T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN QSAR VE MOLEKÜLER KENETLENME YÖNTEMLERİ İLE İNCELENMESİ

Nuri YORULMAZ

FİZİK ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Prof. Dr. Oral OLTULU danışmanlığında, Nuri YORULMAZ' ın hazırladığı **"Bazı Sülfonamid Bileşiklerinin Karbonik Anhidraz İnhibisyon Aktivitelerinin QSAR ve Moleküler Kenetlenme Yöntemleri ile İncelenmesi"** konulu bu çalışma 18/10/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Oral OLTULU

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selami PALAZ

Üye : Doç. Dr. Mustafa DURGUN

Üye: Doç. Dr. İsmail Hakkı SARPÜN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Şilan TURHAN IRAK

Bu Tezin Fizik Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET..... i
ABSTRACT..... ii
TEŞEKKÜR..... iii
ŞEKİLLER DİZİNİ..... iv
ÇİZELGELER DİZİNİ..... v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ..... vi
1. GİRİŞ..... 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 7
2.1. Giriş..... 7
2.2. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibisyonunun Modellemesinde QSAR Çalışmaları..... 7
2.3. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibisyonunun Modellemesinde Moleküler Docking Çalışmaları..... 13
3. MATERYAL ve YÖNTEM..... 15
3.1. Giriş..... 15
3.2. Karbonik Anhidraz Enzimi ve Yapı Taşları..... 15
3.2.1. Karbonik anhidraz enzimi..... 17
3.2.2. Karbonik anhidraz enziminin yapısı..... 20
3.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması..... 23
3.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörü Sulfonamitler..... 24
3.5. Fiziksel Altyapı..... 30
3.5.1. Moleküler mekanik yöntemler (MM)..... 30
3.5.2. Elektronik yapı yöntemleri..... 32
3.6. QSAR (Kuantitatif Yapı-Etki İlişkisi) Analizleri..... 40
3.7. Çoklu Doğrusal Regresyon (ÇDR) Analizi..... 43
3.8. QSAR Modellerinin Uygulanabilirlik Sınırlarının Tanımlanması (AD)..... 47
3.9. Moleküler Docking (Kenetlenme)..... 49
3.10. Kullanılan Yazılımlar ve Donanım..... 50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA..... 53
4.1. Giriş..... 53
4.2. QSAR Bulguları..... 53
4.3. Moleküler Docking Bulguları..... 65
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER..... 70
5.1. Giriş..... 70
5.2. Qsar Modelleri..... 70
5.2.1. pKi-CA II QSAR modeli..... 70
5.2.2. pKi-CA IX QSAR modeli..... 73
5.2.3. RpKi Qsar modeli..... 76
5.2.4. ΔpKi Qsar modeli..... 79
5.3. Docking Analizleri..... 82
5.3.1. 7b sülfonamidinin docking analizi..... 83
5.3.2. 7c sülfonamidinin docking analizi..... 83
5.3.3. 8a sülfonamidinin docking analizi..... 84
5.3.4. 8b sülfonamidinin docking analizi..... 85
5.3.5. 8c sülfonamidinin docking analizi..... 85
5.3.6. 8d sülfonamidinin docking analizi..... 86
5.3.7. 8e sülfonamidinin docking analizi..... 86
5.3.8. 8f sülfonamidinin docking analizi..... 87
5.4. Sonuç ve Değerlendirme..... 87
KAYNAKLAR..... 91
ÖZGEÇMİŞ..... 98
EK-1..... 99

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN QSAR VE MOLEKÜLER KENETLENME YÖNTEMLERİ İLE İNCELENMESİ

Nuri YORULMAZ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Fizik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Oral OLTULU
İkinci Danışman: Doç. Dr. Erol EROĞLU
Yıl:2019, Sayfa:114

Bu tez çalışmasında, literatürdeki faklı kaynaklardan derlenen, 43 adet sülfonamit türevi bileşiğin (diazenil benzensülfonamit, sülfonat, 1-aril-6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamid ve 1-aril-6-metoksi-l, 2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamit) Karbonik Anhidraz II ve IX (CAII ve CAIX) izoenzimlerine karşı ölçülmüş inhibisyon sabitleri (K_i) ve bu bileşikleri hesaplanmış moleküler tanımlayıcıları kullanılarak QSAR modelleri oluşturulmuştur. Moleküler tanımlayıcıların hesaplanmasında YFT yöntemi ile B3LYP fonksiyoneli ve 6-31 G (d,p) temel seti kullanılmıştır. QSAR modellerinin oluşturulmasında Doğrusal Çoklu Regresyon Analizi yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen QSAR modellerinin uygulanabilirlik sınırları Kaldıraç Yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, Protein Data Bank' ta (PDB) bu çalışmaya konu olan sülfonamit türevlerinden biri olan 8a kodlu ligantın CAII kompleksi ile bulunan üçlü yapısı (kod:2QO8), AutoDock 4.2 yazılımı uygulanarak yapılan redock (yeniden kenetlenme) çalışması, başarıyla sonuçlandırılmıştır (RMSD 1,20 Å). Daha sonra çalışma serisinde bulunan sülfonamit türevlerinden seçiciliği yüksek olan sekiz adet ligant (Tezde 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e ve 8d olarak isimlendirilmiştir) CAII (PDB kodu 2QO8) ve CAIX (PDB kodu 5FL5) enzim yapılarının aktif sitelerine dock edilmiştir. Docking analizi sonucu, bu ligantların CAII ve CAIX aktivitelerini belirleyen ligant enzim etkileşimlerini ortaya koymamıza imkân vermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik Anhidraz, Sülfonamitler, QSAR, Docking, İlaç tasarımı

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF CARBONIC ANHYDRASE INHIBITION ACTIVITIES BY USING QSAR AND MOLECULAR DOCKING METHODS FOR SOME SULFONAMIDE COMPOUNDS

Nuri YORULMAZ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Physics

Supervisor: Prof. Dr. Oral OLTULU
Co-supervisor:Assoc. Prof. Dr. Erol EROGLU
Year:2019, Page:114

In this study, QSAR models were calculated by using inhibition constants (K_i) measured against isoenzymes of Carbonic Anhydrase II and IX (CAII ve CAIX) of 43 sulfonamide derived compounds (diazenil benzensülfonamit, sülfonat, 1-aril-6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamid ve 1-aril-6-metoksi-l, 2,3,4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamit) compiled from different sources in the literature. In the calculation of molecular descriptors, B3LYP functional and 6-31 G (d,p) basic set were used by DFT method. Linear Multiple Regression Analysis method was applied to construct QSAR models. Applicability domain of the obtained QSAR models were determined by using Leverage Method.

In addition, the triple structure of the 8a coded ligand (In the thesis it is named as 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e and 8d), one of the sulfonamide derivatives subject to this study, found in the Protein Data Bank (PDB) with the CAII complex, and the re-dock study by applying AutoDock 4.2 software, was successfully concluded (RMSD 1.20 Å). Subsequently, eight ligands with high selectivity from the sulfonamide derivatives of this study were docked to the active sites of the CAII (PDB code 2QO8) and CAIX (PDB code 5FL5) protein structure. As a result of docking analysis, it allowed us to reveal the ligand enzyme interactions that determine the CAII and CAIX activities of these ligands.

KEY WORDS: Carbonic Anhydrase, Sulfonamides, QSAR, Molecular Docking, Drug Design

TEŞEKKÜR

Doktora tezi gerçekten bir akademisyen için büyük önem arz etmektedir. Tezimi hazırlamam da gerek bana gösterdiği özellikle sabır, gerekse de verdiği akademik desteği benden esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Oral OLTULU hocama teşekkürlerimi sunarım.

Başka bir ilde yaşamasına karşı tez çalışmaları için yanına her gittiğimde bir abi gibi yanımda oldu. O ve ailesi bana yabancılık hissettirmedi, zamanında belki de çok fazla kıymet bilemediğim ve bu tezin ortaya çıkmasında emeği çok fazla olan ikinci danışmanım Akdeniz Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Erol EROĞLU hocam ve ailesine ne kadar teşekkür etsem azdır. İyi ki varsınız HOCAM.

Ayrıca biraz sancılı geçen doktora sürecimde sürekli yanımda olan arkadaşlarıma (Onlar kendilerini biliyor), bende emeği olan tüm hocalarıma ve özellikle tez süresince beni anlayan eşim Nazlı TURAMAN YORULMAZ' a minnettar duygularla teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Bir kimyasal reaksiyonda enzimlerin rolü……... 16
Şekil 3.2. Temel aminoasit yapısı…… 16
Şekil 3.3. Karbonik anhidraz enziminin çalışma mekanizması……... 18
Şekil 3.4. CA izoenzimlerinin hücre içi yerleşmeleri…….. 19
Şekil 3.5. CAII-ligand (8a) kompleksinin deneysel yapısı…….. 21
Şekil 3.6. CA enziminin aktif alanı……. 21
Şekil 3.7. CAII aktif sitesi içerisindeki sulfonamitlerin genel bağlanma şekli..…… 22
Şekil 3.8. CAIX üç boyutlu yapısı (PDB kod:5FL5)……... 23
Şekil 3.9. CAIX izoenziminin hücre zarına bağlı modeli…… 23
Şekil 3.10. CA izoenzimlerinin CO2 hidrasyonu katalitik mekanizması…… 24
Şekil 3.11. Benzensülfonamidlerin genel yapısı…….. 25
Şekil 3.12. 43 adet Karbonik anhidraz inhibitörü sülfonamit türevinin moleküler yapısı….. 27
Şekil 3.13. Moleküler Mekanik Yöntem Benzetimi…… 31
Şekil 4.1. Eğitim seti (A+B), test seti C olduğu durumlar için deneysel aktivite değerinin tahmin edilmiş aktivite değerine karşı çizilmiş grafikleri. ……... 61
Şekil 4.2. Eğitim seti (A+B), test seti C olduğu durumlar için modelin uygulanabilirlik sınırları (applicibility domain, AD). Kırmızı noktalar test set ve siyah noktalar eğitim set bileşenlerini ifade etmektedir……. 63
Şekil 4.3. 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e ve 8f moleküllerinin 2QO8 (CAII) ve 5FL6 (CAIX) aktif siteleri içerisindeki yerleşimi……. 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Aminoasitler ve gösterimi…… 17
Çizelge 3.2. 43 adet Karbonik anhidraz inhibitörü sülfonamit türevinin deneysel ölçülmüş inhibisyon katsayısı (Ki) verileri…….. 29
Çizelge 4.1. Aktivite verilerine göre ayrılmış alt setlerde yer alan moleküller……... 54
Çizelge 4.2. pKi-CAII, pKi-CAIX, RpKi ve ΔpKi aktivite verileri için elde edilen QSAR modellerinin istatistiği…….. 55
Çizelge 4.3. Elde edilen QSAR modellerinde yer alan moleküler tanımlayıcılar ve katsayıları…….. 57
Çizelge 4.4. Eğitim seti (A+B), test seti C olduğu durumlar için tahmin edilmiş aktivite değerleri (t üssü işaretleri, test setleri ifade etmektedir)…….. 59
Çizelge 4.5. 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e ve 8f moleküllerinin inhibisyon sabitleri ile docking bağlanma serbest enerji değerleri…… 67
Çizelge 4.6. 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e ve 8f moleküllerinin CAII ve CAIX aktif siteleri içerisindeki aminoasitlerle yaptıkları Hidrojen Bağı etkileşimleri…….. 68
Çizelge 4.7. 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e ve 8f moleküllerinin CAII ve CAIX aktif siteleri içerisindeki aminoasitlerle yaptıkları yakın van der Waals etkileşimleri……... 69
Çizelge 5.1. pKi-CAII modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları…….. 71
Çizelge 5.2. pKi-CAIX modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları…… 74
Çizelge 5.3. RpKi modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları……. 77
Çizelge 5.4. ΔpKi modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları……. 80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CA	:	Karbonik Anhidraz
PDB	:	Protein Data Bankası
STO	:	Slater Tipi Orbitaller
GTO	:	Gaussian Tipi Orbitaller
YFT	:	Yoğunluk Fonksiyonel Teori
MM	:	Moleküler Mekanik
HIS	:	Histidin
ALA	:	Alanine
HF	:	Hartree Fock
HOMO	:	Molekülün En Yüksek Dolu Orbital
LUMO	:	Molekülün Dolu Olmayan En Düşük Orbitali
TSS	:	Total Kareler Toplamı
ESS	:	Açıklanan Kareler Toplamı
RSS	:	Rezüdiel Kareler Toplamı
PRESS	:	Tahmin Edilen Residüel Kareler Toplamı
AD	:	Applicibility Domain
QSAR	:	Kantitatif Yapı-Etki İlişkisi
s	:	Standart Sapma
F	:	Fisher Testi
Å	:	Armstrong
L	:	Ligant
P	:	Reseptör
X^T	:	X matrisinin Transpozu
ΔS	:	Bağlanma Sonrası Entropi Kaybı
V	:	Potansiyel
R^2_{CV} (Q^2)	:	Korelasyon Belirleme Katsayısı
K_i	:	İnhibisyon Katsayısı
e	:	Elektron Yükü
m_e	:	Elektron Kütlesi
H	:	Hamiltonyen Operatörü
F	:	Fock Operatörü

