamak için hedef makromolekül üzerinde grid kutusu oluşturulmuş ve bu kutudaki noktaların sayısı x,y ve z kartezyen koordinatlarında $50 \times 50 \times 50 \text{ \AA}^3$ olarak, bu noktaların arasında kalan arama boşluğu adındaki kısımda $0.608 \text{ \AA}$ olarak ve merkez grid kutusu x koordinatları için 2.9, y koordinatları için 3.9 ve z koordinatları için 2.3 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8 ve Ek 4).



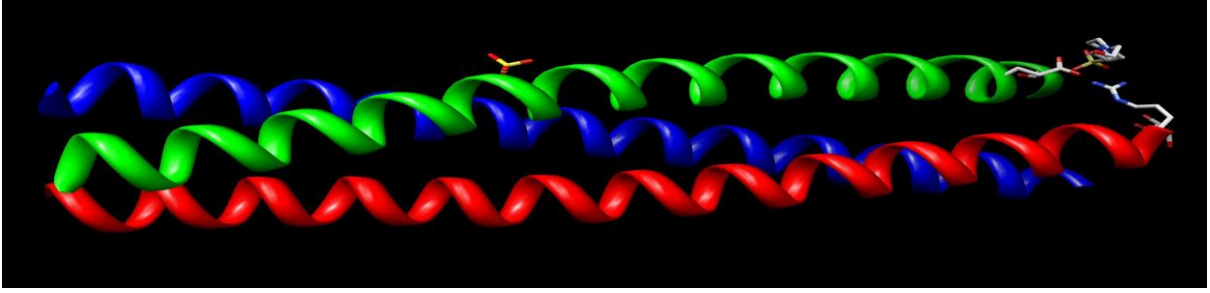
Şekil 3.8 2q7c trimer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği

Ligand ve makromolekül yapısı *.pdbqt formatında hazırlandıktan sonra Autodock Vina programının moleküler kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli olan dosyada makromolekül, ligand, ligand sonuç konformasyonları, grid kutusunda nokta sayısı (x, y ve z koordinatlarında) ve merkez grid kutusu (x, y ve z koordinatlarında) tanımlanmalıdır (Ek 5).

Moleküler kenetlenme işlemi için gerekli dosyalar hazırlandıktan sonra cygwin programı ile Autodock vina kenetlenme işlemi gerçekleştirilir. Autodock Vina kenetlenme işlemi için 2q7c makromolekülü esnemez kabul edilmiştir.

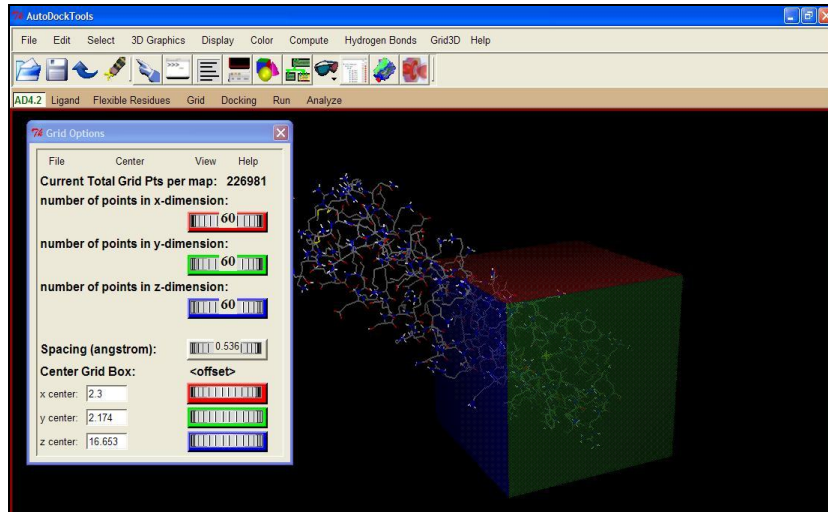
3.3.3.3 2r5d trimer NHR yapısının hazırlanması

HIV gp 41 yapılarından 2r5d üç N-peptid ve üç mutant peptid içermektedir. Bu yapının aktif hidrofobik bölgesini açığa çıkarmak için üç mutant peptid ve yapıdaki su molekülleri UCSF Chimera programı yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.9)



Şekil 3.9 Trimer 2r5d yapısının görünümü

UCSF Chimera programında yapı *.pdb formatında kaydedilir, ardından Autodock tools açılarak yapıya polar hidrojenler eklenir bunun yanında yapıda yer alan aminoasitlerin yükleri kontrol edilir ve makromolekül *.pdbqt formatında kaydedilir. Gp 41'in hidrofobik bölgesi hedef bölge olduğundan kenetlenme grid bölgesinin gp 41'in aktif hidrofobik cebinde yer alan Leu 29 ile Leu 45 aminoasitleri arasında yer alan bölgeyi kısmen kapsayacak yeterlilikte olması gereklidir. Kenetlenme bölgesini tanımlamak için hedef makromolekül üzerinde grid kutusu oluşturulmuş ve bu kutudaki noktaların sayısı x,y ve z kartezyen koordinatlarında 60x60x60 Å³ olarak, bu noktaların arasında kalan arama boşluğu adındaki kısımda 0.536 Å olarak ve merkez grid kutusu x koordinatları için 2.3, y koordinatları için 2.174 ve z koordinatları için 16.653 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10 ve Ek 6).



Şekil 3.10 2r5d trimer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği

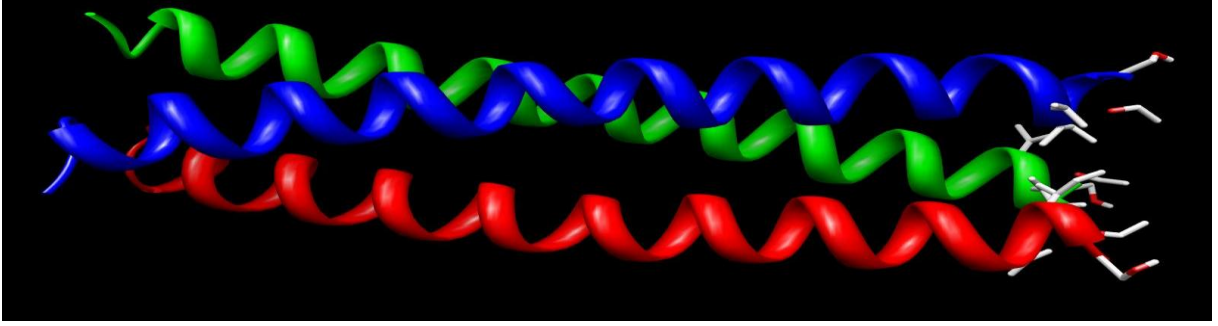
Ligand ve makromolekül yapısı *.pdbqt formatında hazırlandıktan sonra Autodock Vina programının moleküler kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli olan

dosyada makromolekül, ligand, ligand sonuç konformasyonları, grid kutusunda nokta sayısı (x,y ve z koordinatlarında) ve merkez grid kutusu (x,y ve z koordinatlarında) tanımlanmalıdır (Ek 7).

Moleküler kenetlenme işlemi için gerekli dosyalar hazırlandıktan sonra cygwin programı ile Autodock vina kenetlenme işlemi gerçekleştirilir. Autodock Vina kenetlenme işlemi için 2r5d makromolekülü esnemez kabul edilmiştir.

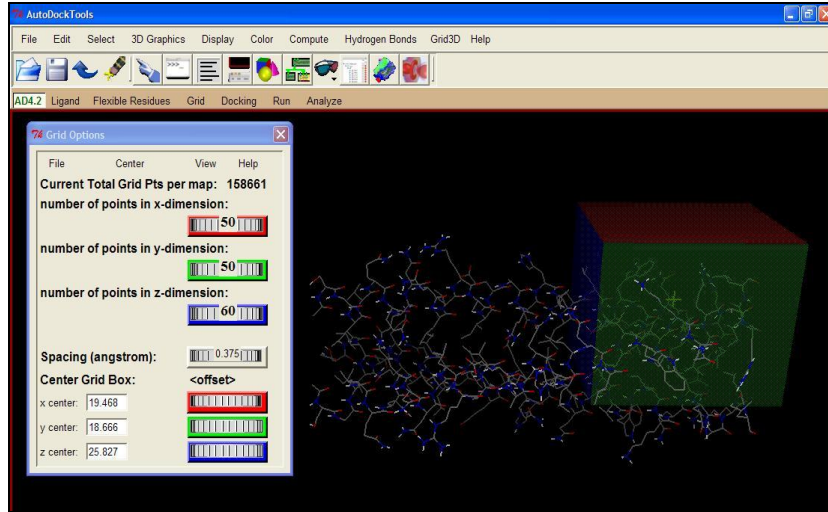
3.3.3.4 1aik trimer NHR yapısının hazırlanması

HIV gp 41 yapılarından 1aik üç N-peptid ve üç C- peptid içermektedir. Bu yapının aktif hidrofobik bölgesini açığa çıkarmak için üç C- peptid ve yapıdaki su molekülleri UCSF Chimera programı yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.11)



Şekil 3.11 Trimer 1aik yapısının görünümü

UCSF Chimera programında yapı *.pdb formatında kaydedilir, ardından Autodock tools açılarak yapıya polar hidrojenler eklenir bunun yanında yapıda yer alan aminoasitlerin yükleri kontrol edilir ve makromolekül *.pdbqt formatında kaydedilir. Gp 41'in hidrofobik bölgesi hedef bölge olduğundan kenetlenme grid bölgesinin gp 41'in aktif hidrofobik cebinde yer alan Leu 565 ile Leu 581aminoasitleri arasında yer alan bölgeyi kısmen kapsayacak yeterlilikte olması gereklidir. Kenetlenme bölgesini tanımlamak için hedef makromolekül üzerinde grid kutusu oluşturulmuş ve bu kutudaki noktaların sayısı x,y ve z kartezyen koordinatlarında 50x50x60 Å³ olarak, bu noktaların arasında kalan arama boşluğu adındaki kısımda 0.375 Å olarak ve merkez grid kutusu x koordinatları için 19.468, y koordinatları için 18.666 ve z koordinatları için 25.827 olarak belirlenmiştir(Şekil 3.12 ve Ek 8).



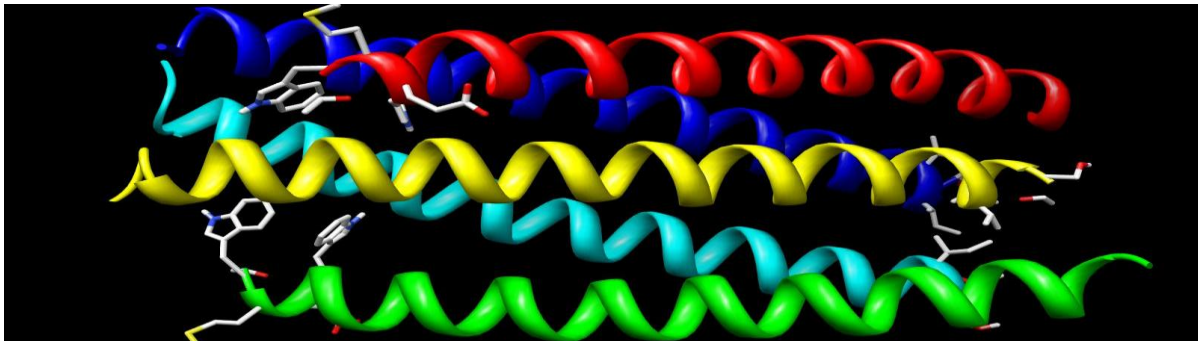
Şekil 3.12 1aik trimer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği

Ligand ve makromolekül yapısı *.pdbqt formatında hazırlandıktan sonra Autodock Vina programının moleküler kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli olan dosyada makromolekül, ligand, ligand sonuç konformasyonları, grid kutusunda nokta sayısı (x,y ve z koordinatlarında) ve merkez grid kutusu (x,y ve z koordinatlarında) tanımlanmalıdır (Ek 9).

Moleküler kenetlenme işlemi için gerekli dosyalar hazırlandıktan sonra cygwin programı ile Autodock vina kenetlenme işlemi gerçekleştirilir. Autodock Vina kenetlenme işlemi için 1aik makromoleküllü esnemez kabul edilmiştir.

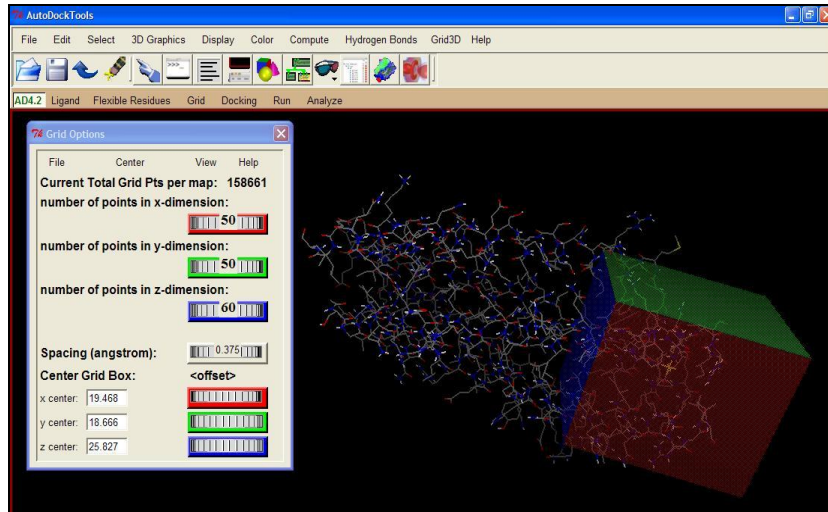
3.3.3.5 1aik pentamer NHR yapısının hazırlanması

HIV gp 41 yapılarından 1aik üç N-peptid ve üç C- peptid içermektedir. Bu yapının aktif hidrofobik bölgesini açığa çıkarmak için bir C- peptid ve yapıdaki su molekülleri UCSF Chimera programı yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.13)



Şekil 3.13 Pentamer 1aik yapısının görünümü

UCSF Chimera programında yapı *.pdb formatında kaydedilir, ardından Autodock tools açılarak yapıya polar hidrojenler eklenir bunun yanında yapıda yer alan aminoasitlerin yükleri kontrol edilir ve makromolekül *.pdbqt formatında kaydedilir. Gp 41'in hidrofobik bölgesi hedef bölge olduğundan kenetlenme grid bölgesinin gp 41'in aktif hidrofobik cebinde yer alan Leu 565 ile Leu 581 aminoasitleri arasında yer alan bölgeyi kısmen kapsayacak yeterlilikte olması gereklidir. Kenetlenme bölgesini tanımlamak için hedef makromolekül üzerinde grid kutusu oluşturulmuş ve bu kutudaki noktaların sayısı x,y ve z kartezyen koordinatlarında 50x50x60 Å³ olarak, bu noktaların arasında kalan arama boşluğu adındaki kısımda 0.375 Å olarak ve merkez grid kutusu x koordinatları için 19.468, y koordinatları için 18.666 ve z koordinatları için 25.827 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.14 ve Ek 10).



Şekil 3.14 1aik pentamer yapısı için hazırlanan grid kutusu örneği

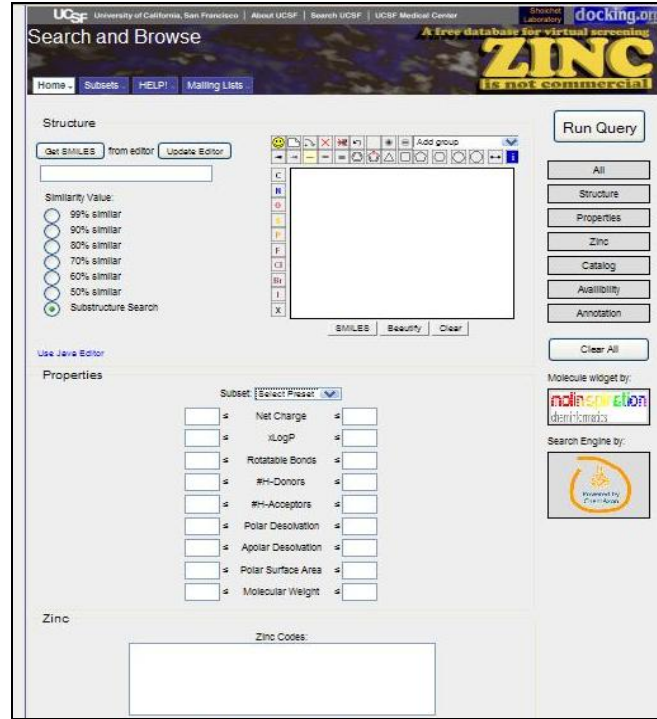
Ligand ve makromolekül yapısı *.pdbqt formatında hazırlandıktan sonra Autodock Vina programının moleküler kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli olan dosyada makromolekül, ligand, ligand sonuç konformasyonları, grid kutusunda nokta sayısı (x,y ve z koordinatlarında) ve merkez grid kutusu (x,y ve z koordinatlarında) tanımlanmalıdır (Ek 11).

Moleküler kenetlenme işlemi için gerekli dosyalar hazırlandıktan sonra cygwin programı ile Autodock vina kenetlenme işlemi gerçekleştirilir. Autodock Vina kenetlenme işlemi için 1aik makromolekülü esnemez kabul edilmiştir.

3.3.4 Görsel ligand taraması

HIV gp 41 yapılarıyla moleküler kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilen A₁₂ ligandından yola çıkılarak yeni küçük moleküllerin üç boyutlu yapıları ZINC veritabanından alınmıştır (Irwin et al., 2005). ZINC veritabanında araştırma yapılırken moleküller çeşitli altkümeler(subset) oluşturularak incelenebilir. Şekil 3.15'in subset seçeneğinden istenen kimyasal özelliklere sahip moleküller seçilebilir. Bunun yanında araştırılmak istenen moleküller için referans yapı ya da referans yapının diğer moleküllerle ortak kimyasal grupların çizilmesi seçenekler arasındadır. Çizim işlemi şekil 3.15'in sağ üst kutu kısmında gerçekleştirilir. Eğer çizilen moleküle benzer bir molekül isteniyorsa şekil 3.15'te görülen benzerlik yüzdesi (similarity value) kullanılarak yeni moleküller görüntülenebilir.

ZINC veritabanında bulunan bütün moleküller sekiz basamaklı bir rakamla kodlanır ve bu kodlarla istenen bir molekülün yapısı görüntülenebilir. Bu işlem içinde Şekil 3.15'in aşağı kısmında yer alan Zinc kodları bölümü kullanılmaktadır.



Şekil 3.15 ZINC veritabanının web sayfasında molekül arama seçenekleri

ZINC veritabanının web sayfasındaki SMILES editor üzerine pirol halkasına bağlı benzen yapısı çizilmiş ve altküme (subset) olarak ilaç-benzeri (drug-like) seçeneği seçilmiş olup yapısal benzerlik kısmına yüzde değer girilmemiştir (Şekil 3.16).

The screenshot displays the ZINC database web interface. At the top, there's a header with the ZINC logo and the text "is not commercial". Below the header, there are navigation links: Home, Subsets, HELP!, and Mailing Lists. The main section is titled "Search and Browse". On the left, there's a "Structure" section with a "Set SMILES" button and a text input field containing "Oc2ccccc1ccccc1c2". Below this, there's a "Similarity Value" section with radio buttons for 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, and 50% similar, and a "Substructure Search" option. In the center, there's a chemical structure viewer showing a benzene ring attached to a pyrrole ring. To the right of the viewer is a "Run Query" button. Below the viewer, there are buttons for "SMILES", "Beautify", and "Clear". On the right side, there's a vertical list of buttons: All, Structure, Properties, Zinc, Catalog, Availability, Annotation, and Clear All. At the bottom, there's a "Properties" section with a "Subset" dropdown menu set to "Drug Like". Below this, there's a table of properties with input fields and sliders:

Property	Value
Net Charge	
LogP	5
Rotatable Bonds	
#H-Donors	5
#H-Acceptors	10
Polar Desolvation	
Apolar Desolvation	
Polar Surface Area	150
Molecular Weight	500

Şekil 3.16 ZINC veritabanının web sayfasında A12 ligandı için molekül arama seçenekleri

Bütün bu verilere dayanarak yapılan araştırma sonucunda 210 adet pirol türevli bileşik yapısı tespit edilmiştir. Yapılardan bazıları Şekil 3.17'de yer almaktadır.

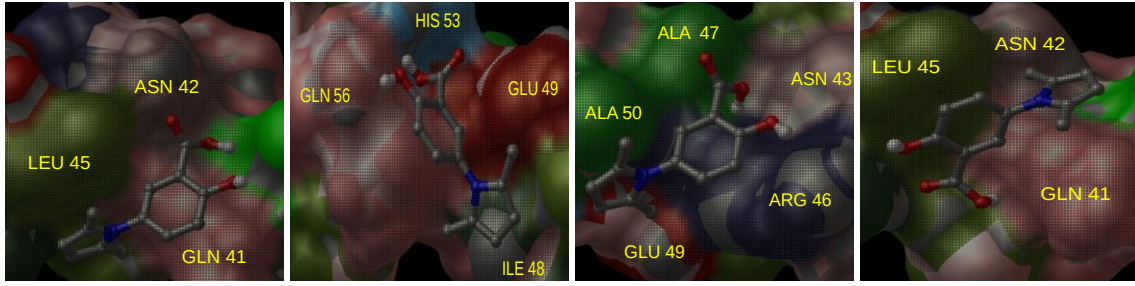
4. SONUÇLAR

4.1 HIV gp 41 NHR hedeflerinin A₁₂ ligandı ile moleküler kenetlenme sonuçları

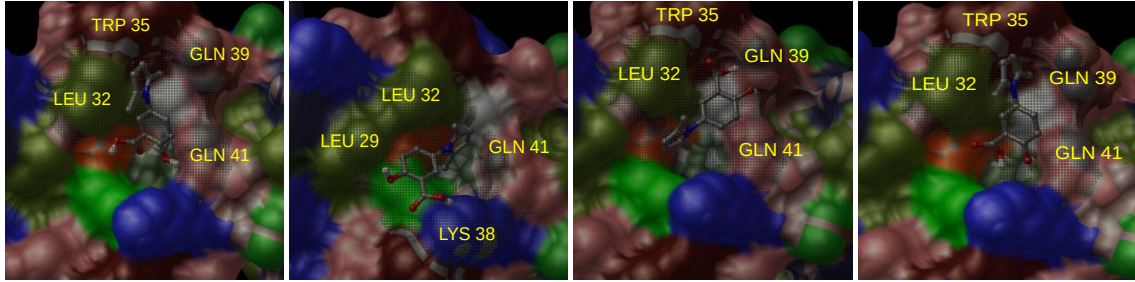
Çalışmanın bu bölümündeki hedef, protein veribankasından alınan ve gp 41'e en yakın yapılar oldukları düşünülen makromoleküllerin kristalografik üç boyutlu yapılarında inhibitör bulunmamasından dolayı öncü olarak kabul edilen bir ligandın bu makromoleküllerin aktif hidrofobik bölgeleriyle etkileşimlerini incelemektir. Bu nedenle Autodock Vina 1.0.2 programı kullanılarak gp 41 monomer, trimer ve pentamer yapılarının A₁₂ ligandı ile moleküler kenetlenme işlemi gerçekleştirilmiştir.

A₁₂ ligandının her bir proteine Autodock Vina tarafından hesaplanan bağlanma afinitesine bakılmıştır. A₁₂ 'nin her bir molekülde ayrı elde edilen dokuz adet konformasyonunun (Autodock Vina programında tanımlanmış değer) bu moleküllerde yerleştiği bölgelerle ve bu bölgelerdeki aminoasitlerle etkileşimleri incelenmiştir.