1. GİRİŞ

İlaçların çoğunun hedefi hücresel proteinlerdir. İlaç hücre içerisine ulaştığında ilgili protein ile seçici şekilde etkileşimi neticesinde tedavi veya teşhis etkisi ortaya çıkar. 2002 yılında tamamlanan insan genoması çalışmaları sonuçlarına göre, insan geni tarafından üretilen 6000 ile 8000 arasında farmakolojik açıdan ilaç hedefi olabilecek proteinin varlığı tahmin edilmiştir (Landry ve Gies, 2008). 2003 yılında yapılan bir çalışma insan genoması çalışmalarında ortaya konulan proteinler arasından sadece 273 proteinin o günkü mevcut ilaçların hedefi olduğunu göstermiştir (Golden, 2003). Günümüzde 330 civarında ilaç hedefi protein vardır, bunlardan 270 kadarı insan genoması tarafından üretilen proteinler iken geriye kalanları ise patojen organizmalar (bakteri, virüs, mantar vs.) tarafından üretilenlerdir (Supuran ve Winum, 2009).

2006 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde 21000 civarında ilaç ürünü olduğu bildirilmiştir. Bunlardan 1357 tanesinin özgün ilaç olup, bu ilaçlardan 1204 tanesinin küçük molekül tipi ilaç, 192 tanesinin pro-drug (ilaç ana maddesi; vücutta parçalanıp bir parçanın ilaç etkisi göstermesi) olduğu ve 166 tanesinin de biyolojik ilaç olduğu bildirilmiştir (Overington ve ark., 2006). İlaç hedefi olan proteinler sınıflandırıldığında bunlardan 66 tanesi insan enzimleri, 20 tanesi patojen (bakteri, virüs, mantar vs.) enzimleri, 20 tanesi G-proteine kenetli aile reseptörleri, 12 tanesi nükleer reseptörler, 7 tanesi sitokin reseptörleri, 10 tanesi iyon kanalı reseptörleri ve 10 tanesi de hücre membranı reseptörleri olduğu bildirilmiştir (Imming ve ark., 2006).

Karbonik anhidraz (CA) en basitinden en gelişmiş olana kadar doğadaki tüm canlılarda var olan bir metalo-enzimdir. Bu enzimin doğada pek çok formu olmakla beraber, bulundukları canlıya bağlı olarak beş ana guruba (α-CA, β-CA, γ-CA, δ-CA ve ζ-CA) ayrılmıştır. Bu gruplardan α-Karbonik anhidraz memelilerde bulunur ve en temel fonksiyonu kanda ve diğer dokularda

$$C0_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ \qquad (1.1)$$

reaksiyonunu katalize etmektir. Bu basit reaksiyonun vücuttaki birçok fizyolojik süreçte önemli fonksiyonu vardır. Bu reaksiyon; metabolize edici dokular ile akciğer arasında karbondioksit/bikarbonat transferi, dokulardaki asit-baz dengesinin ayarlanması, birçok organda elektrolit salgısının düzenlenmesi, kemik erimesi, kireçlenme, biyosentetik reaksiyonlar (örneğin; glukoneogenez, lipogenez ve ureagenez) ve tümör oluşumu gibi fizyolojik süreçler ile doğrudan ilişkilidir (Supuran, 2009). α-Karbonik anhidraz sınıfındaki enzimlerin katalitik fonksiyonu bu enzimlerin aktif sitesi içerisinde yerleşmiş kofaktör çinko (Zn^{+2}) iyonu vasıtasıyla gerçekleşir. Çinko iyonu, yaklaşık 15 Å derinliğinde huni şeklinde, bir tarafı hidrofobik diğer tarafı hidrofilik aminoasitler içeren enzim aktif sitesinin tabanında bulunur. Çinko iyonu aktif site içerisinde üç adet çevre aminoasit ve supstrat (CO_2/CHO_3/H_2O/OH) ile tetrahedral olarak koordine olmuştur. Bu yapının bağlarının üçü Histidinlerin (HIS94, HIS96 ve HIS119) yan zincirlerindeki imidazol halkalarının azot atomları üzerinden olurken dördüncü bağ su veya hidroksil iyonu ile oluşmaktadır (Supupran ve ark., 2004). Çinko atomuna yerleşmiş olan su molekülü enzim aktif sitesinde bulunan Treonin'in (199) hidroksil grubuyla ve Glütamikasitin (106) karboksilat grubuyla Hidrojen bağı yapmaktadır. Bu etkileşim su molekülünü karbondioksit tarafından yapılacak nükleofilik atak için uygun bir hedef haline getirmektedir (Supuran, 2009).

α-Karbonik anhidraz sınıfındaki enzimler yapısal olarak 15 farklı alt izoenzim olarak sınıflandırılmıştır. Bu izoenzimler yapısal açıdan çok az farklılık göstermelerine karşın katalitik aktivitelerinin kinetik hızları, hücre içerisindeki lokalizasyonları ve organ/doku içerisindeki dağılımları açısından oldukça farklıdır. 15 adet izoenzimden, 12 tanesi (CAI, CAII, CAIII, CAIV, CAVA, CAVB, CAVI, CAVII, CAIX, CAXII, CAXIII ve CAXIV) enzimik aktiviteye sahipken, 3 tanesi (CAVIII, CAX ve CAXI) Karbonik anhidraz ilişkili protein olarak adlandırılır, bunların katalitik aktiviteleri gözlenmemektedir. Bu 12 katalitik izoenzimin aktif sitesinin tamamında Çinko atomu mevcut olup 3 Histidin aminoasidi ve su/hidroksil iyonu ile bağlı haldedir. Aktif site içerisinde bulunan dördüncü bir Histidin rezüdüsü (HIS64) sürekli konformasyon değişimi yaparak katalitik bölgeye Hidrojen taşıyan bir pompa gibi davranır (Pastorekova ve ark., 2009). Bu izoenzimlerin hücre içerisindeki lokalizasyonları farklılık gösterir. Hücre içerisinde CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAVIII,

CAX, CAXI ve CAXII sitoplâzmada; CAIV, CAIX, CAXII ve CAXIV hücre zarında; CAVA ve CAVB mitokondride ve CAVI ise tükürük bezi ve meme bezi salgısında bulunmaktadır (Alterio ve ark., 2012).

CAI ve CAII izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinde en fazla miktarda olup aynı zamanda en önemli işlevleri solunumda yer almalarıdır. İnsan dokularında en fazla miktarda bulunan CAII izoenzimi aynı zamanda göz lensi, kornea ve epitelyumda bol miktarda, böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde mevcuttur.

Karbonik anhidraz enzimin inhibisyonu temeline dayanan ilk ilaçlar 1950-1960 yıllarda piyasaya çıkmıştır. Bunlar hali hazırda kullanılmakta olan Acetazolamide, Methazolamide, Ethoxzolamide, Sulthiame ve Dichlorophenamide'dir. Bunlar düretik (idrar söktürücü) ve antiepileptik (epilepsi tedavisi ilacı) olarak kullanılırken karbonik anhidraz enzimi inhibisyonunun Glukoma (göz tansiyonu) tedavisinde de kullanılabileceğinin farkına varılmıştır (Supuran, 2008). Bu bahsedilen ilaçlar halen göz tansiyonu tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten 1990'lı yıllarda damla formunda kullanılabilen iki göz tansiyonu ilaç daha piyasaya çıkmıştır. Bunlar Dorzolamide ve Brinzolamide olup öncekilere göre çok daha az istenmeyen yan etkiye sahiptir.

2000'li yıllardan itibaren karbonik anhidraz enzimin inhibisyonu temeline dayanan kanser tümörü tedavisi ilacı geliştirme çalışmaları popüler bir hal almaya başlamıştır. 2006 ve 2007 yılında yapılan çalışmalarda CAIX izoenzimin kanser tümöründeki hücrelerde asit-baz dengesinin bozulmasında ve bu kanser hücrelerin fizyolojisinde önemli bir fonksiyonunun olduğunun tespit edilmesi (Brahimi-Horn ve Pouyssegur, 2007) ve CAXII izoenziminin sağlıklı hücrelere oranla bazı tip kanser tümöründeki hücrelerde daha fazla oranda üretiliyor olması bu iki izoenzimi seçici olarak inhibe etme temeline dayalı kanser ilacı geliştirme çalışmalarına temel oluşturmuştur (Pastorekova ve ark., 2006). Günümüzde Karbonik anhidraz enzimin inhibisyonu temeline dayanan ilaç geliştirme çabaları göz tansiyonu ve kanser ilacı geliştirme konusunda yoğunlaşmakla beraber; ödem giderici, epilepsi, obezite, kısırlık

ve irtifa rahatsızlığı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere ilaç geliştirme çalışmalarında hedef enzim olarak kullanılmaktadır.

Farklı hastalıklar için farklı izoenzimlerin seçici şekilde inhibisyonunun yapılması ilaç geliştirme çalışmalarında hayati önem taşımaktadır. Hedef dışındaki farklı izoenzimlerin katalitik aktivitesi inhibe edildiğinde birçok durumda tedavide istenmeyen yan etki olarak ortaya çıkması mümkündür. Bu nedenle izoenzim seçici inhibitörlerin tasarımı bu alanda çok önemlidir. CAI izoenziminin seçici inhibisyonu ile retina ve beyin ödemine karşı etkili ilaç geliştirme çalışması yapılmaktadır (Gao ve ark., 2007). CAVA ve CAVB izoenzimlerinin seçici inhibisyonu anti-obezite ilaç geliştirme konusunda hedef enzim olarak belirlenmiştir (Supuran ve ark., 2004). CAII, CAVII, CAXII ve CAXIV seçici inhibisyonu epilepsi tedavisi için ilaç geliştirme konusunda hedef enzim olarak belirlenmiştir (Hen ve ark., 2011; De Simone ve ark., 2009).

Göz tansiyonu ilacı geliştirilmesinde CAII, CAIV ve CAXII hedef iken CAIX ve CAXII kanser tümörü tedavisi ilaç için hedef enzimdir. Kanser tedavisi amaçlı ilaç molekülünün CAII izoenzimini inhibe etmemesi istenir. Çünkü CAII vücutta en yaygın ve yoğun olan izoenzimdir. CAIX inhibisyonu yoluyla kanser tedavisi yapılmak istendiğinde CAII' de inhibe edilirse ciddi yan etkiler ortaya çıkabilir. CAII inhibisyonu yoluyla göz tansiyonu tedavisi yapılmak istendiğinde bu durum yukarıdakinin tam tersidir, yani CAIX' un inhibe edilmemesi gerekir.