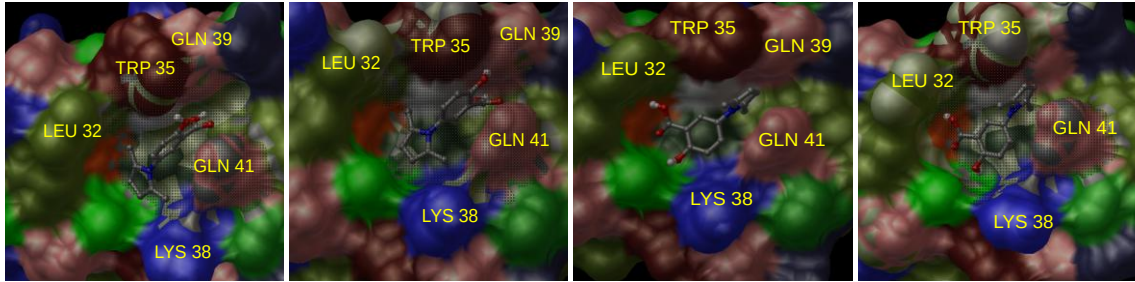
Şekil 4.1'de Autodock Vina programı kullanılarak A₁₂ ligandının 2zzo, 2q7c, 2r5d ve 1aik molekülleri ile gerçekleştirilen kenetlenme işleminde elde edilen bazı konformasyonlar görülmektedir. Bu konformasyonlar bağlanma afinitelerinin en yüksekten en düşüğe göre sıralanması sonucunda tespit edilenler arasından seçilmiş ve kenetlenme sonuçlarına göre A₁₂ ligandının her bir moleküldeki ilk dört konformasyonunun yerleşimi gösterilmiştir.



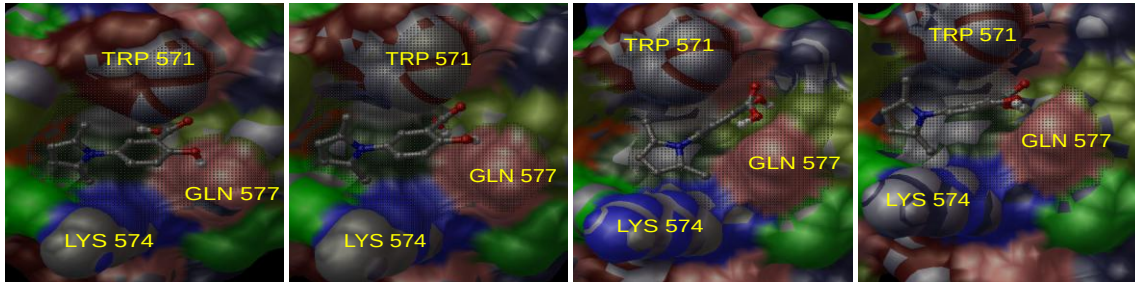
Şekil 4.1a 2z2o monomerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü



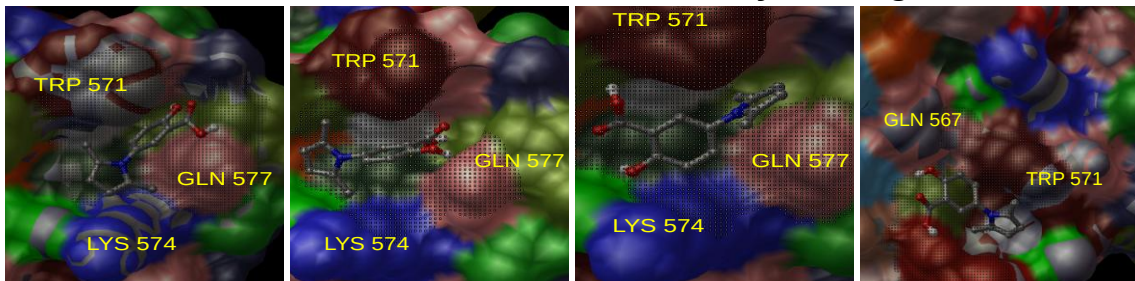
Şekil 4.1b 2q7c trimerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü



Şekil 4.1c 2r5d trimerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü

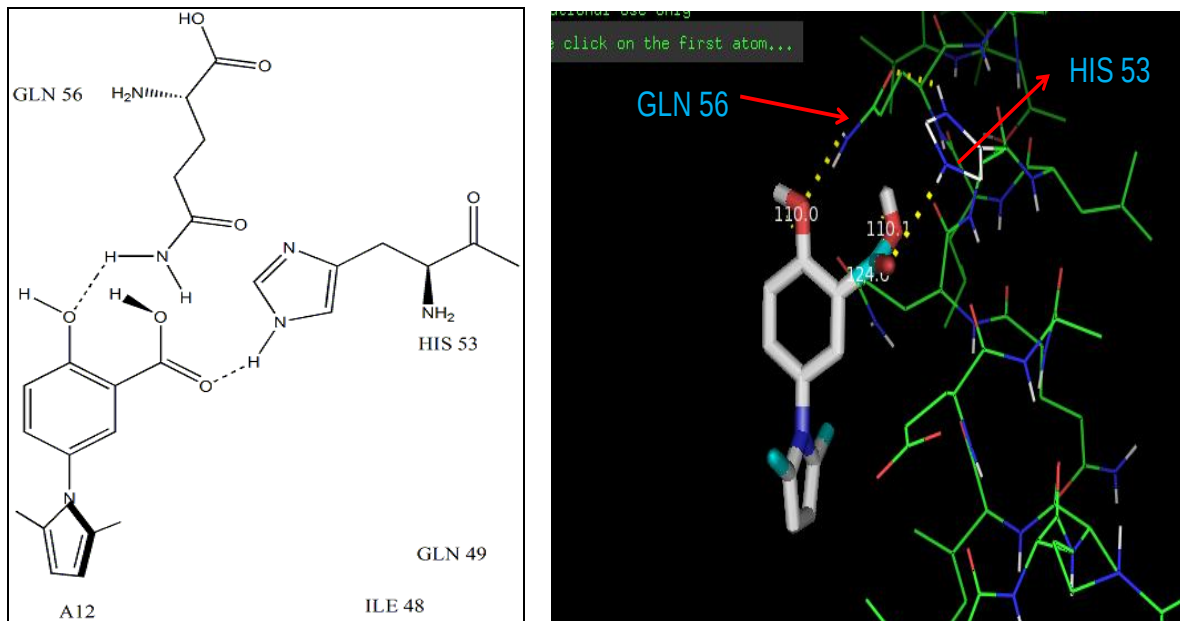


Şekil 4.1d 1aik trimerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü



Şekil 4.1e 1aik pentamerdeki kenetlenmiş konformasyonların görünümü

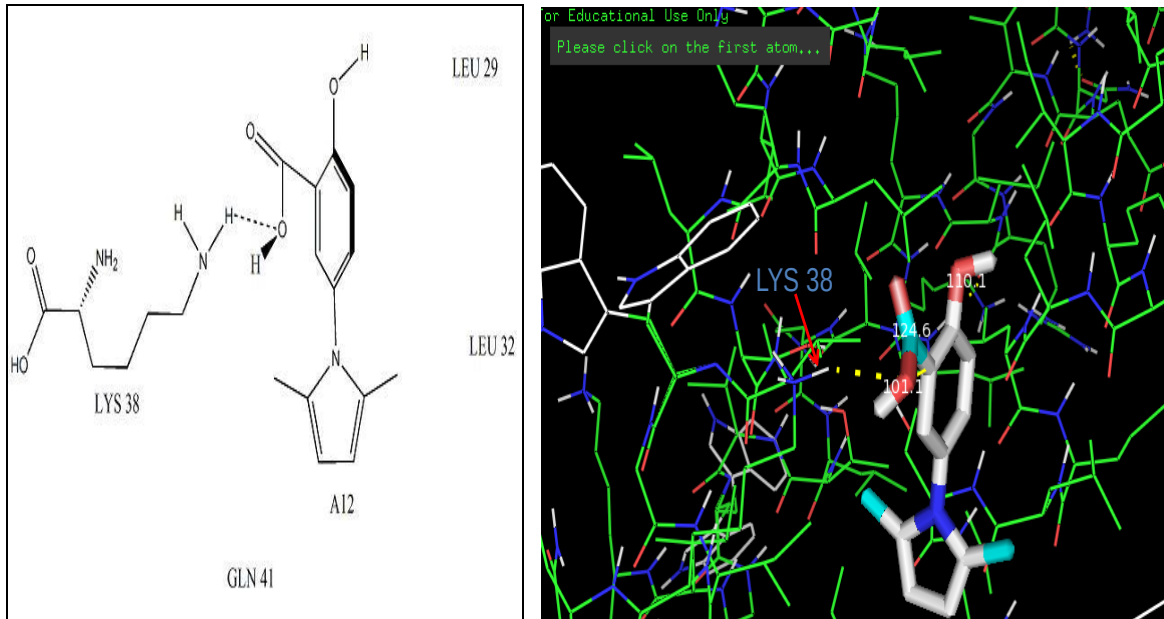
2zzo NHR monomer yapısının aktif hidrofobik bölgesi Leu 54 ile Leu 70 aminoasitleri arasında bulunmaktadır (protein veritabanı dizilimine göre). Şekil 4.1a'da A₁₂ ligandının Autodock Vina programında gerçekleştirilen kenetlenme sonucunda elde edilen dört farklı konformasyonu incelendiğinde hiçbirinin gp 41'in NHR aktif hidrofobik bölgesine (54-70 a.a) yerleşmediği görülmüştür. Dokuz adet konformasyonun gp 41'in NHR bölgesiyle teker teker etkileşimlerine bakıldığında bağlanma afiniteleri ve etkileşimler göz önüne alınarak en uygun konformasyonun ikinci konformasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu konformasyon gp 41'in aktif NHR hidrofobik bölgesinin dışında yer alan Ile 48, Gln 52, Gln 59, His 53 ve Gln 56 aminoasitleri ile çevrelenmiştir. Pymol programı ile yapılan incelemelerde A₁₂ ligandının monomer 2zzo gp 41 NHR yapısındaki His 53 ve Gln 56 ile hidrojen bağı yaptığı tespit edilmiştir. Bu etkileşimler iki boyutlu olarak şekil 4.2a'da ve üç boyutlu olarak da şekil 4.2b'de görülmektedir. A₁₂ ligandının karboksilik grubundaki oksijen ile His 53'ün amino grubu arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. Ayrıca, A₁₂ ligandının hidroksilik grubundaki oksijen ile Gln 56'nın amino grubu arasında da bir hidrojen bağının varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2(a) A₁₂ ile 2zzo NHR monomer etkileşiminin iki boyutlu görünümü (b) Etkileşimin üç boyutlu görünümü

* Hidrojen bağları iki ve üç boyutlu gösterimlerde kesikli çizgilerle belirtilmiştir.

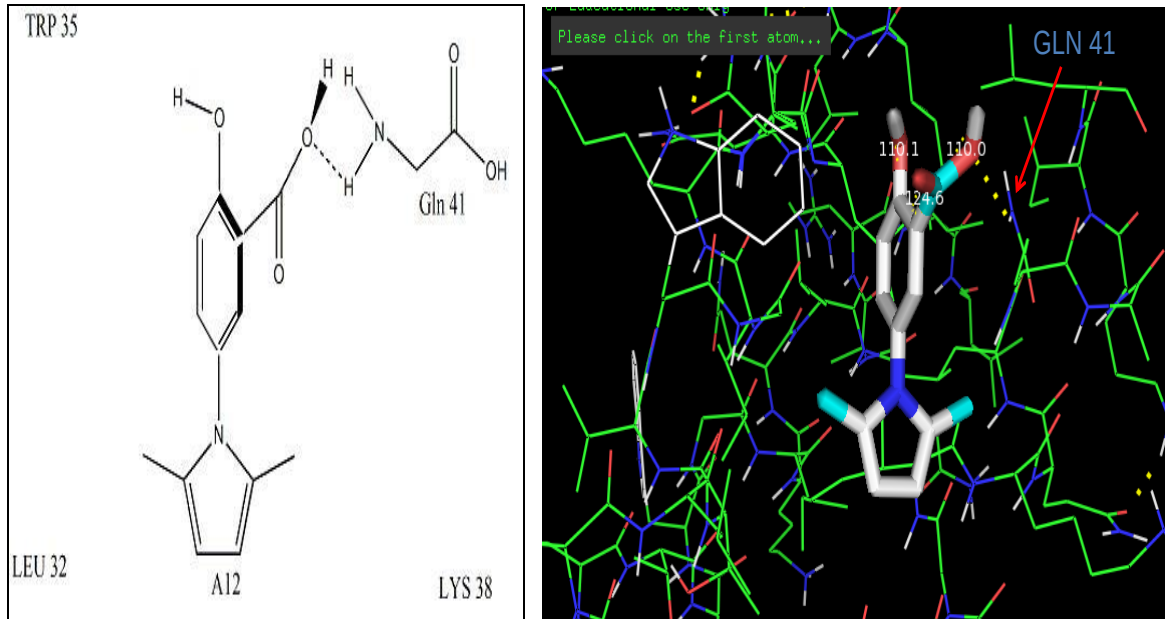
2q7c NHR trimer yapısının aktif hidrofobik bölgesi Leu 29 ile Leu 45 aminoasitleri aralığında bulunmaktadır (protein veritabanı dizilimine göre). Şekil 4.1b'de A₁₂ ligandının Autodock Vina programında gerçekleştirilen kenetlenme sonucunda elde edilen dört farklı konformasyonun inceleme neticesinde gp 41'in NHR aktif hidrofobik bölgesine yerleştikleri görülmüştür. Dokuz adet konformasyonun gp 41'in NHR bölgesiyle teker teker etkileşimlerine bakıldığında bağlanma afiniteleri ve etkileşimler göz önüne alınarak en uygun konformasyonun ikinci konformasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu konformasyon gp 41'in aktif NHR hidrofobik bölgesinde yer alan Leu 29, Leu 32, Lys 38 ve Gln 41 aminoasitleri ile çevrelenmiştir. Pymol programı ile yapılan incelemelerde A₁₂ ligandının trimer 2q7c gp 41 NHR yapısındaki Lys 38 ile hidrojen bağı yaptığı tespit edilmiştir. Bu etkileşimler iki boyutlu olarak şekil 4.3a'da ve üç boyutlu olarak da şekil 4.3b'de görülmektedir. A₁₂ ligandının karboksilik grubundaki oksijen ile Lys 38'in amino grubu arasında hidrojen bağı saptanmıştır.



Şekil 4.3(a) A₁₂ ile 2q7c NHR trimer etkileşiminin iki boyutlu görünümü (b) Etkileşimin üç boyutlu görünümü

* Hidrojen bağı iki ve üç boyutlu gösterimlerde kesikli çizgilerle belirtilmiştir.

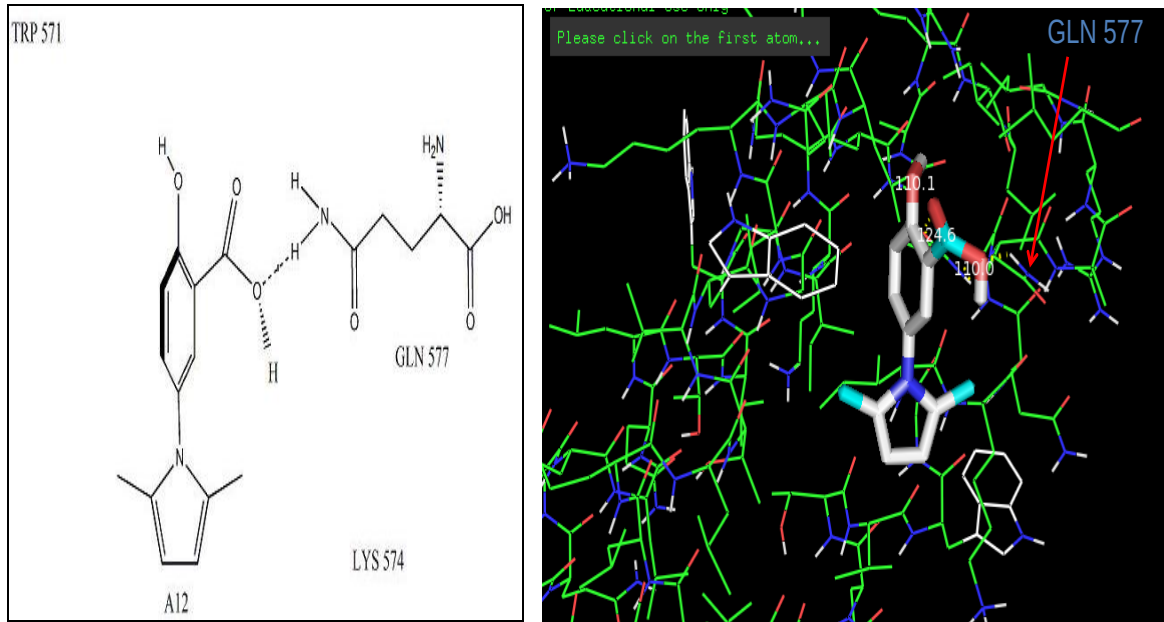
2r5d NHR trimer yapısının aktif hidrofobik bölgesi Leu 29 ile Leu 45 aminoasitleri aralığında kalmaktadır (protein veritabanı dizilimine göre). Şekil 4.1c'de A₁₂ ligandının Autodock Vina programında gerçekleştirilen kenetlenme sonucunda elde edilen dört farklı konformasyonun inceleme neticesinde gp 41'in NHR aktif hidrofobik bölgesine yerleştikleri görülmüştür. Dokuz adet konformasyonun gp 41'in NHR bölgesiyle teker teker etkileşimlerine bakıldığında bağlanma afiniteleri ve etkileşimler göz önüne alınarak en uygun konformasyonun yedinci konformasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu konformasyon gp 41'in aktif NHR hidrofobik bölgesinde yer alan Leu 32, Trp 35 ve Gln 41 aminoasitleri ile çevrelenmiştir. Pymol programı ile yapılan incelemelerde A₁₂ ligandının trimer 2r5d gp 41 NHR yapısındaki Gln 41 ile hidrojen bağı yaptığı tespit edilmiştir. Bu etkileşimler iki boyutlu olarak şekil 4.4a'da ve üç boyutlu olarak da şekil 4.4b'de görülmektedir. A₁₂ ligandının karboksilik grubundaki oksijen ile Gln 41'in amino grubu arasında hidrojen bağı saptanmıştır.



Şekil 4.4(a) A₁₂ ile 2r5d NHR trimer etkileşiminin iki boyutlu görünümü (b) Etkileşimin üç boyutlu görünümü

* Hidrojen bağı iki ve üç boyutlu gösterimlerde kesikli çizgilerle belirtilmiştir.

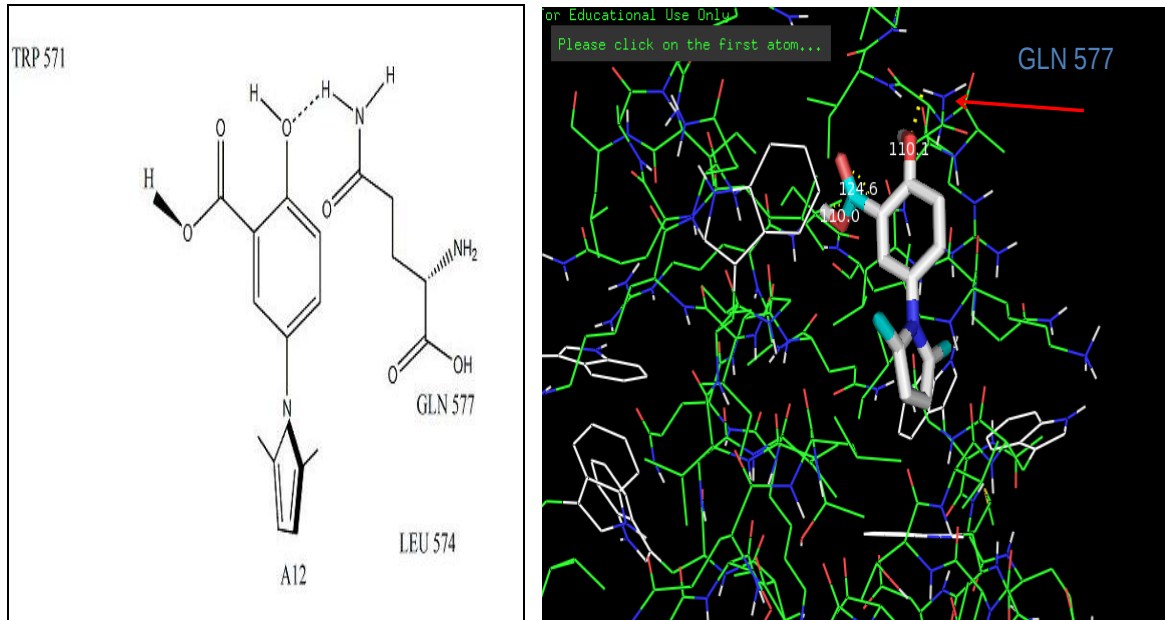
1aık NHR trimer yapısının aktif hidrofofik bölgesi Leu 565 ile Leu 581 aminoasitleri aralığında bulunmaktadır (protein veritabanı dizilimine göre). Şekil 4.1d'de A₁₂ ligandının Autodock Vina programında gerçekleştirilen kenetlenme sonucunda elde edilen dört farklı konformasyonun inceleme neticesinde gp 41'in NHR aktif hidrofofik bölgesine yerleştikleri görülmüştür. Dokuz adet konformasyonun gp 41'in NHR bölgesiyle teker teker etkileşimlerine bakıldığında bağlanma afiniteleri ve etkileşimler göz önüne alınarak en uygun konformasyonun üçüncü konformasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu konformasyon gp 41'in aktif NHR hidrofofik bölgesinde yer alan Trp 571, Lys 574 ve Gln 577 aminoasitleri ile çevrelenmiştir. Pymol programı ile yapılan incelemelerde A₁₂ ligandının trimer 1aık gp 41 NHR yapısındaki Gln 577(41) ile hidrojen bağı yaptığı tespit edilmiştir. Fakat Lys 574(38) ile A₁₂ ligandı arasında hidrojen bağına rastlanmamıştır. A₁₂ ligandının karboksilik grubundaki oksijen ile Gln 577(41)'in amino grubu arasında hidrojen bağı saptanmıştır. Bu etkileşimler iki boyutlu olarak şekil 4.5a'da ve üç boyutlu olarak da şekil 4.5b'de görülmektedir.



Şekil 4.5(a) A₁₂ ile 1aık NHR trimer etkileşiminin iki boyutlu görünümü (b) Etkileşimin üç boyutlu görünümü

* Hidrojen bağı iki ve üç boyutlu gösterimlerde kesikli çizgilerle belirtilmiştir.

1aik NHR pentamer yapısının aktif hidrofobik bölgesi Leu 565 ile Leu 581 aminoasitleri aralığında bulunmaktadır (protein veritabanı dizilimine göre). Şekil 4.1e’de A₁₂ ligandının Autodock Vina programında gerçekleştirilen kenetlenme sonucunda elde edilen dört farklı konformasyonun inceleme neticesinde gp 41’in NHR aktif hidrofobik bölgesine yerleştikleri görülmüştür. Dokuz adet konformasyonun gp 41’in NHR bölgesiyle teker teker etkileşimlerine bakıldığında bağlanma afiniteleri ve etkileşimler göz önüne alınarak en uygun konformasyonun ikinci konformasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu konformasyon gp 41’in aktif NHR hidrofobik bölgesinde yer alan Trp 571, Lys 574 ve Gln 577 aminoasitleri ile çevrelenmiştir. Pymol programı ile yapılan incelemelerde A₁₂ ligandının pentamer 1a ik gp 41 NHR yapısındaki Gln 577(41) ile hidrojen bağı yaptığı tespit edilmiştir. A₁₂ ligandının karboksilik grubundaki oksijen ile Gln 577(41)’in amino grubu arasında hidrojen bağı saptanmıştır. Bu etkileşimler iki boyutlu olarak şekil 4.6a’da ve üç boyutlu olarak da şekil 4.6b’de görülmektedir.