Bu anlatılan sebeplerden ötürü, hedef enzim olarak Karbonik Anhidrazın farklı izoenzimlerinin seçici inhibisyonu ilaçların geliştirilmesinde istenilen etkinin yanında istenmeyen yan etkilerin ortadan kaldırılabilmesi için hayati önem taşımaktadır. Genel olarak CAII' nin seçici ve yüksek aktiviteli inhibitörleri anti-glukoma ilaçları için çok önemli iken CAIX' un seçici ve yüksek aktiviteli inhibitörleri anti-tümör kanser ilaç geliştirme çalışmaları için çok önemlidir.

Bu tez çalışmasında literatürde var olan, seçiciliği (CAII/CAIX oranı) ve biyolojik aktiviteleri sentezleyenler tarafından deneysel yöntemlerle ölçülerek üç

farklı makalede rapor edilen diazenylbenzenesulfonamide (Carta ve ark., 2009), sulfonate, Indanesulfonamide, 1-aryl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines-2-sulfonamide (Thiry ve ark., 2006) ve 1-aryl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-2-sulfonamide (Gitto ve ark.,. 2011) bileşiklerinin CAII ve CAIX izo-enzimlerine karşı ölçülmüş aktivite verilerini ve bu bileşiklerin yapıları üzerine yapacağımız kuantum kimyasal hesaplamalardan elde edilen moleküler tanımlayıcılar ile QSAR (QuantitativeStructure-Activity Relationship / Kuantitatif Yapı-Etki İlişkileri Analizleri) modelleri oluşturulmuştur. Oluşturulan bu modeller kullanılarak; mevcut moleküller üzerinde yapı değişiklikleri yapılmak sureti ile fonksiyonel grupların (CH_3, CH_2CH_3, OH, NH_2 vb.) yerlerinin değiştirilmesi veya yeni fonksiyonel gruplar eklenmesi vasıtası ile inhibisyon aktiviteleri ile seçicilikleri literatürde var olanlardan daha yüksek yeni sanal moleküllerin tasarımı için kullanılabilinir.

Günümüzde QSAR çalışmaları ilaç geliştirmede kullanılan vazgeçilmez ve yaygın bir yöntemdir. Bir QSAR çalışmasının temeli mevcut olan bir grup molekül ile bu moleküllerin deneysel olarak ölçülmüş olan aktivite değerleri arasındaki ilişkinin istatistiksel yöntemlerle tayin edilmesi esasına dayanır. Aktivitesi bilinen moleküllerden elde edilecek QSAR modelinin güvenilirliği test edildikten sonra bu model henüz sentezlenmemiş sanal moleküllerin, eğer sentezlenecek olursa aktivitesinin ne olacağına dair öngörü yapmamızı sağlar.

Karbonik anhidraz enzimi, inhibitörleri ve bu enzimin izoenzimlerinin seçici inhibisyonunun ilaç geliştirme çalışmaları açısından yeri ortaya konulduktan sonra bu çalışmanın amacı şu şekilde ifade edilebilir. Glukom (göz tansiyonu) ve kanser tümörü tedavisi için ilaç geliştirme çalışmalarında hedef enzim olarak yaygın biçimde kullanılan karbonik anhidraza karşı, inhibitör özelliği deneysel yöntemle belirlenmiş literatürde bulunan sulfonamit bileşiklerini kullanarak, QSAR modelleri oluşturmaktır. Bu modellerdeki moleküler tanımlayıcıların yorumlanması yoluyla moleküler yapı ile biyolojik etki arasındaki ilişkinin rasyonel bir açıklaması yapılmaya çalışılacaktır.

Glukom tedavisi için karbonik anhidrazın ikinci izoenziminin (CAII) seçici şekilde inhibe edilmesi hedeflenirken, kanser tümörlerinin tedavisinde karbonik anhidrazın dokuzuncu (CAIX) izo-enzimlerinin seçici şekilde inhibe edilmesi hedeflenir. Bu tez çalışmasında, literatürde deneysel K_i verileri olan CAII ve CAIX inhibitörü sulfonamit bileşikleri için kuantum mekanik yöntemle hesapladığımız moleküler tanımlayıcıları, deneysel K_i değerleri ile çoklu doğrusal regresyon (MLR) işlemine tabi tutarak QSAR modelleri oluşturulmuştur.

Bu tez çalışmasında yapılan diğer bir uygulama; Moleküler kenetlenme (docking) tekniğini QSAR yöntemine tamamlayıcı bir yöntem olarak ilave edilmiştir. Bu yöntem bize, bazı sulfonamit moleküllerinin CAII ya da CAIX' a karşı neden daha seçici aktivite gösterdiğine dair sınırlı bir düzeyde de olsa rasyonel bir açıklama yapma olanağını sağlamıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Giriş

Karbonik anhidraz enzimi 1933 yılında Meldrum ve Roughton tarafından keşfedilmesinden bugüne üzerinde yapılan araştırmalar hız kesmeden yoğun şekilde devam etmektedir. Bu alandaki çalışmalar 1970' li yıllara kadar enzimin izolasyonu, karakterizasyonu, inhibitor sentezi ve kinetik ölçümü gibi alanlarda yoğunlaşırken 1972 yılında Liljas ve ark., tarafından ilk olarak karbonik anhidrazın x-ışınları kristalografisi ile üç boyutlu yapısının ortaya çıkartılması sonucu yeni bir aşamaya gelmiştir. Bu enzimin üç boyutlu yapısının ortaya koyulması vücuttaki fonksiyonlarının anlaşılmasında bir mihenk taşı oluşturmaktadır. Literatür incelendiğinde Karbonik anhidraz enzimlerine inhibitör etkisi gösterdiği bilinen en eski molekül grubu olan sülfonamitler ile yapılan ilk QSAR çalışmasının 1978 yılında Testa ve ark., tarafından yayınlandığı görülmektedir.

Ayrıca 2000'li yıllarda bu enzimin aktif sitesi içerisinde bulunan çinkoya, inhibitörlerin bağlanmasını modelleyen çok sayıda kuantum kimyasal hesaplama çalışmaları da konu olmuştur. Bu bölümde karbonik anhidrazın inhibisyonunu konu alan moleküler modelleme çalışmalarının bir özeti verilmiştir. Bu alanda yüzlerce çalışma olduğundan en fazla katkı yaptığı düşünülen çalışmalar ele alınmıştır.

2.2. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibisyonunun Modellemesinde QSAR Çalışmaları

Karbonik anhidraz inhibitörleri ile yapılan QSAR çalışmaları 1970' li yıllarda başlamıştır. Bu çalışmaların büyük çoğunluğunda sülfonamit tabanlı inhibitörlerin karbonik anhidraza karşı ölçülmüş aktivite verileri kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmaların tamamına yakını karbonik anhidraz II (CAII) izoenziminin biyolojik aktivite verilerinin kullanılmasına yoğunlaşmıştır.

Testa ve ark., 1978' te yaptığı ilk QSAR çalışmasında; sülfonamitlere bağlı aromatik halka üzerindeki sapsütütentlerin değişimi ile ortaya çıkan sterik etkideki değişimin ligandın inhibisyon gücünü belirleyen önemli faktörlerden biri olduğu ortaya koyulmuştur.

Debenedetti ve ark., 1985 yılında geliştirdikleri QSAR modellerinde bir seri sülfonamit türevi moleküle CNDO/2 teori seviyesinde hesaplama yaparak, kuantum kimyasal hesaplama yöntemiyle elde ettikleri elektronik indeksler ile bu moleküllerin inhibisyon aktiviteleri arasında çoklu regresyon analizi kullanarak aktiviteye etki eden elektronik faktörleri incelemişlerdir.

Scholz ve ark., 1993'te bir seri sülfonli metan sülfonamit molekülü ile yaptıkları QSAR çalışmasında, sülfonamit grubuna komşu karbon atomuna bağlanan sapsütütentlerin toplam indüktif etkisinin aktiviteyi tayin etmede en dominant faktör olduğunu göstermişlerdir.

1994 yılından başlayarak Supuran ve Clare'in karbonik anhidraz inhibitörleri ile yapılan çok sayıda QSAR çalışması yayınlanmıştır. Yazarlar, hesaplanan moleküler tanımlayıcılar ile çoğu durumda CAII izoenzimine karşı ölçülen deneysel inhibisyon sabiti arasında korelasyon denklemini çoğu kez Çoklu Doğrusal Regresyon (ÇDR) ve Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu tekniklerini bazen de doğrusal olmayan istatistiki bir yöntem olan Koşullu Beklentiler Metodunu (ACE: conditional expectations technique) (Breiman ve Friedman, 1985) kullanarak elde etmişlerdir.

Clare ve Supuran, 1994 yılında sülfonamitler ile yaptıkları ilk QSAR çalışmasında CNDO/2 kuantum kimyasal hesaplama yöntemi ile elde ettikleri moleküler tanımlayıcılar ile CAII izoenzimine karşı ölçülen deneysel inhibisyon sabiti arasında korelasyon denklemlerini ortaya koymuşlardır. Yazarlar bu çalışmada ligantlardaki oksijen ve azot atomları üzerindeki kısmi yük miktarı ile molekülün boyutlarının aktiviteyi belirlemede en etkin moleküler tanımlayıcılar olduğunu göstermişlerdir.

Supuran ve Clare, 1995 yılında içinde iyonik sülfonamitlerin de bulunduğu QSAR çalışmasında; PM3 kuantum kimyasal hesaplama yöntemi ile elde ettikleri moleküler tanımlayıcıları kullanmışlardır. Yazarlar, SO_2NH_2 grubuna bağlı pridin halkasında pozitif yük miktarındaki artışın ve hem x hem de z yönlerinde polarizibilite tensörleri bileşenlerinin değerlerindeki artışın inhibisyon aktivitesini arttırdığını, buna karşın ligantların Homo enerjilerinde ve z yönündeki polarizibilite tensörü bileşenindeki artışın ise inhibisyon aktivitesini düşürdüğünü göstermişlerdir.

Yine; Clare ve Supuran, 1997 yılında yaptıkları QSAR çalışmasında aktiviteyi domine eden moleküler tanımlayıcıların SO_2NH_2 grubundaki atomların Mulliken kısmi yükleri, ligandların boyutları ve lipofilisiti özelliğini temsil eden logP (oktanol-su partisyon katsayısı) olduğunu bildirmişlerdir.

Supuran ve Clare, 1998 ve 1999 yıllarında yaptıkları diğer bir çalışmada ise SO_2NH_2 grubundaki atomların elektrostatik potansiyel (ESP) tabanlı hesaplanmış kısmi yüklerini, ligandların dipol momentlerini AM1 metodu ile çözücü içerisinde hesaplayarak korelasyon denklemini elde etmişlerdir. Yazarlar CAI ve CAII izoenzimlerinin sülfonamitler ile etkileşimlerinde seçiciliği sağlayan birtakım faktörlerin ne olabileceği konusunda önermelerde bulunmuşlardır.

Ayrıca Clare ve Supuran, 1999 yılında yaptıkları benzer QSAR çalışmalarında da SO_2NH_2 grubundaki atomların ESP tabanlı kısmi yükleri, Homo, Lumo, dipol moment, polarizibilite tensörleri ve ligandların COSMO yaklaşımı ile hesaplanmış çözünme enerjilerini moleküler tanımlayıcı olarak uygulamışlardır. Bu moleküler tanımlayıcıların mekanistik yorumlamaya uygun olmaları yeni sentezlenecek ligandların tasarımına katkı yaptığına şüphe yoktur.