Şekil 4.6(a) A₁₂ ile 1a ik NHR pentamer etkileşiminin iki boyutlu görünümü (b) Etkileşimin üç boyutlu görünümü

* Hidrojen bağı iki ve üç boyutlu gösterimlerde kesikli çizgilerle belirtilmiştir.

Moleküler kenetlenme işlemleri sonucunda A₁₂ ligandının farklı gp 41 moleküllerine tahmini bağlanma afiniteleri Autodock vina programı ile hesaplanmıştır. Bağlanma afinitesi ligand molekülünün hedef yapıdaki bağlanma yeri ile etkileşmesi olarak ifade edilebilir. Tablo 4.1’de A₁₂ ligandının 2zzo, 2q7c, 2r5d ve 1aik ile kenetlenmesi sonucunda elde edilen tahmini bağlanma afiniteleri görülmektedir.

Tablo 4.1 Farklı biyolojik birimlere göre A₁₂ ligandının Autodock Vina ile hesaplanan bağlanma afiniteleri

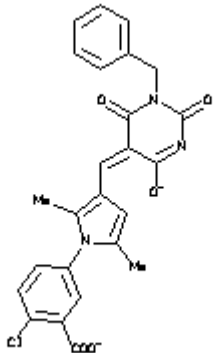
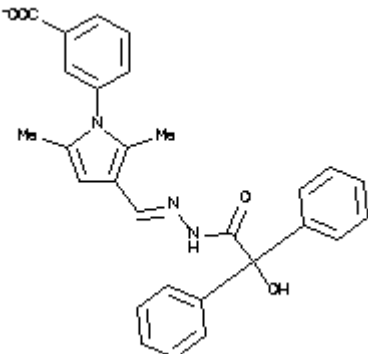
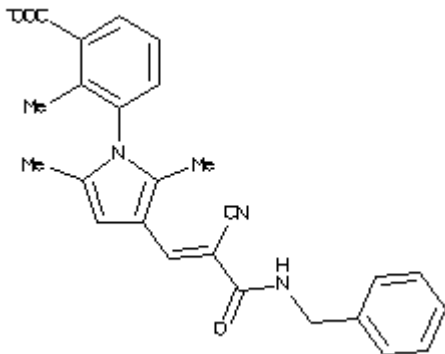
Yapı	Biyolojik Birim	Hesap. Afinite(kcal/mol)
2zzo (36 a.a)	Monomer	-4,4
2q7c (17 a.a.)	Trimer	-5,5
2r5d (17 a.a)	Trimer	-5,6
1aik (36 a.a.)	Trimer	-6,1
1aik (36 a.a)	Pentamer	-6,2

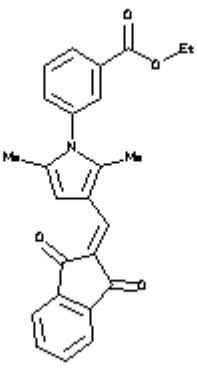
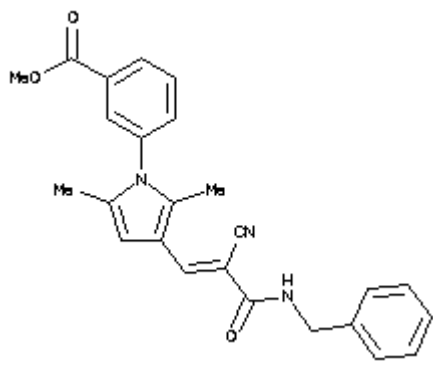
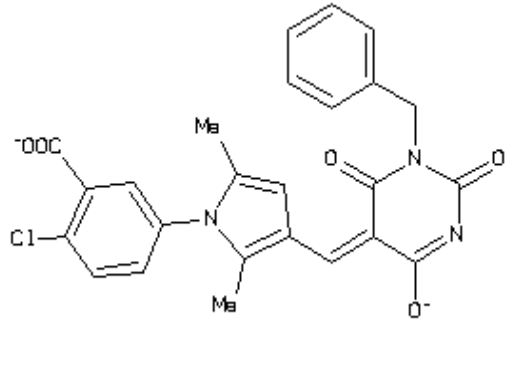
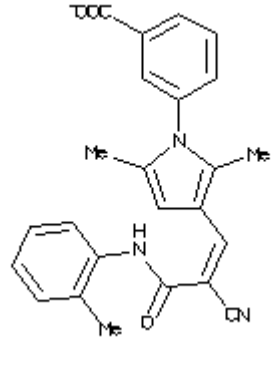
* Parantez içinde verilen değerler gp 41 orijinal NHR yapısındaki ile aynı aminoasit sayısını göstermektedir

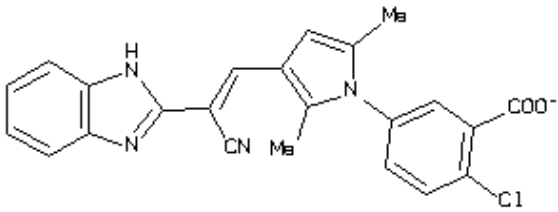
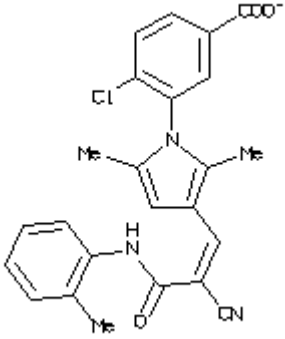
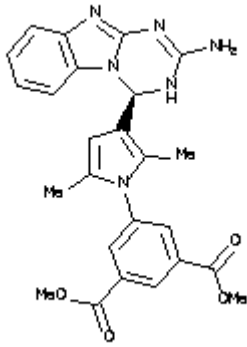
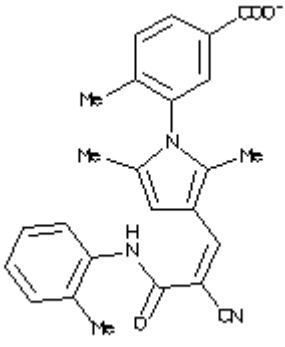
4.2 Yeni HIV Giriş İnhibitörleri için görsel ligand taraması sonuçları

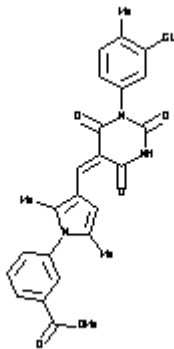
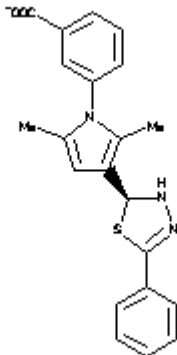
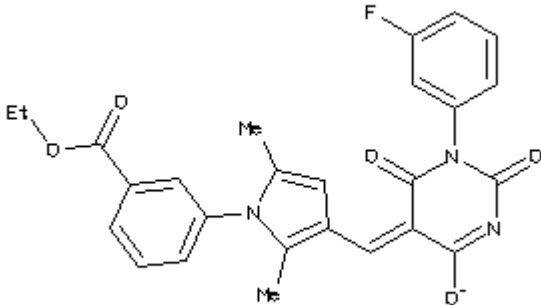
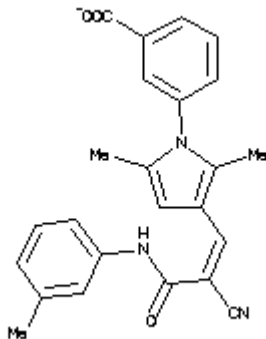
ZINC veritabanında potansiyel ligand olabilecek 210 adet bileşiğin 1aik pentamer yapısına moleküler kenetlenme işlemi Autodock Vina programı ile uygulanmıştır. Bu işlemlerin hepsi otomatik komut sistemi (şekil 3.2) ve cygwin programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin sonucunda Autodock Vina’da kenetlenme işlemi tamamlanan dimetil pirol türevleri arasından en düşük bağlanma afinitesine sahip olan 20 molekül tespit edilmiş ve Autodock Vina’da tanımlanmış konformasyon değeri olan “9” konformasyon arasından en yüksek bağlanma afinitesine sahip konformasyon tablo 4.2’de listelenmiştir.

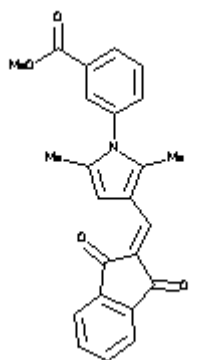
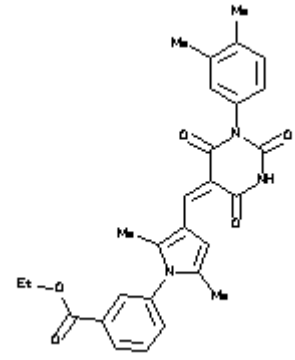
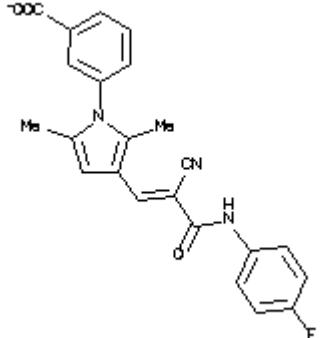
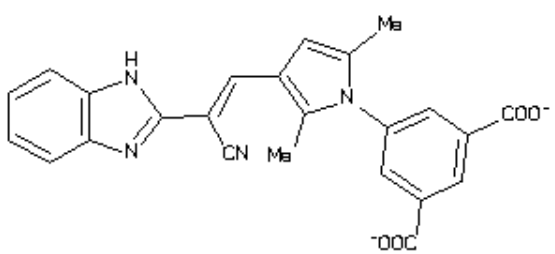
Tablo 4.2 Sanal Ligand taraması sonucu keşfedilen ligandların yapısı ve bağlanma afiniteleri

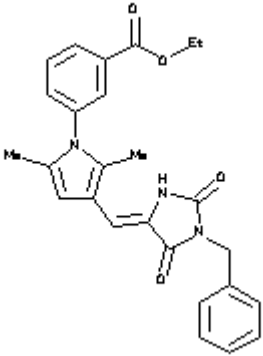
Sıra	ZINC Kodu	Bağlanma Afinitesi(kcal/mol)	Molekül Yapısı
1	ZINC20030467	-8,2	
2	ZINC02301313	-8,0	
3	ZINC02936435	-7,9	

4	ZINC00636696	-7,8	
5	ZINC01195653	-7,7	
6	ZINC33333320	-7,7	
7	ZINC04710632	-7,7	

8	ZINC04738952	-7,6	
9	ZINC08781187	-7,6	
10	ZINC12618480	-7,6	
11	ZINC15227173	-7,6	

12	ZINC01160996	-7,5	
13	ZINC06275732	-7,5	
14	ZINC13800387	-7,5	
15	ZINC05059243	-7,5	

16	ZINC00636686	-7,4	
17	ZINC00977443	-7,4	
18	ZINC01190370	-7,4	
19	ZINC04083860	-7,4	

20	ZINC04107026	-7,3	
----	--------------	------	---

5. YORUMLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmanın ilk bölümünde moleküler kenetlenme yöntemi kullanılarak potansiyel HIV inhibitörü olan A_{12} ligandının farklı HIV gp 41 monomer, trimer ve pentamer yapılarıyla etkileşimi Autodock vina programı ile araştırılmıştır. Bunun için protein veribankasından alınan HIV gp 41 NHR yapılarından **2zzo** monomer, **2q7c** trimer, **2r5d** trimer, **1aik** ise hem trimer hem de pentamer olarak kullanılmıştır. Bu sayede A_{12} ligandının monomer, trimer ve pentamer yapılara bağlanma isteği ve bu yapılarla etkileşimi incelenmiştir.