Clare ve Supuran, 2000 yılında yaptıkları bir diğer QSAR çalışmasında; benzene-sülfonamit grubuna bağlı sabsüte benzene ve pridin halkalarındaki pi tipi bağların düğüm noktalarının yönelim açılarının Karbonik anhidraz enzimi inhibisyonunun, QSAR modellemesin de etkili bir moleküler tanımlayıcı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Supuran ve Clare, 2001 yılında bu seride yaptıkları ilk çalışmalarını 27 adet Schiff bazlı benzene-sülfonamit türevi ile yürütmüşlerdir. Yazarlar bu çalışmada moleküllerdeki benzene ve imidazol gibi halka sistemlerindeki (pi-tipi orbital) öncü orbitallerin faz açılarını (FOPA; Frontier Orbitals Phase Angles) moleküler tanımlayıcı olarak kullanırken bu tanımlayıcıların aktiviteye nasıl etki yaptığı hususunda bazı yorumlar ortaya koymuşlardır. Bu yorumlara göre FOPA'nın aktiviteye etkisi; ligandlar üzerindeki pi-orbitali benzer orbitallerdeki yükler ile enzimin pi-orbitali benzeri orbitaller arasında yük transferi etkileşimi oluşmaktadır. FOPA moleküler tanımlayıcılarının CAII inhibisyonu QSAR modellemesinde etkin olurken, CAI modellemesinde etkin olmayışı buna kanıt olarak sunulmaktadır. Çalışılan seride bulunan ligandların CAI ve CAII' ye karşı farklı etki sergilemesinin sebebi şu şekilde açıklanmıştır; CAII aktivitesinde His64 rezidüsünün imidazol halkası ile ligandın sabsüte benzene halkası arasında yük transfer etkileşimin olmasına karşın, CAI katalitik aktif sitesinde His64' ün rolünün olmadığından dolayı yük transferi etkileşimi söz konusu değildir. Bu nedenle, bu moleküler tanımlayıcıların CAI QSAR modelinde yer almamış olması sonucuna götürmüştür.

Clare ve Supuran, 2005 yılında yaptığı iki çalışmada da geleneksel olarak kullandıkları, sülfonamit grubunda bulunan N, O, S atomları üzerindeki Mulliken kısmi yükleri, molekülün dipol momenti, polarizibilite tensörleri, öncü orbitallerin (Homo, Lumo vs.), çözünme enerjileri yanında pi-tipi orbitallerin faz açılarını moleküler tanımlayıcı olarak kullanmışlardır.

2000'li yıllardan sonra topolojik indeksleri kullanarak sülfonamitlerin karbonik anhidrazın başta CAII olmak üzere birçok farklı izoenzimine karşı ölçülmüş inhibisyon aktivitesi verisini modelleyen QSAR çalışması yapılmıştır. Topolojik indekslerin moleküler tanımlayıcı olarak kullanılması ile elde edilen QSAR modelleri her ne kadar istatistiki açıdan tatminkâr olsa da, bu moleküler tanımlayıcıların doğaları gereği fiziksel yorumlamaya pek uygun değildir.

Khadikar ve ark., 2005 yılında benzene sülfonamitlerin CAII ile bağlanma sabitlerini modelleyen QSAR çalışmasında; Wiener, Szeget, Randic, Kier Hall ve

Padmakar-Ivan topolojik indekslerini üç gösterge parametresi ile beraber kullanmışlardır. Aynı çalışmada kullanılan topolojik indekslere ilaveten moleküllerin hidrofobisinin derecesini temsil eden logP modellere eklendiğinde modellerin istatistik değerlerinde bariz bir artışın olduğunu göstermişlerdir.

Agrawal ve ark., 2002 yılında 39 adet sülfonamitin CAII izoenzimine karşı ölçülmüş inhibisyon sabitlerini modelleyen QSAR çalışmasında Wiener, Szeget, Balaban, dallanma ve bağlanma topolojik indekslerini iki gösterge parametresi ile beraber kullanmışlardır.

Thakur ve ark., 2004 yılında yaptığı çalışmada ise, 29 adet sapsüte benzene sülfonamitin CAII' ye karşı ölçülmüş inhibisyon sabitleri ile yaptıkları QSAR modellemesinde tek bir moleküler tanımlayıcı (Balabanindeksi) içeren QSAR modelinin istatistiği oldukça iyi sonuç verdiği rapor edilmektedir.

Jaiswal ve ark., 2004 yılında topolojik indeksleri kullanarak bir QSAR çalışması yapmışlardır. Bu çalışmanın en özgün tarafı CAIX izoenzimine karşı ölçülmüş inhibisyon sabitlerinin ilk defa bir QSAR çalışmasında kullanılmış olmasıdır. Ancak bu çalışmada sunulan QSAR modelleri istatistiki açıdan kabul edilebilir sınırlar içerisinde değildir. Dolayısıyla kullanılan veri seti QSAR modellemesi yapmaya uygun değildir.

Literatürde yukarıda bahsedilenler dışında topolojik indekslerin kullanıldığı, CAII' nin yanında CAI, CAIV ve CAVII' ye karşı ölçülmüş inhibisyon aktivitelerini kullanan çok sayıda QSAR çalışması mevcuttur. 2000' li yıllarda karbonik anhidraz inhibisyonunu konu alan sınırlı sayıda 3D-QSAR çalışması da yayınlanmıştır. Bunlardan başlıcaları, Weber ve ark., 2006 yılında yaptıkları kapsamlı bir 3D-QSAR çalışmasında 87 adet aromatik ve heterosilik sülfonamit türevinin CAI, CAII ve CAIV' e karşı ölçülmüş inhibisyon sabitlerini kullanarak CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) ve CoMSIA (Comparative molecular similarity index analysis) tekniklerinin uygulandığı çalışmadır. CAI, CAII ve CAIV için ayrı ayrı elde edilen, 60 adet eğitim molekülünden oluşturulan CoMFA ve CoMSIA modelleri 27 test

molekülünün aktivitelerini belirlemişlerdir (tüm modellerde R^2_{test}>0,85). Elde edilen modellerin sterik, hidrojen donor ve hidrojen akseptör alanlarının grafik olarak görselleştirilmesinin yorumlanması sayesinde ligandların izoenzim seçiciliği konusunda bilgiler vermiştir.

Aynı araştırma grubu, Hillebrect ve ark., 2006 yılımda yayınladıkları ikinci makalede, CoMFA ve CoMSIA tekniklerine ilave olarak AFMoC (Adaptation of Fields for Molecular Comparison) (Gohkle ve Klebe, 2002) yaklaşımını da CAI, CAII ve CAIV inhibisyon aktivitelerinin modellenmesinde daha geniş bir sülfonamit seti için kullanmışlardır.

Tuccinardi ve ark., 2007 yılında yayınladıkları bir makalede moleküler kenetlenme (docking) ve reseptör tabanlı 3D-QSAR tekniklerini birlikte kullandıkları kapsamlı bir çalışmanın sonuçlarını sunmuşlardır. Protein Data Bank (PDB)'tan alınan 40 adet CAII sülfonamit kompleksi ile GOLD yazılımını kullanarak moleküler kenetlenme çalışması yürütmüşlerdir. 294 sülfonamit molekülü ile de reseptör tabanlı 3D-QSAR çalışması yürütülmüştür. 220 molekül eğitim seti olarak ayrılmıştır. Diğer kalan moleküller üç farklı test sete ayrılmıştır. Elde edilen 3D-QSAR modellerinin istatistik düzeyi iyi seviyede olduğu görülmüştür.

Tuccinardi ve ark., 2007 yılında yayınladıkları ikinci makalede yukarıda anlatılan reseptör tabanlı 3D-QSAR tekniğini CAIX için uygulamışlardır. Elde edilen 3D-QSAR modellerinin istatistik seviyesi bir önceki çalışmaya sunulan verilere benzerlik göstermiştir.

Huang ve ark., 2007 yılında CoMFA ve CoMSIA teknikleri ile yaptıkları 3D-QSAR çalışmasında sülfonamit türevlerinin CAII izoenzimine karşı inhibisyon aktivitelerini modellemişlerdir. Yazarlar CoMFA ve CoMSIA teknikleri hem ligand tabanlı (ligandların minumum enerji konformasyonları çakıştırılarak elde edilen alanlar) alanları hem de reseptör tabanlı (liganglar CAII aktif sitesi içine kenetleneyerek elde edilen bio-aktif konformasyonları çakıştırılarak elde edilen alanlar) alanları kullanılarak 3D-QSAR çalışmasını yürütmüşlerdir. Sonuçlar

karşılaştırıldığında reseptör tabanlı CoMFA modelinin en iyi istatistiki veriye sahip olduğu görülmüştür.

Weber ve ark., 2006 yılında yaptıkları çalışmada sülfonamit türevlerinin CAI, CAII, CAIV izoenzimlerine karşı ölçülen aktivite değerlerinin farklarını (pK_i-CAI-pK_i-CAII), (pK_i-CAI-pK_i-CAIV), (pK_i-CAII-pK_i-CAIV) bağımlı değişken olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada elde edilen QSAR modellerinin istatistiki parametreleri bizim bu çalışmada elde ettiğimiz QSAR modellerinin istatistik parametreleri ile kıyaslandığında bu çalışmada verilen modellerin daha iyi olduğu gözlenmektedir.

2.3. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibisyonunun Modellemesinde Moleküler Docking Çalışmaları

Literatürde sülfonamid türevleri ile yapılan birkaç adet moleküler docking çalışması mevcuttur. Bunlardan en kapsamlısı, Tuccinardi ve ark., 2007 yılında 40 adet sulfonamit türevi CAII kompleksi ile yürüttükleri çalışmadır. GOLD docking yazılımı ile yapılan bu çalışmada GoldScore ve ChemScore skorlama fonksiyonlarını kullanarak ligantlar CAII aktif sitesine yeniden docking yapıldığında %80' den fazlasının, x-ışını yapısı ile RMSD uyumuna bakıldığında 2,5 Å' dan küçük olduğu rapor edilmektedir. Bu sonuç ile; bu yazılım ve skorlama fonksiyonunun sülfonamit türevlerinin CAII aktif sitesine dock edildiğinde bağlanma pozunun tespit edilmesinde güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak aynı makalede çalışılan 40 adet ligant enzim komplekslerinin deneysel bağlanma enerjileri ile docking yoluyla elde edilen bağlanma enerjileri arasındaki korelasyonun $r^2<0,3$ olduğu belirtilmektedir. Bu durum skorlama fonksiyonlarının ligandların rölatif bağlanma enerjileri belirlemede güvenilir olmadığı sonucuna götürmektedir.

Weber ve ark., 2006 yılında moleküler docking ve 3D-QSAR (CoMFA, CoMSIA) tekniklerini kombine kullanarak sülfonamit türevlerinin CAII inhibisyonunun modellemesini yayınladılar. Bu çalışmada AutoDock 3 yazılımı kullanılarak 12 adet x-ışını yapısı var olan sülfonamit türevinin CAII kompleksinin docking çalışması yapıldı. Çalışma sonucu çalışılan 12 adet sülfonamit türevi için

AutoDock 3 yazılımı ile elde edilen bağlanma pozları ve bağlanma enerjilerini deneysel değerler ile uyuşmadığı görülmektedir.

Pinard ve ark., 2013' te yaptıkları çalışmasında sulfonamit türevi olan Dorzolamide ve Brinzolamide ilaçlarını CAII, CAVI, CAVII, CAIX, CAXII, CAXIII ve CAXIV izoenzimlerinin aktif sitelerine dock ettikleri görülmektedir. Bu çalışmada, yapısal olarak daha uzun bir kuyruk yapısına sahip olan Brinzolamide molekülünün birçok izoenzime karşı daha yüksek aktivite göstermesinin rasyonel açıklaması yapılmaya çalışılmıştır.

Fidan ve ark., 2015 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada phenylalanine sulfonamit türevlerini CAII aktif sitesine dock ettikleri rapor edilmektedir. Aynı çalışmada en iyi docking pozu üzerinden moleküler dinamik simülasyon çalışması da yürütülmüş ve ligandların aktif site içerisine bağlanmasının aminoasitler üzerine etkisi incelenmiştir.

Eldehna ve ark., 2017' de yaptıkları çalışmada indolin-2-one-based sulfonamidleri CAII aktif sitesine dock ettikleri rapor edilmektedir. Bu çalışmada yazarlar yapısal olarak kuyruk tarafı farklı beş adet ligantı CA II aktif sitesi içerisine dock etmişlerdir ve kuyruk bölgesindeki atomların farklılaşmasının aminoasitlerle etkileşimleri nasıl etkilediğini analiz etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

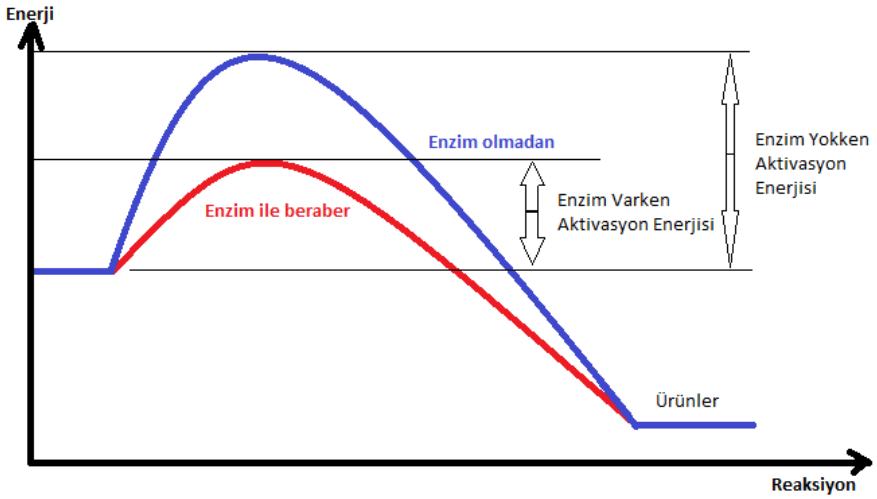
3.1. Giriş

Bu bölümde, Karbonik anhidraz izoenzimleri hakkında genel bilgiler verilecek olup, özellikle "neden karbonik anhidraz izoenzimleri çalışıldı?" ve "neden özellikle CAII ve CAIX izoenzimleri üzerinde yoğunlaşıldı?" sorularına cevap verilmeye çalışılmıştır. Ayrıca; karbonik anhidraz izoenzim inhibitörlerinden olan sülfonamit türevleri ile ilgili önemli noktalara değinilip, bu tez çalışmasında kullanılan QSAR yöntemi hakkında da açıklamalar yapılmıştır. QSAR yönteminin kuantum mekaniksel açıdan teorik kısmı açıklanırken, seçilen moleküler tanımlayıcılar ve kullanılan algoritmalara değinilmiştir.

3.2. Karbonik Anhidraz Enzimi ve Yapı Taşları

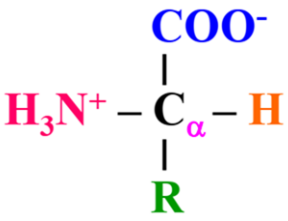
Enzim, yapısal olarak bir protein gibidir. Doğal olarak, sadece canlılarda bulunurlar. Biyolojik katalizör görevi üstlenirler. Yani; canlının yapısında meydana gelecek kimyasal reaksiyonların hızını ve enerjisini ayarlarlar. Reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek, tepkimelerin daha hızlı ve daha az enerji ile gerçekleşmesine olanak sağlarlar (Şekil 3.1).

Canlıyı oluşturan hücrenin içinde veya dışında oluşan tepkimelerin hızını ve enerjisini düzenlemektedirler. Enzimlerin etki ettikleri organik bileşiklere *substrat* adı verilir. Aynı enzim farklı hücre veya dokularda farklı görevleri yerine getirirken, üç boyutlu yapısı farklı, ancak görevleri aynı olan enzimlerde bulunmaktadır. Canlıda, farklı kimyasal ve fiziksel yapıda olmalarına karşı aynı reaksiyonun gerçekleşmesinde görev alan enzimlere izoenzim denir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).



Şekil 3.1. Bir kimyasal reaksiyonda enzimlerin rolü.

Enzimler genel olarak protein yapısında veya bir protein kısmı ihtiva ettiklerinden, proteinleri oluşturan aminoasitleri bilmek, enzimleri anlamakta kolaylık sağlayacaktır. Doğada 300 farklı aminoasit mevcut iken bunların sadece 20 tanesinin kombinasyon şeklinde bir araya gelmeleri proteini oluşturmaya yeterlidir. Aminoasitler genel olarak; bir amino grubu (NH_3^+), bir karboksil grubu (COO^-) ve bir yan zincirden meydana gelen organik bileşiklerdir (Şekil 3.2). Aminoasitler zincir şeklinde birbirine bir tür kovalent bağ yaparak tutunarak proteinleri oluştururlar. Bu zincirlerdeki bağlanma; bir önceki aminoasidin karboksil grubu ile bir sonraki aminoasidin amino grubu etkileşerek dışarıya bir su molekülü (H_2O) atmasıyla (pepdit bağı) oluşmaktadır. Bu şekilde birbirine bağlanan aminoasitler zincir misali proteinleri oluştururlar. Çizelge 3.1' de bu tez çalışmasında bahsi geçen bazı aminoasitlerin isimleri ve kısaltmaları görülmektedir.



Şekil 3.2. Temel aminoasit yapısı.

Çizelge 3.1. Aminoasitler ve gösterimi.

Aminoasit	Kısaltması	Aminoasit	Kısaltması
Glisin	GLY	Treonin	THR
Alanin	ALA	Triptofan	TRY
Prolin	PRO	Histidin	HIS
Valin	VAL	Glutamin	GLN
Lösin	LEU	Asparajin	ASN
İzolösin	ILE	Fenilalanin	PHE
Tirozin	TYR	Aspartat	ASP
Serin	SER	Glutamat	GLU
Sistein	CYS	Lizin	LYS
Metiyonin	MET	Arjinin	ARG

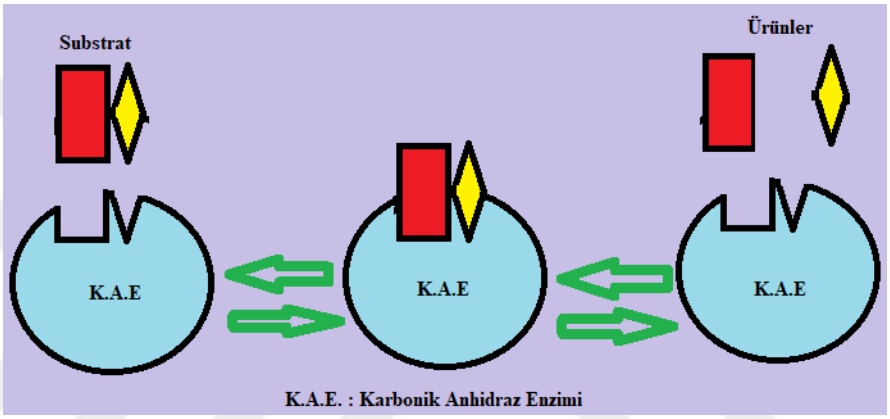
Vücudumuzun büyük çoğunluğu su olup, geriye kalan kuru yapının yaklaşık yarısını proteinler oluştururlar. Yunanca da "birinci sıradaki" anlamına gelen proteois kelimesinden türetilmiş olup, karbonhidratlar ve yağlar ile beraber vücudun temel besin ihtiyaçlarından olan proteinler hücre içinde ribozom vasıtasıyla aminoasitlerin uç uca eklenmesiyle oluştururlar. Proteinlerin elemental analizi yapıldığında genel olarak C (% 50-55), H (% 6-7), N (% 12-19), S (% 0,2-3) ve O (% 20-23) atomlarından oluşurlar ve azot (N) bulundurmaları açısından diğer temel besin maddelerinden ayrılırlar.

3.2.1. Karbonik anhidraz enzimi

1933 yılında Meldrum ve Roughton tarafından bulunan karbonik anhidraz (CA) enzimi doğada ki tüm canlılarda mevcut olan bir enzimdir. Yapısında aktif bölgede bulundurduğu Zn^{+2} metal iyonundan dolayı metaloenzim sınıfına dahil olmaktadır. İlk olarak eritrositlerde saflaştırılarak keşfedilmiştir. α-CA, β-CA, δ-CA, γCA ve ε-CA olmak üzere 5 alt sınıfa ayrılabilirler. Bunlarda α-CA memeli canlılarda bulunurken, kan ve dokularda, karbondioksitin (CO_2) hidratasyonu ve

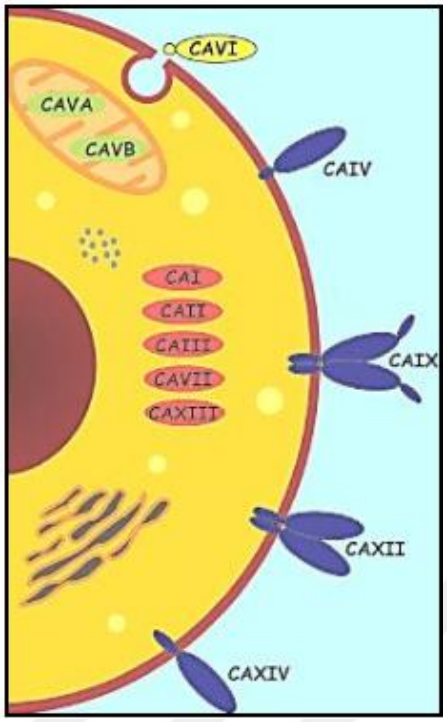
$$C0_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ \quad (3.1)$$

karbonik asidin (HCO_3^-) dehidratasyonunu katalize etmek temel çalışma fonksiyonu olup (Şekil 3.3), canlıda asit-baz dengesini ayarlamak ve dokularda karbondioksit taşınmasını sağlamak gibi farklı görevleri de mevcuttur. Tükürük bezleri, kaslar, beyin, pankreas, prostat gibi doku ve organlarda CA tespit edilerek incelenmiştir. Aynı zamanda bazı CA izoenzimlerinin tümör oluşumu gibi patolojik durumlarda da görev aldıkları bilindiği gibi, balıkların solungaçlarında, kabuklu canlılarda kabuk yapımında, alglerde ve bitki hücrelerinde bu enzimin değişik rolleri olduğu da saptanmıştır (Supuran ve Winum, 2009).



Şekil 3.3. Karbonik anhidraz enziminin çalışma mekanizması.

α-Karbonik anhidraz enzimleri 15 farklı izoenzim olarak sınıflandırılmıştır. CAI, CAII, CAIII, CAIV, CAVA, CAVB, CAVI, CAVII, CAIX, CAXII, CAXIII ve CAXIV izoenzimleri katalitik aktiviteye sahipken, CAVIII, CAX ve CAXI izoenzimlerinde katalitik aktivite saptanmamıştır. Hücre içerisinde CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAVIII, CAX, CAXI ve CAXII sitoplâzmada yer alırken CAIV, CAIX, CAXII ve CAXIV hücre zarında, CAVA ve CAVB mitokondride, CAVI ise tükürük bezi ve meme bezi salgısında bulunmaktadır. Şekil 3.4' te CA izoenzimlerinin hücre içerisinde dağılımları şematik olarak verilmiştir (Alterio ve ark., 2012).



Şekil 3.4. CA izoenzimlerinin hücre içi yerleşmeleri.

Bu tez çalışmasında özellikle CAII ve CAIX izoenzimleri üzerinde hesaplamalar yapılmıştır. Yukarıda da bahsedildiği gibi canlı hayatının devamı için birçok görev üstlenen CA izoenzimlerinden olan CAII ve CAIX özelinde aşağıda verildiği üzere önemi büyüktür.

CAII;

- İnsanlarda en fazla tespit edilmiş izoenzimdir.
- Kemiklerde, retinal müller hücreleri, böbrekler, beyinde, tükrük bezleri, eritrositleri ve plateletleri içeren hemen hemen tüm doku ve organlarda geniş dağılım gösterirler.
- Eritrositlerde ve akciğerlerde CO_2 transferini aktif ederler.
- Gözün optik sinirlerine hasar veren basıncı düzenlerler.
- Bu izoenzim H^+ üretimine ve asit-baz homeostazisine, pH dengesine katkı yapar (Imtaiyaz, 2013).