Çalışmada yer alan HIV gp 41 yapılarının daha önce birlikte ele alındığı bir araştırma bulunmadığından yapılan çalışma ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Çalışmanın ilk bölümündeki sonuçlar özetlenecek olursa;

MOLEKÜLER KENETLENME ÇALIŞMASI SONUCUNDA;

1. **2zzo** molekülünden gp 41 'in hidrofobik bölgesini (54-70 arasındaki aminoasitler) açığa çıkarmak için bir C-zincirinin uzaklaştırılması ile elde edilen monomer yapı moleküler kenetlenme çalışmasında kullanılmış ve A_{12} ligandının 2zzo aminoasitlerinden His53 ve Gln 56 ile hidrojen bağı yapmasına rağmen A_{12} 'nin incelenen konformasyonlarının hiçbirinin gp 41 molekülünün aktif hidrofobik cebine yerleşmediği tespit edilmiştir. Bununla beraber, Autodock Vina programında elde edilen ligand bağlanma afinitesinin düşük olması bu tespiti desteklediğinden monomer 2zzo yapısının moleküler kenetlenme için yetersiz bir yapı olduğu ve ligand için hedef yapı olarak sunulamayacağı ortaya konmuştur.
2. **2q7c** molekülünde gp 41 'in hidrofobik bölgesi (29-45 arasındaki aminoasitler) aktif bölge olarak tanımlanmış ve bu trimer yapının moleküler kenetlenme çalışmasında kullanılması sonucunda A_{12} ligandının 2q7c aminoasitlerinden Lys 38 ile hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Ayrıca A_{12} ligandının farklı konformasyonları incelendiğinde gp 41'in aktif hidrofobik bölgesine yerleşimin gerçekleştiği söylenebilir. Bununla birlikte, Autodock Vina programında elde

edilen ligand bağlanma afinitesinin monomer yapıya göre daha yüksek olması bu tespiti desteklediğinden trimer 2q7c yapısının moleküler kenetlenme için kullanılabilir bir yapı olduğu ve ligand için hedef yapı olarak sunulabileceği ortaya konmuştur.

3. **2r5d** molekülünden gp 41 'in hidrofobik bölgesini (29-45 arasındaki aminoasitler) açığa çıkarmak için üç mutant zincirin uzaklaştırılması ile elde edilen trimer yapı moleküler kenetlenme çalışmasında kullanılmış ve A_{12} ligandının 2r5d aminoasitlerinden Gln 41 ile hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Ayrıca A_{12} ligandının farklı konformasyonları incelendiğinde gp 41'in aktif hidrofobik bölgesine yerleşimin gerçekleştiği söylenebilir. Bununla birlikte, Autodock Vina programında elde edilen ligand bağlanma afinitesinin monomer yapıya göre ve trimer 2q7c'ye göre daha yüksek olması bu tespiti desteklediğinden trimer 2r5d yapısının moleküler kenetlenme için kullanılabilir bir yapı olduğu ve ligand için hedef yapı olarak sunulabileceği ortaya konmuştur. 2r5d ve 2q7c NHR yapılarının neredeyse aynı dizilimde olmalarına rağmen A_{12} ligandıyla farklı aminoasitlerinin etkileşmesi ligandın fonksiyonel gruplarının iki hedef yapıda farklı yönelimiyle açıklanabilir.
4. **1aik** molekülünden gp 41 'in hidrofobik bölgesini (565-581) arasındaki aminoasitler) açığa çıkarmak için üç C-peptid zincirin uzaklaştırılması ile elde edilen trimer yapı moleküler kenetlenme çalışmasında kullanılmış ve A_{12} ligandının 1aik aminoasitlerinden Gln 577(41) ile hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Ayrıca A_{12} ligandının farklı konformasyonları incelendiğinde gp 577'nin aktif hidrofobik bölgesine yerleşimin gerçekleştiği söylenebilir. Bununla birlikte, Autodock Vina programında elde edilen ligand bağlanma afinitesinin monomer yapıya göre ve diğer trimer yapılara göre daha yüksek olması bu tespiti desteklediğinden trimer 1aik yapısının moleküler kenetlenme için kullanılabilir bir yapı olduğu ve ligand için hedef yapı olarak sunulabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca bağlanma afinitesinin düşüklüğüne bakılarak, orijinal gp 41 yapısına en yakın gp 41 molekülünün 1aik olduğu söylenebilir.
5. **1aik** molekülünden gp 41 'in hidrofobik bölgesini (565-581) arasındaki aminoasitler) açığa çıkarmak için bir C-peptid zincirin uzaklaştırılması ile elde

edilen pentamer yapı moleküler kenetlenme çalışmasında kullanılmış ve A₁₂ ligandının 1aik aminoasitlerinden Gln 577(41) ile hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Fakat trimer 1aik yapısından farklı olarak pentamer yapıda A₁₂ ligandının Gln 577(41) ile hidrojen bağı yapan grubun hidroksil grubu olduğu görülmüştür. Bu ligandın fonksiyonel gruplarının iki hedef yapıda farklı yönelimiyle açıklanabilir. Ayrıca A₁₂ ligandının farklı konformasyonları incelendiğinde gp 577'nin aktif hidrofobik bölgesine yerleşimin gerçekleştiği söylenebilir. Bununla birlikte, Autodock Vina programında elde edilen ligand bağlanma afinitesinin diğer tüm yapılara göre daha yüksek olması bu tespiti desteklediğinden pentamer 1aik yapısının moleküler kenetlenme için kullanılabilir bir yapı olduğu ve ligand için hedef yapı olarak sunulabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca burada elde edilen bağlanma afinitesinin diğerlerine göre düşüklüğüne bakılarak, ligandın pentamer yapıda diğer yapılara göre daha az alanda hareket ettiği ve dolayısıyla aktif hidrofobik bölgeyle etkileşiminin gerçekleşme ihtimalinin diğer yapılara göre daha fazla olduğu söylenebilir.

Son olarak, gp 41'in monomer NHR yapısının A₁₂ ligandıyla hidrojen bağlarının varlığına rağmen moleküler kenetlenme için uygun hedef yapı olmadığı söylenebilir. Hiçbir ligand konformasyonu gp 41 NHR monomer yapının hidrofobik bölgesine yerleşememiştir. Sadece Gln 56 ve His 53 ile gerçekleştirilen hidrojen bağlarının yeni küçük molekül tasarımında kullanılabileceği düşünülebilir.

Wang ve arkadaşlarının keşfine göre A₁₂ ligandı Lys 574(38) ve Gln 577(41) ile hidrojen bağı etkileşimi göstermiştir. A₁₂ ligandı gp 41'in Leu 29, Leu 32, Thr 33, Val 34 ve Ile 37'den oluşan hidrofobik cep bölgesine yerleşim göstermiştir. Burada yapılan çalışmada sadece Gln 577 ile hidrojen bağının görülmesi ve ligandın farklı hidrofobik ceplere yerleşmesi kullanılan programların, kenetlenme için seçilen grid boyutlarının, makromoleküllerin ve bu makromoleküller ile ligandın kenetlenme süreçlerine hazırlıklarının farklı olmasıyla açıklanabilir. Ayrıca sonuçlar incelendiğinde göze çarpan bir bulguda Wang ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak hidrofobik cebi oluşturan aminoasitlerden Trp 571(35)'in ligandın yerleştiği

hidrofobik cepte bulunmasıdır. Bu aminoasit yeni moleküllerin keşfinde önem arz edebilir.

Autodock Vina programıyla elde edilen bağlanma afiniteleri, A₁₂ ligandının gp 41 NHR hidrofobik bölgelerine yerleşimi ve bu bölgelerde yer alan aminoasitlerle etkileşimleri göz önünde bulunularak en uygun HIV gp 41 yapısının 1aik pentamer olduğu görülmüştür. Çalışmanın ikinci bölümünde ZINC veritabanından seçilen pirol türevli bileşiklerin 1aik pentamer yapısına kenetlenmesi yeni HIV giriş inhibitörü araştırmalarına kolaylık sağlayacaktır. Bu bölümdeki sonuçlar özetlenecek olursa;

GÖRSEL LİGAND TARAMASI SONUCUNDA;

1. 210 adet pirol türevli bileşiğin 1aik pentamer yapısına Autodock Vina programında yapılan görsel ligand taraması sonucunda hesaplanan bağlanma afiniteleri A12 ligandının 1aik pentamer yapısına gösterdiği bağlanma afinitesine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.
2. Hesaplama sonuçlarımız, HIV gp 41 molekülü kullanılarak yeni küçük moleküllerin tasarlanması konusunda araştırma yapacak kişilerin hedef molekül ve başlangıç ligandı seçiminde harcayacağı zamanın azaltılmasına yardımcı olabilecektir.

Sonuç olarak, yapılan çalışmanın ileride HIV gp 41 hedefli yeni küçük molekül inhibitörlerin geliştirilmesine katkı sağlaması umut edilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Bilimsel periyodikler:

- Davis, AM., Teague, SJ., Kleywegt, GJ., 2003, Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure –based ligand and drug design, *Angew Chem Int Ed Engl* 42: 2718-36
- Debnath, A.,K., Radigan,L., Jiang, S.,1999, Structure-Based Identification of Small Molecule Antiviral Compounds Targeted to the gp 41 Core Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1, *J.Med. Chem.*, 42(17) 3203-3209
- Fung, H., B. and Guo, Y., 2004, Enfuvirtide: A Fusion Inhibitor for the treatment of HIV Infection, *Clinical Therapeutics*, Vol.26, No.3, 352-378
- Heesen, H.T., Schlitter, A.M., Schlitter, J., 200, Empirical rules facilitate the search for binding sites on protein surfaces, *Jour. of Mol. Graph. and Mod.*, 25, 671-679
- Huang, S. L., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y. T., Zhang, J., Huang, P. L., 2007, Discovery of small molecule HIV-1 fusion and hydroxytyrosol: Part1. Integrase Inhibition, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 872-878
- Jiang, S., Lu, H., Liu, S., Zhao, Q., He, Y., Debnath, A.K., 2004, N- Substituted Pyrrole Derivatives as Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors That Interfere with the gp 41 Six-Helix Bundle Formation and Block Virus Fusion, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Vol.48 No.11, p. 4349-4359
- Jiang, S., Zhao, Q., Debnath, A.K., 2002, Peptide and Non-peptide HIV Fusion Inhibitors, *Current Pharmaceutical Design*, 8, 563-580
- Irwin., J.J., and Shoichet, B.K., 2005, ZINC –a Free database commercially available compounds for virtual screening, *Jour. of Chem. Inf. Model.*, 45, 177-182
- Liu, K., Lu, H., Hou, L., Qi, Z., Teixeira, C., Barbault, F., Fun, B.T., Liu, S., Jiang, S., Xie, L., 2008, Design, Synthesis and Biological Evaluation of N-Carboxy-Phenylpyrrole Derivatives as Potent HIV Fusion Inhibitors Targeting gp41, *J.Med. Chem.*, 51, 7843-7854
- Liu, S., Lu, H., Niu, J., Xu, Y., Wu, S., Jiang, S., 2005, Different from the HIV Fusion Inhibitor C34, the anti-HIV Drug Fuzeon (T-20) Inhibits HIV-1 Entry by Targeting Multiple Sites in gp 41 and gp 120, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No.12, pp11259-11273

- Manfredi, R., and Sabbatini, S., 2006, A Novel Antiretroviral Class (Fusion Inhibitors) in the Management of HIV Infection. Present Features and Future Perspectives, *Current Medicinal Chemistry*, 13, 2369-2384
- Melby, T., Demasi, R., Cammack, N., Miralles, G.D., Greenberg M.L., 2007, Evolution of Genotypic and Phenotypic Resistance during Chronic Treatment with the Fusion Inhibitor T-1249, *AIDS Res. Hum.*, 23: 1366-73
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.B., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comp. Chem.*, 19, 1639-1662
- Pan, C., Liu, S., Jiang, S., 2010, HIV-1 gp 41 Fusion Intermediate: A Target for HIV Therapeutics, *J. Formos. Med. Assoc.*, Vol 109, No2, 94-105
- Qadir, M. I. and Malik S.A., 2010, HIV Fusion Inhibitors, *Rev. Med. Virol*, 20:23-33
- Teixeira, C., Barbault, F., Rebehmed, J., Liu, K., Xie, L., Lu, H., Jiang, S., Fan, B.T., Maurel, F., 2008, Molecular Modelling studies of N-substituted pyrrole derivatives-potential HIV-1 gp 41 inhibitors, *Bioorg. & Med. Chem.* 16, 3039-3048
- Trott, O. and Olson, A.J., 2010, Software News and Update Autodock Vina Improving the speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient, Optimization and Multithreading, *J. Comput. Chem.*, 31: 455-461
- Wang, Y., Lu, H., Zhu, Q., Jiang, S., Liao, Y., 2010, Structure based-design, synthesis and biological evaluation of new N-carboxyphenylpyrrole derivatives as HIV fusion inhibitors targeting gp 41, *Bioorg. & Med. Chem.*, 20, 189-192
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J., Wiley, D.C., Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp 41, *Nature*, vol:387, 1997
- Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B., Matthews, T.J., 1994, Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp 41 are potent inhibitors of virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9770-4

Kitaplar:

- Harvey, A. R., Champe, P.A., Fisher, B.D., 2006 Lippincott's Illustrated Microbiology, (çev: Prof. Dr. Özlem Anđ), Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 516p
- Patrick, G.L., 2009, An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press, Oxford, 752p

Ryan, K.J. and Ray, C.G., 2004, Sherris Medical Microbiology, McGraw-Hill Companies, USA, 979p

Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., 2005, Asya Mikrobiyoloji, Asya Tıp Kitabevi, İzmir, 649p

White, D.O., Fenner, F.J., 2000, Medical Virology, (çev: Prof. Dr. Mehmet Ziya Doymaz), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 606p

Internet:

Autodock, 2011, Autodock online, <http://autodock.scripps.edu>

Autodock Vina, 2011, Autodock vina online, <http://vina.scripps.edu>

Chemoffice, 2011, CambridgeSoft Desktop Software-Chem Office online, <http://www.cambridgesoft.com/software/chemoffice>

Chimera, 2011, UCSF Chimera online, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

Cygwin, 2011, Cygwin online, <http://www.cygwin.com/>

Docking(molecular), 2010, Wikipedia Docking(molecular) online, http://en.wikipedia.org/wiki/Docking_molecular

DNA, 2011, Wikipedia online, <http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA>

Dock, 2011, UCSF Dock online, <http://dock.compbio.ucsf.edu/>

Enfuvirtide, 2010, AIDS Info-HIV/AIDS Drug Information online, http://www.aids.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailNT.aspx?int_id=306

Enfuvirtide, 2010, Wikipedia online, <http://en.wikipedia.org/wiki/Enfuvirtide>

FlexX, 2011, BiosolveIT GmbH-evaluation license online, <http://www.biosolveit.de/licence/evaluation.html?product=flexx>

Gp 120, 2010, Wikipedia online, http://en.wikipedia.org/wiki/Envelope_glycoprotein_gp_120

Gaussian, 2011, Gaussian online, <http://www.gaussian.com/>

GOLD, 2011, GOLD online, http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold

Pdbsum, 2010, Pdbsum online, <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>

Protein Data Bank,2010,Wikipedia online,
http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_Data_Bank

Pymol,2011,Pymol online, <http://www.pymol.org/>

Raccoon,2011,Autodock Raccoon online,
<http://autodock.scripps.edu/resources/raccoon>

RNA,2011,Wikipedia online, <http://tr.wikipedia.org/wiki/RNA>

RSCB Protein data bank,2011,RSCB online,
<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

Sifuvirtide, 2011, Fusogen online, <http://www.fusogen.com/en/indexen.asp.html>

Symptoms of acute HIV infection, 2009, Wkipedia online,
http://www.en.wikipedia.org/File:Symptoms_of_acute_HIV_infection.png

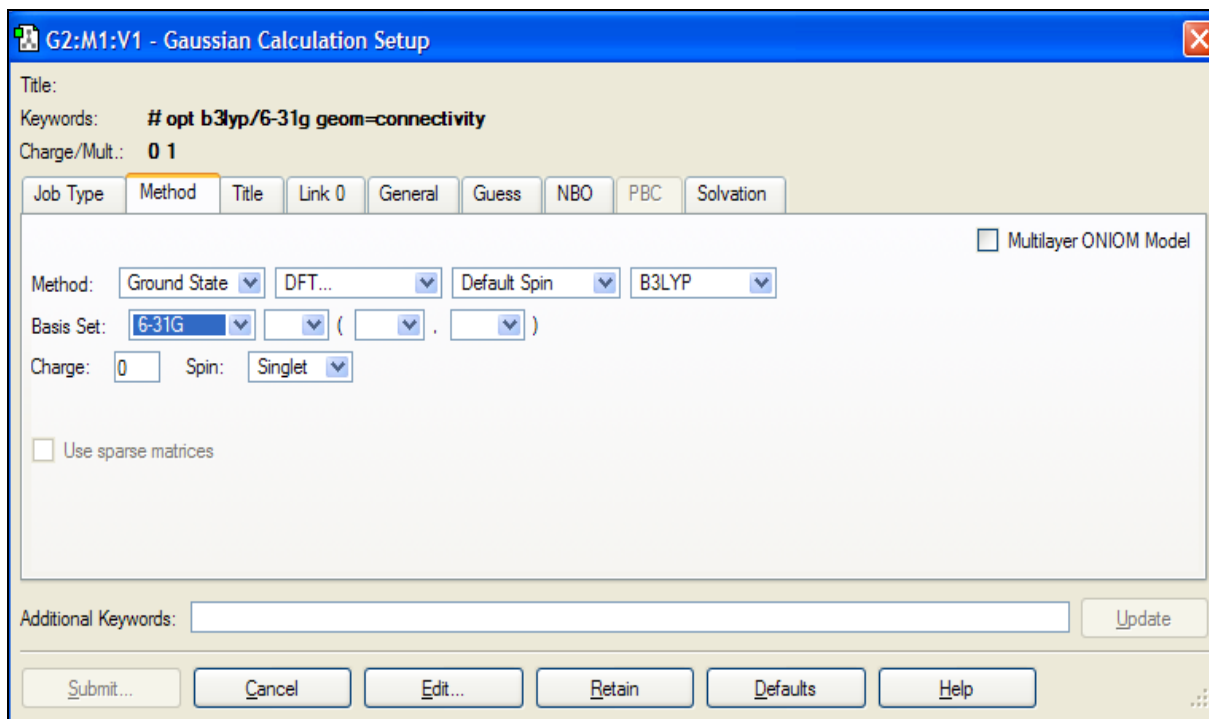
T.C Sağlık Bakanlığı HIV/AIDS veri tabloları, 2008,
http://www.erdemlidh.gov.tr/dosyalar/hiv_aids_veri_tabloları.pdf

Viral infections and involved species,2009,Wikipedia online,
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Viral_infections_and_involved_species.png

EKLER DİZİNİ

EK 1

Gaussian 03 programında ligand optimizasyonu için kullanılan parametreler.



The screenshot shows the 'G2:M1:V1 - Gaussian Calculation Setup' dialog box. The 'Method' tab is selected. The 'Title' field is empty. The 'Keywords' field contains '# opt b3lyp/6-31g geom=connectivity'. The 'Charge/Mult.' field is set to '0 1'. The 'Method' dropdown is set to 'Ground State', 'DFT...' is set to 'DFT...', 'Default Spin' is set to 'Singlet', and 'B3LYP' is selected. The 'Basis Set' dropdown is set to '6-31G'. The 'Charge' field is set to '0' and the 'Spin' dropdown is set to 'Singlet'. The 'Multilayer ONIOM Model' checkbox is unchecked. The 'Use sparse matrices' checkbox is unchecked. The 'Additional Keywords' field is empty. The 'Update' button is visible. At the bottom, there are buttons for 'Submit...', 'Cancel', 'Edit...', 'Retain', 'Defaults', and 'Help'.

Title:

Keywords: **# opt b3lyp/6-31g geom=connectivity**

Charge/Mult.: **0 1**

Job Type Method Title Link 0 General Guess NBO PBC Solvation

Method: Ground State DFT... Default Spin B3LYP

Basis Set: 6-31G ()

Charge: 0 Spin: Singlet

☐ Multilayer ONIOM Model

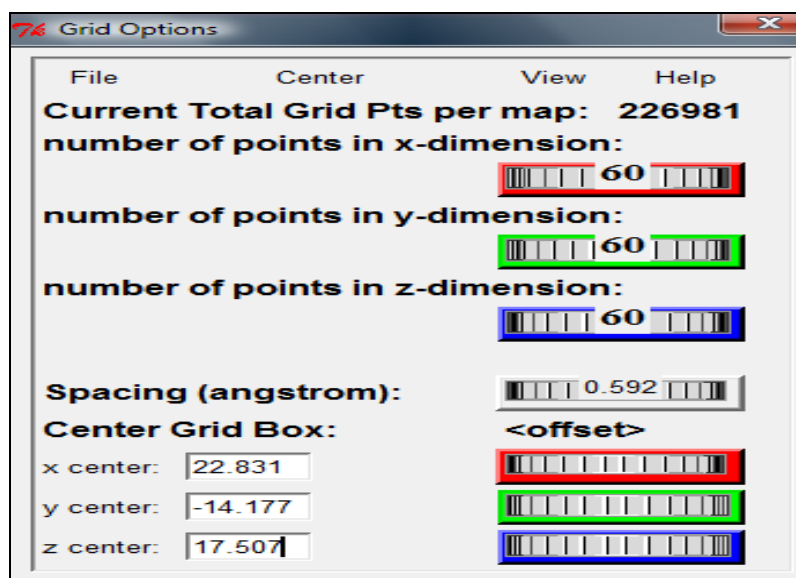
☐ Use sparse matrices

Additional Keywords: Update

Submit... Cancel Edit... Retain Defaults Help

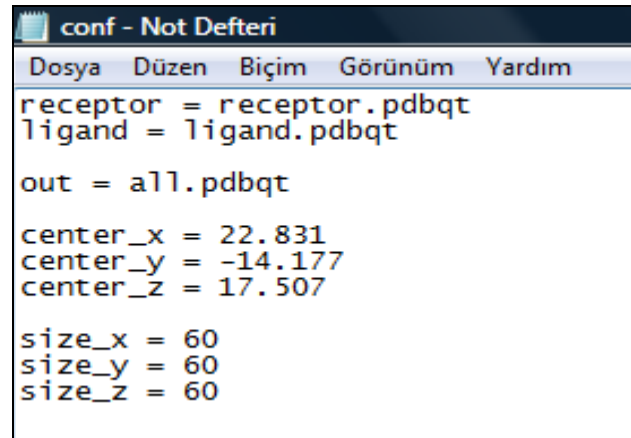
EK 2

2zzo monomer yapı için Autodock tools kullanılarak hazırlanan grid kutusu parametre içerikleri. Moleküle göre grid merkezi değişmektedir.



EK 3

2zzo monomer yapı için Autodock Vina programının kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli konfigürasyon dosyası içeriği



```
receptor = receptor.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

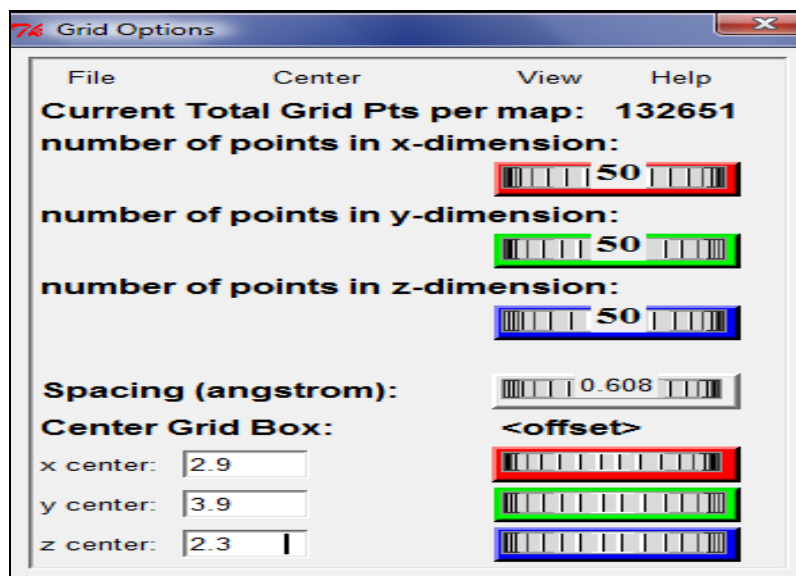
out = all.pdbqt

center_x = 22.831
center_y = -14.177
center_z = 17.507

size_x = 60
size_y = 60
size_z = 60
```

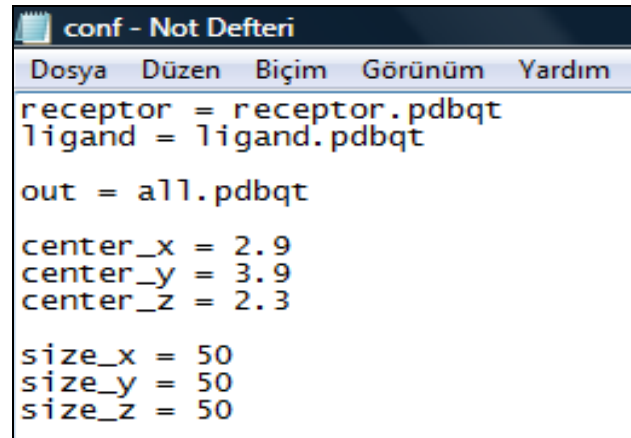
EK 4

2q7c trimer yapı için Autodock tools kullanılarak hazırlanan grid kutusu parametre içerikleri. Moleküle göre grid merkezi değişmektedir.