CAIX;

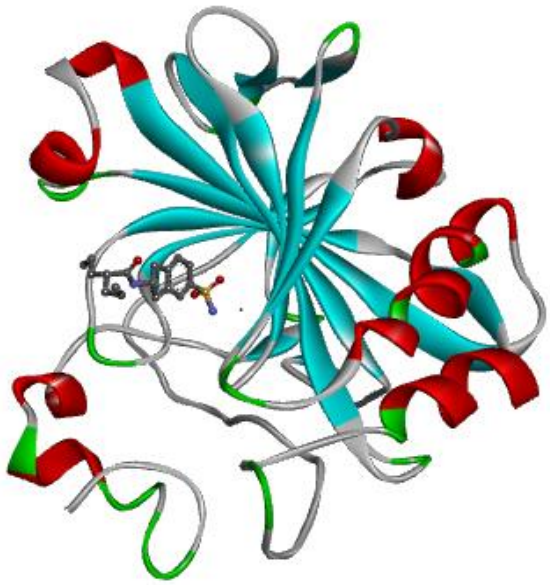
- Tümör ile ilgili olduğu saptanan ve tümör oluşumu ve yayılmasında görev aldığı bilinen ilk CA izoenzimidir (Thiry, 2006).

- Hücre yüzeyinde aktivite göstermesi klorür-anyon değiştiricisi olarak hücre membranında yer alması CAIX' un HCO_3 anyonlarının tekrar stoplazmaya taşınmasında önemli bir rol üstlenmektedir.

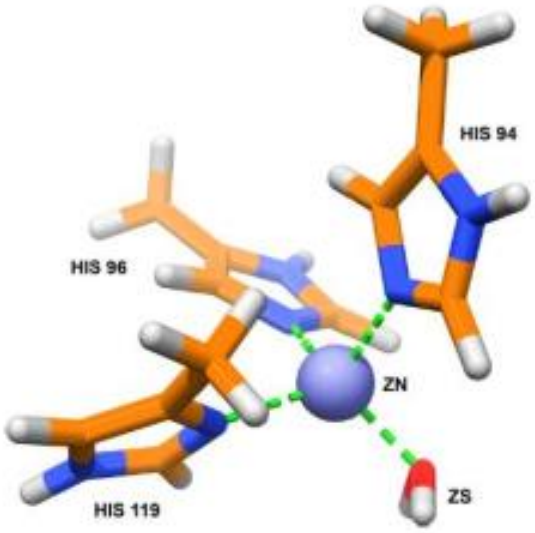
3.2.2. Karbonik anhidraz enziminin yapısı

CA'nın farklı izoenzimlerinin seçici inhibisyonu farklı hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçların geliştirilmesinde hedef enzim olarak kullanılmaktadır. Bu enzimin aktif bölgesinde çinko (Zn^{+2}) atomu vardır. Zn atomu enzimin inhibisyonu esnasında genellikle inhibitör ile yarı kovalent karakterli tetrahedral bir bağ yapısı gerçekleştirirler (Boyluğ, 2016). Şekil 3.5' te Protein Data Bankasından (PDB) 2QO8 kodu ile verilen x-ışını altında alınmış görüntüsünün DiscoveryStudio (BioVia-2016) yazılımı ile düzenlenmiş CAII izoenziminin üç boyutlu yapısı verilmektedir. Yapıda bu tez çalışmasında da incelenecek olan sülfonamit türevlerinden biri **8a** kodlu ligantı ile birlikte görüntülenmiştir.

Bir enzimin asıl görev alanı aktif site (alanı) olarak tabir edilen ve inhibitörün gelip tutunduğu oyuktur. Bu bağlamda; CA enzimlerinin aktif alanı x-ray kristalografi yöntemleri ile görüntülendiklerinde, Şekil 3.6' da ki gibi merkezde bir Zn atomuna bağlı 3 Histidin aminoasit (HİS94, HİS96 ve HİS119) ve bir su molekülü ile bağ halinde olduğu görülür. Zn atomu aktif alanın 15 Å derinliğinde konumlanmıştır. Zn^{+2} iyonu üç hisitidin rezidüsü ile tetrahedral yapı olacak şekilde yer tutmuşlardır (Bernadat, 2013).



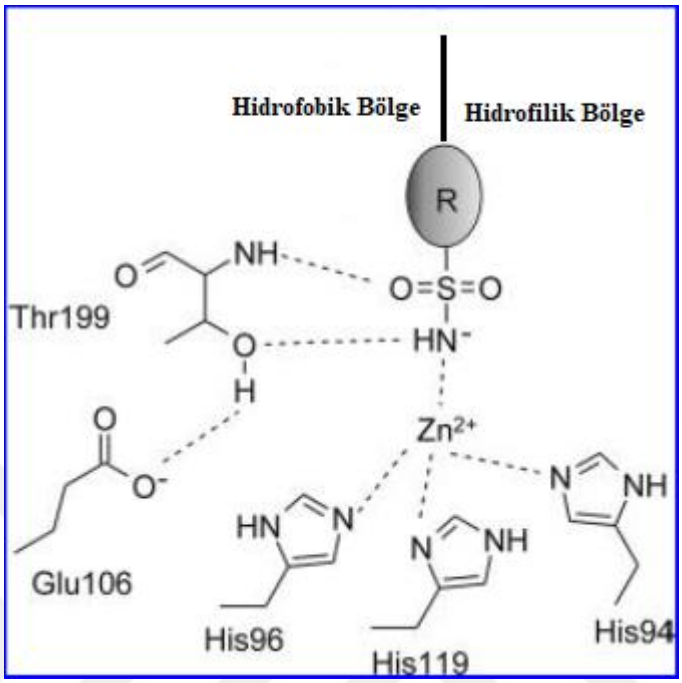
Şekil 3.5. CAII-ligand (8a) kompleksinin deneysel yapısı.



Şekil 3.6. CA enziminin aktif alanı.

CA II aktif sitesi içerisinde yer alan sulfonamit türevi inhibitörler genel olarak SO_2N_2 grubundaki H atomunun (protonun) ayrılması ile anyon formunda azot üzerinden Zn katyonu ile bağ yapar. Bununla beraber, gruptaki kalan H atomu THR199'un yan zincirindeki O atomuna hidrojen bağı donörü olurken, gruptaki O

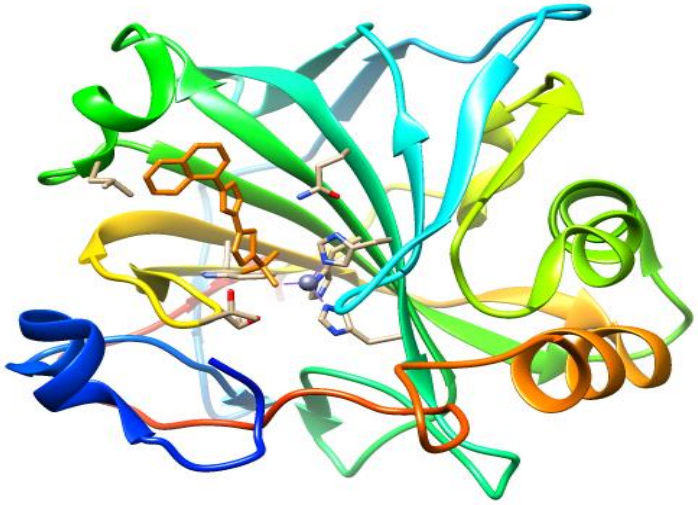
atomlarından biriside THR199'un yan zincirindeki N' e bağlı hidrojen atomuna hidrojen bağı akseptörü olarak işlev yapar (Şekil 3.7, Alterio ve ark., 2012).



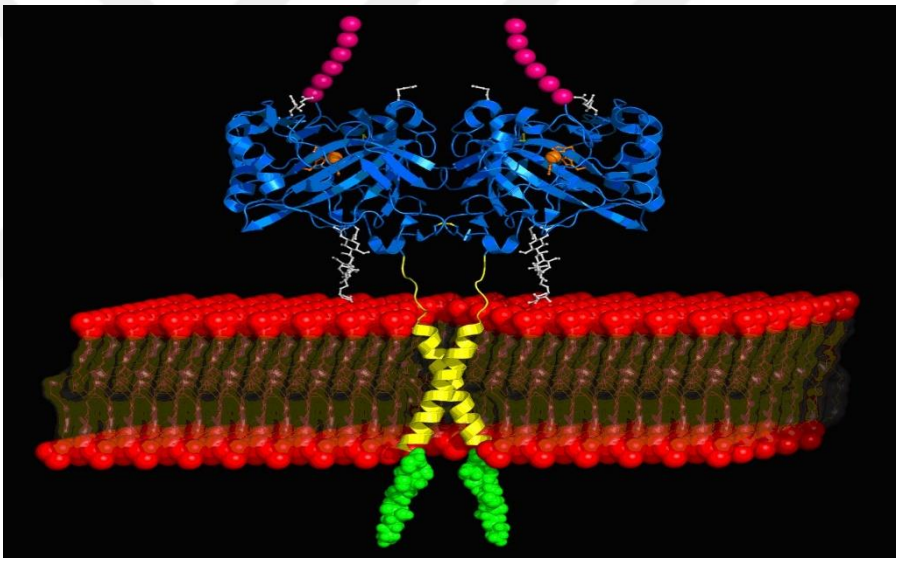
Şekil 3.7. CAII aktif sitesi içerisindeki sulfonamitlerin genel bağlanma şekli.

Bu tez çalışmasında incelenen diğer bir izoenzim olan CAIX' un PDB' de çok az sayıda ligand kompleksinin yapısı bulunmaktadır. CAIX' un CAII' ye benzerliğinin sergilenmesi acısından CAIX' un bir sülfonamit türevi ile olan kompleksinin üç boyutlu yapısı Şekil 3.8' de gösterilmektedir. Şekil 3.8; PDB'de 5FL5 kodla bulunan CAIX sülfonamit kompleksinin tetramer yapısından UCSF Cimera yazılımı (Petterson ve ark., 2004) ile elde edilmiştir.

CA farklı izoenzimlerinin aminoasit sekansları büyük oranda benzerlik gösterir. Monomerik CAIX 422 aminoasitten oluşur. CAIX yapı olarak, bir sinyal peptit, proteoglikan bölge, CA katalitik aktif bölgesi, transmembran bölgesi ve hücre içi intrastoplazmik kuyruk bölümlerinden oluşur. CAIX izoenziminin bahsedilen tüm bu bölümlerini gösteren bir model Şekil 3.9' da gösterilmektedir (Alterio ve ark., 2009)



Şekil 3.8. CAIX üç boyutlu yapısı (PDB kod:5FL5).



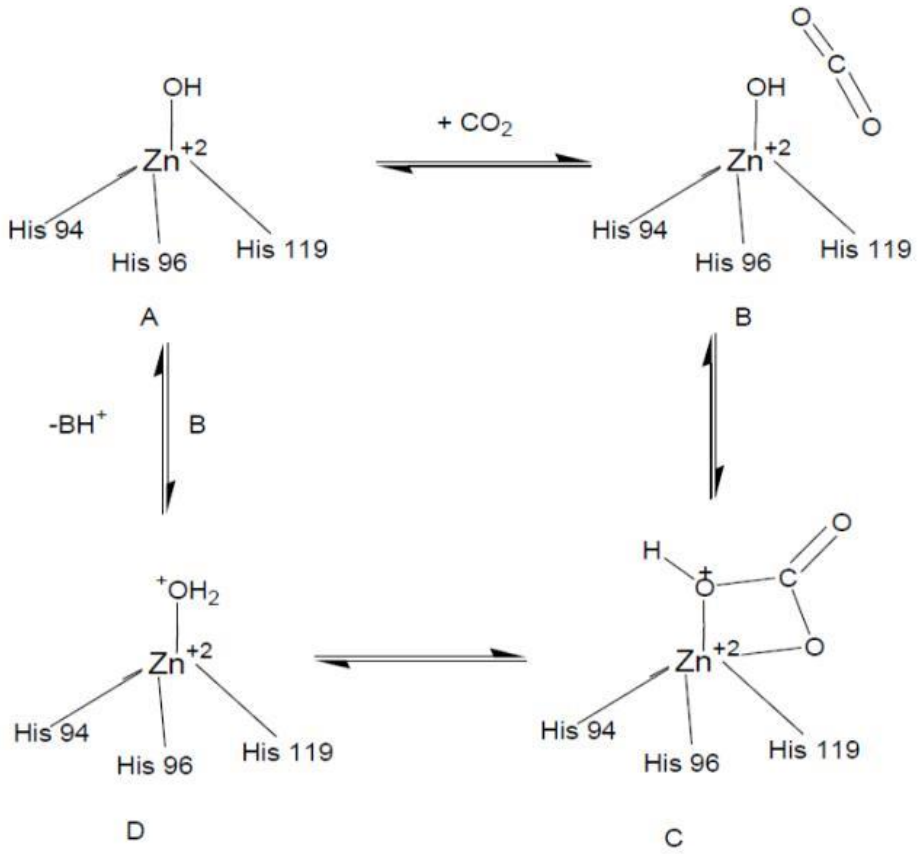
Şekil 3.9. CAIX izoenziminin hücre zarına bağlı modeli.