EK 5

2q7c trimer yapı için Autodock Vina programının kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli konfigürasyon dosyası içeriği



```
receptor = receptor.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

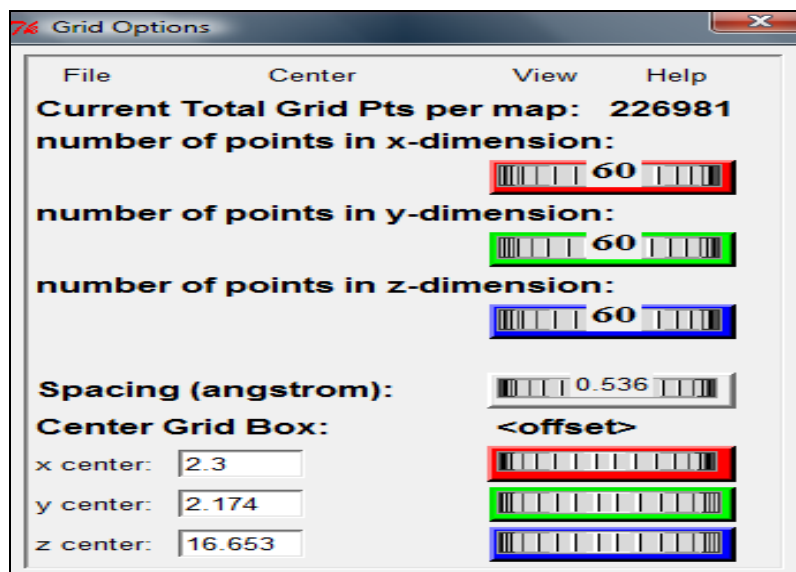
out = all.pdbqt

center_x = 2.9
center_y = 3.9
center_z = 2.3

size_x = 50
size_y = 50
size_z = 50
```

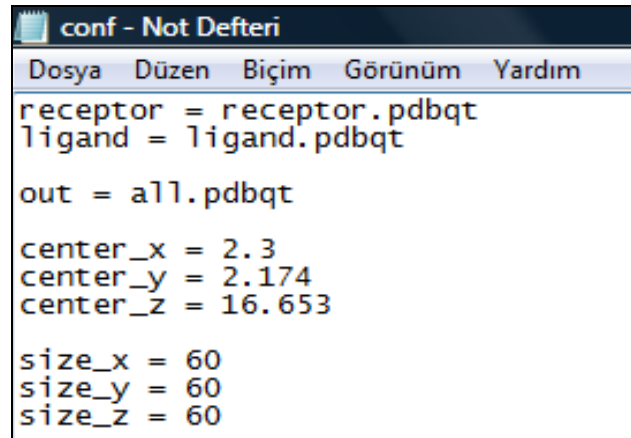
EK 6

2r5d trimer yapı için Autodock tools kullanılarak hazırlanan grid kutusu parametre içerikleri. Moleküle göre grid merkezi değişmektedir.



EK 7

2r5d trimer yapı için Autodock Vina programının kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli konfigürasyon dosyası içeriği



```
receptor = receptor.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

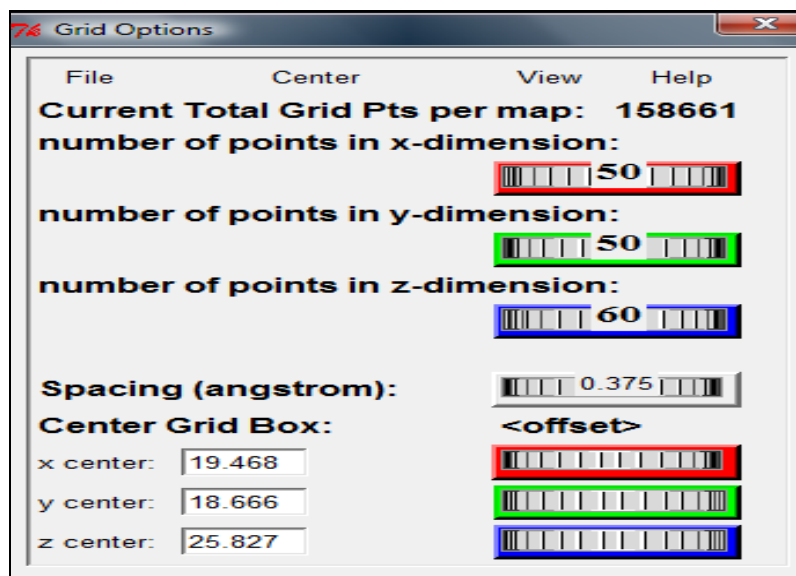
out = all.pdbqt

center_x = 2.3
center_y = 2.174
center_z = 16.653

size_x = 60
size_y = 60
size_z = 60
```

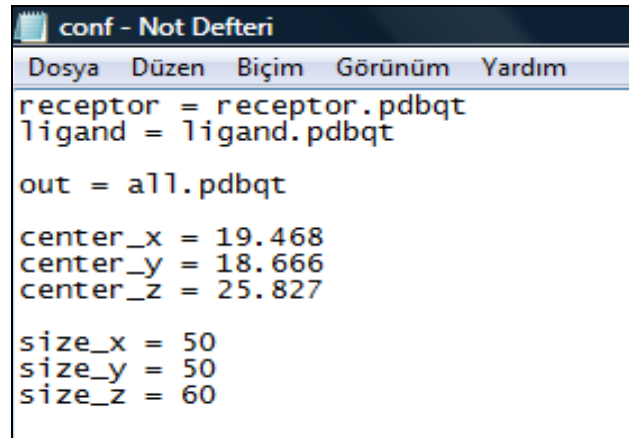
EK 8

1aik trimer yapı için Autodock tools kullanılarak hazırlanan grid kutusu parametre içerikleri. Moleküle göre grid merkezi değişmektedir.



EK 9

1a1k trimer yapı için Autodock Vina programının kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli konfigürasyon dosyası içeriği



```
receptor = receptor.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

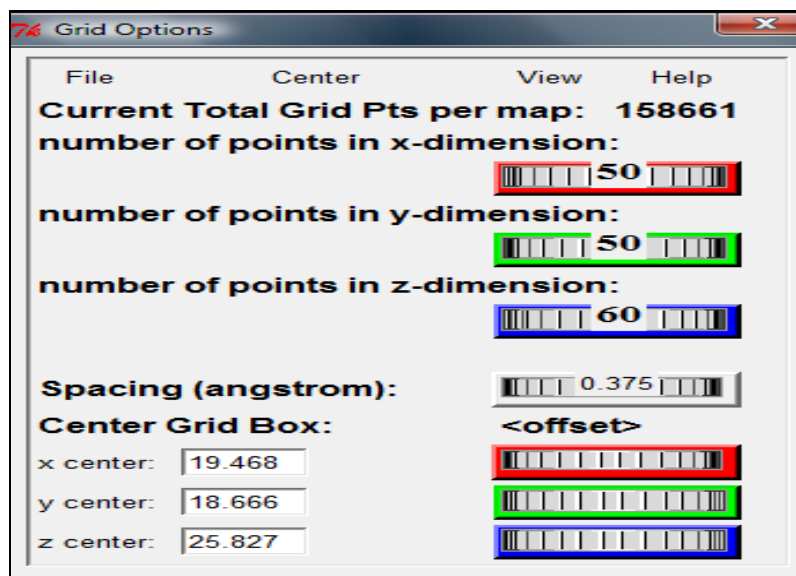
out = all.pdbqt

center_x = 19.468
center_y = 18.666
center_z = 25.827

size_x = 50
size_y = 50
size_z = 60
```

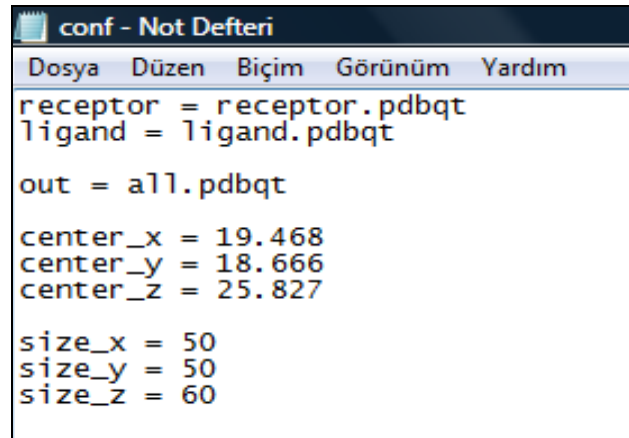
EK 10

1a1k pentamer yapı için Autodock tools kullanılarak hazırlanan grid kutusu parametre içerikleri. Moleküle göre grid merkezi değişmektedir.



EK 11

1aik pentamer yapı için Autodock Vina programının kenetlenme işlemine başlayabilmesi için gerekli konfigürasyon dosyası içeriği



```
receptor = receptor.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

out = all.pdbqt

center_x = 19.468
center_y = 18.666
center_z = 25.827

size_x = 50
size_y = 50
size_z = 60
```

EK 12

Autodock Vina ile gerçekleştirilen moleküler kenetlenme işlemine ait çıktı (log) dosya örneği

```
Detected 2 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1190671984
Performing search ... done.
Refining results ... done.
```

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.	best mode rmsd u.b.
1	-6.2	0.000	0.000
2	-6.2	1.909	3.365
3	-6.2	3.627	5.658
4	-5.5	21.505	23.122
5	-5.5	16.282	18.076
6	-5.5	2.101	3.522
7	-5.4	21.385	23.003
8	-5.3	15.350	17.310
9	-5.2	14.721	17.047

```
writing output ... done.
```

EK 13

Autodock vina programında yapılan moleküler kenetlenme işlemini sanal ligand taraması için otomatik hale getiren ve cygwin programında yazılan komut örneği

```
for f in ligand_*.pdbqt; do
    b=`basename $f .pdbqt`
    echo Processing ligand $b
    mkdir -p $b
    vina --config conf.txt --ligand $f --out ${b}/out.pdbqt --log
    ${b}/log.txt
done
```

ÖZGEÇMİŞ

GENEL

AD, SOYAD: Onur Alten	Doğum Tarihi: 10/06/1983
ADRES: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü 06532 Beytepe/Ankara	
E-POSTA: onuralten@hacettepe.edu.tr	

EĞİTİM

TARİH	DERECE	OKUL	ALAN
2008-2011	MSc.	Hacettepe Üniversitesi	Organik Kimya
2002-2008	BSc.	Hacettepe Üniversitesi	Kimya Bölümü
1994-2001	Lise	Çankaya Anadolu Lisesi	

SUNUMLAR

- Sözlü Sunum: Green Chemistry (Lisans Düzeyi, 2008)
- Sözlü Sunum: Anti-HIV ilaçlar: Hedef molekül gp 41 seçilerek doking metoduyla yeni HIV-1 giriş inhibitörü geliştirilmesi (Yüksek Lisans Düzeyi, 2009)

MAKALE

- Exploration of substrate binding mode of N-terminal region of HIV-1 glycoprotein 41 using molecular docking method (Bioorganic & Medicinal Chemistry adlı dergiye gönderildi)