3.3.Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

CA'nın tüm izoenzimlerinin aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir su/hidroksil grubu mevcuttur. Aktif bölgenin civarındaki aminoasitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir. Zn^{+2}'ye bağlı H_2O, Glu-106 rezidüsünün (CAII' nin sekansına göre numaralandırma) karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan THR109 rezidüsünün hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır (Özensoy, 2006). Bu etkileşimler, Zn^{+2}'e bağlı H_2O

molekülünün nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO_2 molekülüne doğru hareket etmektedir (Supuran, 2009).

Oluşan zincirleme reaksiyon Şekil 3.10' da gösterilmektedir. Zn^{+2} iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif bir formu oluşur (Şekil 3.10-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır (Şekil 3.10-B). Bu da, Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 3.10-C). Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunu sonucunda, Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da şekil 3.10-D'de görüldüğü gibi, enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams ve ark., 1998).



Şekil 3.10. CA izoenzimlerinin CO_2 hidrasyonu katalitik mekanizması.

3.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörü Sulfonamitler

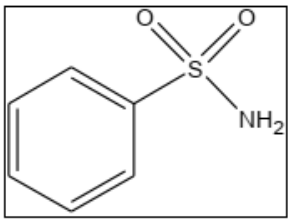
Sülfonamit grubu içeren bileşikler en eski ve en çok çalışılan Karbonik Anhidraz izoenzimleri inhibitörleridir (Alterio ve ark., 2012). Temel yapısı $R\text{-}SO_2H_2$

şeklindedir. Sülfonamitlerin CA inhibitör özelliğinin olduğu ilk defa 1940 yılında (Keilin ve Mann, 1940) saptanmıştır.

Sülfonamitler antibakteriyellerin en eski grubudur. İlk kullanım alanı boya endüstrisinin bir artığı olan prontosildir. Genelde sindirim sisteminden emilimleri iyidir. Dokulara iyi dağılırlar ve genellikle plazma proteinlerine %50-75 oranında bağlanırlar. Sülfonamidlerin günümüzde diüretik, antiglokom, antiepileptik ve yükseklik hastalığında tedavi ajanı olarak klinik kullanımı vardır (Öz, 2015).

Günümüze kadar en çok üzerinde çalışılan sulfonamit grubu içeren bileşikler arasında basit benzene-sulfonamit ile beraber, halojen sapsüte benzene-sulfonamitler (Carta ve ark., 2009), üreido ve thioureido içeren benzene-sulfonamitler (Pacchiano ve ark., 2010), katyonik benzene-sulfonamitler (Supuran ve ark., 1998), benzene-disulfonamitler (Abbate ve ark., 2004), şeker içeren sulfonamitler (Wilkinson ve ark.,. 2006), alifatik sulfonamitler (Hakansson ve Liljas, 1994), tiyofen, tiadiazol, tiyadiazoliniçeren sulfonamitler (Miller ve ark., 1950) ve diğer hetero-halka sistemi içeren sulfonamitler yer almaktadır.

Benzensülfonamidler: Geçmişten günümüze kadar yapılan araştırmalarda çok fazla aromatik sülfonamid sentezlenmiş olup üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Yapılan çoğu araştırma CA inhibisyonunu en iyi ve en hızlı şekilde yapan sülfonamitleri bulmak üzerinedir. Bilinen en genel ve en iyi inhibisyonu sağlayan inhibitörler aromatik hidrokarbonların türevleri olan benzensülfonamidlerdir ve üzerinde çalışılan tüm yapılarda benzensülfonamid parçasının, aktif enzim bölgesi ile etkileşim mekanizması benzerdir. (Alterio ve ark., 2012). Şekil 3.11' de genel kimyasal yapıları verilmiştir.

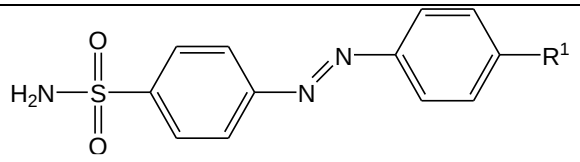
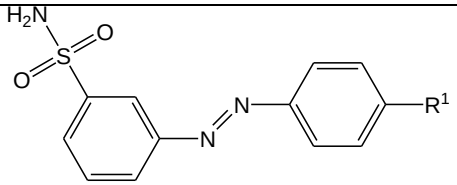
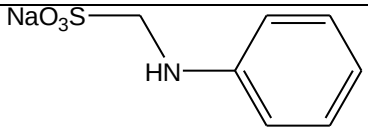
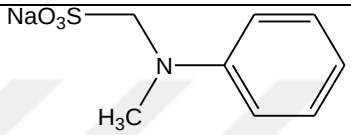
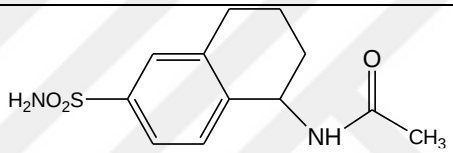
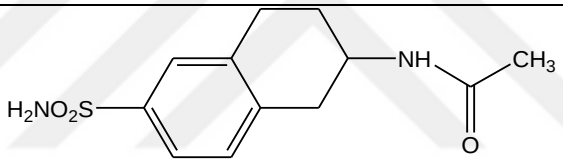
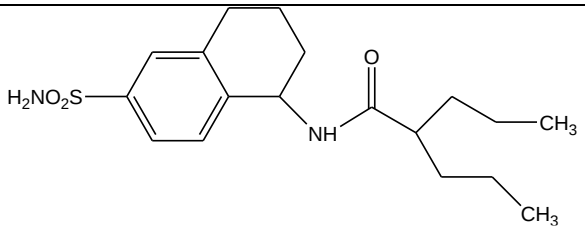
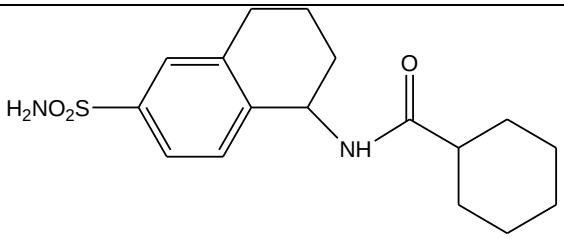
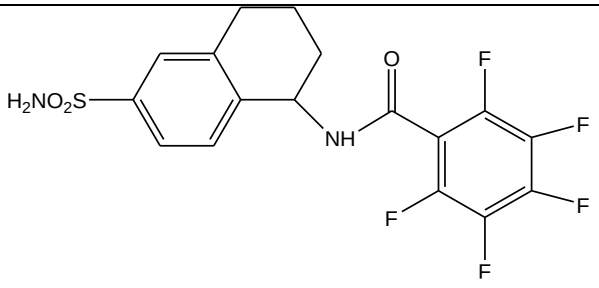


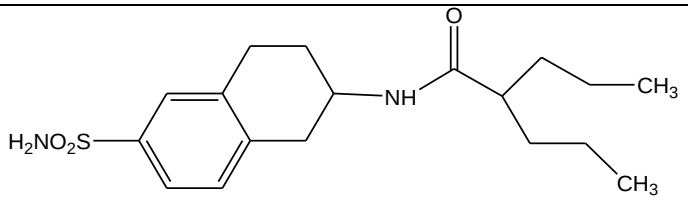
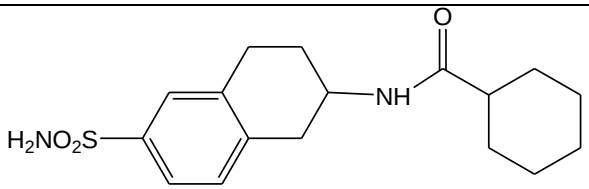
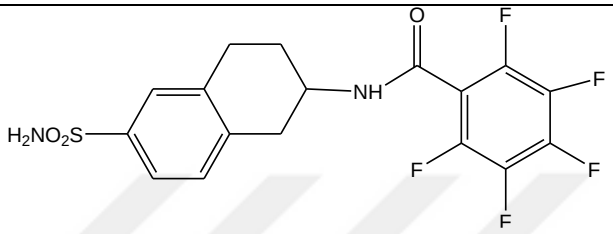
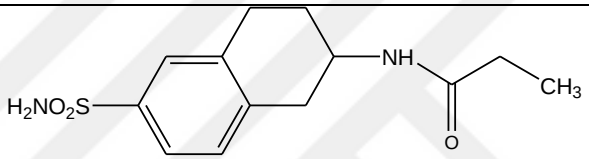
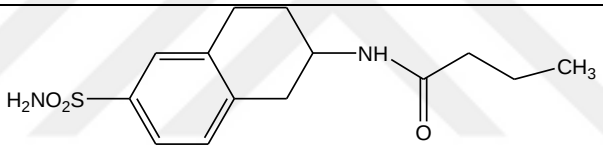
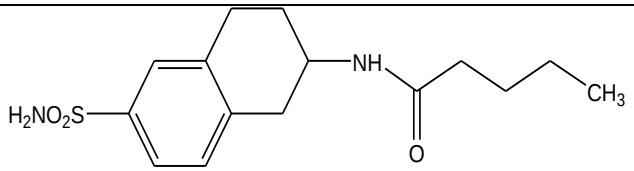
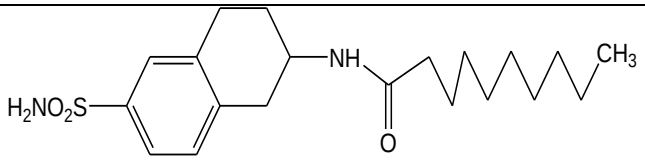
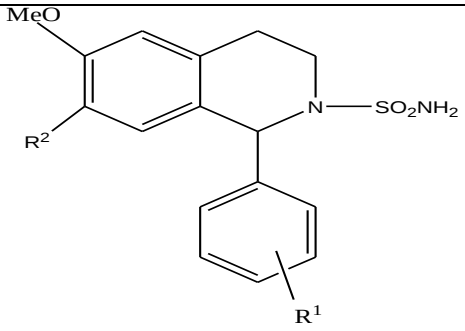
Şekil 3.11. Benzensülfonamidlerin genel yapısı.

Bu tez çalışmasında çoğunluğunu benzen indan izokinolin halka sistemleri içeren üç farklı kaynaktan (Carta ve ark., 2009, Thiry ve ark., 2006 ve Gitto ve ark., 2011) derlediğimiz Şekil 3.12' de gösterilen sülfonamitler ile QSAR hesaplamaları ve moleküler docking (kenetlenme) çalışması yürütülmüştür.

Çizelge 3.2' de bu tez çalışmasında kullanılan sülfonamit türevlerinin biyolojik aktivite değerleri verilmektedir. 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2d, 3, 4 kodlu ligantlar Carta ve ark., 2009 çalışmasından, 5, 6, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g kodlu ligantlar Thiry ve ark., 2006 çalışmasından ve 9 ile başlayan tüm ligantlar Gitto ve ark., 2011 çalışmasından seçilmiştir.

Çizelge 3.2' de verilen aktivite değerleri; makalelerden alınan aktivite değerlerinin mikro-mol olanları nano-mol'a çevrilerek ve sonra $log(1/K_i)$ alınmış halleridir. Moleküllerin izoenzim seçiciliğini CAII ve CAIX olan aktivitelerinin oranı RpK_i ve farkı olarak ΔpK_i tanımlanmıştır. Docking çalışmasına Çizelge 3.2' de bulunan moleküllerden **7b**, **7c**, **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** ve **8f** sülfonamit türevleri alınmıştır. Bu moleküllerin özellikle seçilmesinin sebebi hem CAII hem de CAIX' a karşı ölçülmüş aktivite verilerinin ciddi oranda farklılık sergiliyor olmasıdır.

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7a	
7b	
7c	

8a	
8b	
8c	
8d	
8e	
8f	
8g	
9	

Şekil 3.12. 43 adet Karbonik anhidraz inhibitörü sülfonamit türevinin moleküler yapısı.

Çizelge 3.2. 43 adet Karbonik anhidraz inhibitörü sülfonamit türevinin deneysel ölçülmüş inhibisyon katsayısı (pK_i) verileri

Comp. No	R^1	R^2	Deneysel pKi-CAII	Deneysel pKi-CAIX	Deneysel RpKi-	Deneysel ΔpKi
1a	OH		6,18	8,19	0,75	-2,02
1b	NH_2		6,97	8,22	0,85	-1,25
1c	NHMe		7,03	8,31	0,85	-1,28
1d	NMe_2		6,2	8,18	0,76	-1,99
1e	$NHCH_2SO_3Na$		6,98	8,27	0,84	-1,29
1f	$N(Me)CH_2SO_3Na$		6,98	8,46	0,83	-1,47
2a	OH		6,97	8,21	0,85	-1,24
2b	NH_2		7,06	8,23	0,86	-1,17
2d	NMe_2		6,98	8,19	0,85	-1,22
3			4,23	5,29	0,8	-1,06
4			4,2	5,23	0,8	-1,04
5			6,73	6,71	1	-
6			-	6,54	1,38	2,46
7a			8,92	7,43	1,2	1,49
7b			7,49	6,97	1,08	0,53
7c			6,31	8,46	0,75	-2,15
8a			9,05	6,55	1,38	2,5
8b			6,93	7,52	0,92	-0,59
8c			8,17	7,48	1,09	0,69
8d			8	5,7	1,4	2,3
8e			7,34	5,63	1,3	1,7
8f			8,12	-	-	-0,34
8g			6,89	8,43	0,82	-1,54
9a	H	MeO	4,8	5,07	0,95	-0,27
9b	4’-Br	MeO	4,97	5,09	0,98	-0,12
9c	4’-Cl	MeO	5,28	5,12	1,03	0,15
9d	4’-CN	MeO	5,37	5,3	1,01	0,07
9e	4’-F	MeO	4,82	5,25	0,92	-0,43
9f	4’-Me	MeO	4,97	5,17	0,96	-0,2

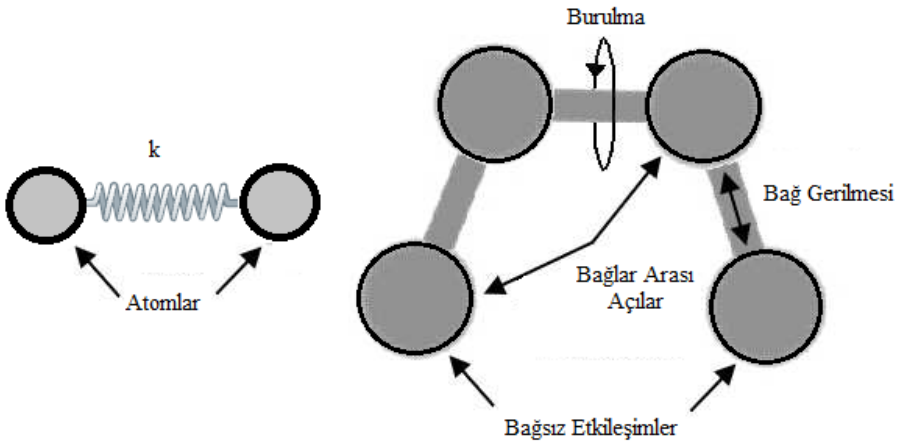
Çizelge 3.2. **(devamı)**

Comp. No	R^1	R^2	Deneysel pKi-CAII	Deneysel pKi-CAIX	Deneysel RpKi-	Deneysel ΔpKi
9g	3'-NO_2	MeO	5,42	5,19	1,04	0,23
9h	4'-NO_2	MeO	6,22	6,32	0,98	-0,1
9i	3'-NH_2	MeO	5,03	5,09	0,99	-0,06
9j	4'-NH_2	MeO	4,95	5,17	0,96	-0,22
9a*	H	H	6,37	7,11	0,9	-0,73
9b*	4'-Br	H	5,38	7,22	0,75	-1,84
9c*	4'-Cl	H	6,98	7,66	0,91	-0,68
9d*	4'-CN	H	7,04	8,15	0,86	-1,11
9e*	4'-F	H	6,32	7,51	0,84	-1,19
9f*	4'-Me	H	7,06	8,12	0,87	-1,07
9g*	3'-NO_2	H	6,53	7,8	0,84	-1,26
9h*	4'-NO_2	H	6,49	8,3	0,78	-1,81
9i*	3'-NH_2	H	7	7,74	0,9	-0,74
9j*	4'-NH_2	H	6,65	7,92	0,84	-1,27

3.5. Fiziksel Altyapı

3.5.1. Moleküler mekanik yöntemler (MM)

Mekanik yöntem; molekülleri, atomları birer topa ve bağları yaylara benzetmek suretiyle, sistemi üç boyutlu tasarlayarak incelemektedir (Şekil 3.13). Bu mantaliteyle sistemi bir arada tutan yayların (atomlar arası bağlar) uzunlukları ve aralarında ki açılar ile bu yayları germek veya bükmek için gerekli enerjiyi hesaplayabiliyorsak (Hooke Yasası), sistemin toplam enerjisini de kolay bir şekilde hesaplayabiliriz. Bu yöntemde temel anlamda elektron hareketleri ihmal edilerek çekirdek hareketlerine odaklanılır. Yani sistemin enerjisi çekirdek hareketine bağlıdır.



Şekil 3.13. Moleküler Mekanik Yöntem Benzetimi.

MM yöntemi kuantum mekaniksel olmadığı için sistemin toplam enerjisi olarak hamiltonyen veya dalga fonksiyonu gibi terimlerden bahsedilemez. Bunun yerine sistemin toplam enerjisi olarak mekaniksel bir ifade olan *kuvvet alanı* terimi ortaya çıkar. Her atomun etrafında onu saran bir kuvvet alanı vardır. Herhangi iki atomun etkileşimi bu kuvvet alanları hesaplanarak belirlenebilir. AMBER, CHARM, HYPERCHEM vb., bir çok MM tabanlı kuvvet alanı hesaplama program mevcuttur. Bu programlarda sistemin toplam enerjisi genel bir ifadeyle;

$$E^{Toplam} = \sum_{bağlar} K_r(r - r_0)^2 + \sum_{açılar} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedral} \frac{V_n}{2}[1 + cos(n\emptyset - \gamma)] + \sum_{i<j}\left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}}\right] \quad (3.1)$$

şeklinde verilir. Denklemde ki ilk terim; kovalent bağ ile bağlı atomları ideal bir harmonik yay sistemi gibi ele alarak, denge noktasından uzaklığa bağlı olarak enerjiyi hesaplar. Ikinci terim; yine denge noktasından itibaren değişen açılara göre ve üçüncü terim; sistemdeki bağların kıvrılma (dihedral açılar) açılarına göre enerjiyi hesaplar. Son terim ise; van der Waals bağları ve elektrostatik açıdan tüm atom çiftleri arasındaki bağlı olmayan enerjiyi temsil etmektedir (Cornell ve ark., 1995).

Bu yöntemle büyük moleküllerin geometri optimizasyonları kısa sürede yapılabilmektedir (Karabulut, 2011). Moleküler mekanik yönteminin en önemli dezavantajı moleküler sistemin elektronik yapısı hakkında bilgi verememektedir.

3.5.2. Elektronik yapı yöntemleri

Bir atom veya molekülün elektronik özellikleri hakkında bilgi edinmek istediğimizde Kuantum mekaniği devreye girer ve bu noktada Schrödinger dalga denkleminden söz etmemiz gerekir. Zamandan bağımsız Schrödinger Dalga Denklemi, ψ (*r, R*), molekülün dalga fonksiyonu, *r* elektronun konumu, *e* elektron yükü, *m* elektron kütlesi, *R* çekirdeğin konumunu, M_I ise *I* çekirdeğinin kütlesi ve son olarak *Z*' ler *I* ve *J* çekirdeklerinin atom numarası olarak üzere denklem 3.2' de verilmiştir. Bu denklem atomik birimlerde ifade edilmek istenirse denklem 3.3 meydana gelir (Foresman ve Frisch, 1996).

$$H\psi(r,R)=\sum_{I=1}^{N}-\frac{\hbar^2}{2M_I}\nabla_I^2\psi(r,R)-\frac{\hbar^2}{2m}\sum_{i=1}^{n}\nabla_i^2\psi(r,R)-$$

$$\sum_{i=1}^{n}\sum_{I=1}^{N}\frac{e^2Z_I}{r_{iI}}\psi(r,R)+\sum_{i=1}^{n}\sum_{j<i}\frac{e^2}{r_{ij}}\psi(r,R)+\sum_{I=1}^{N}\frac{Z_IZ_Je^2}{R_{IJ}}\psi(r,R) \qquad (3.2)$$

$$H\psi(r,R)=\sum_{I=1}^{N}-\frac{1}{2M_I}\nabla_I^2\psi(r,R)-\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n}\nabla_i^2\psi(r,R)-$$

$$\sum_{i=1}^{n}\sum_{I=1}^{N}\frac{Z_I}{r_{iI}}\psi(r,R)+\sum_{i=1}^{n}\sum_{j<i}\frac{1}{r_{ij}}\psi(r,R)+\sum_{I=1}^{N}\frac{Z_IZ_J}{R_{IJ}}\psi(r,R) \qquad (3.3)$$

Denklem 3.3' de eşitliğin sağında ki ilk iki ifade sırasıyla çekirdeklerin ve elektronların kinetik enerjisini tanımlamaktadır. Üçüncü terim elektron-çekirdek etkileşim enerjisini, dördüncü terimi elektron-elektron etkileşim enerjisini, son terimi ise çekirdek-çekirdek etkileşim enerjisi olarak açıklanmaktadır (Güler, 2005). Schrödinger denklemini bu durumda analitik olarak çözmek mümkün değildir. Bu

nedenle, literatürde bazı yaklaşım metodları uygulanmaktadır. Schrödinger dalga denkleminin çözümünde birçok yaklaşım metodu geliştirilmiş olup, bu yaklaşımlardan temel kabul edilen metodlarına kısaca göz atalım;

Born-Oppenheimer Yaklaşıklığı: 1927 yılında önerilen metod; elektron ve çekirdek hareketlerini birbirinden ayırarak inceleme üzerine kurulmuştur. Atom temelde çekirdek ve elektronlardan meydana gelmektedir. Moleküler bir sistemin toplam potansiyel enerjisi; elektron-elektron, elektron-çekirdek ve çekirdek-çekirdek etkileşimlerine bağlı potansiyel enerjiler olmak üzere denklem 3.4 ile verilir.

$$V = V_{ee} + V_{eç} + V_{çç} \tag{3.4}$$

Aynı şekilde sürekli hareket halinde bulunan elektronlar ve çekirdeklerin kinetik enerjileri de toplam enerjiye eklenirse, sistemin toplam hamiltonyeni denklem 3.5' te gösterildiği gibi yazılabilir.

$$H = T_e + T_ç + V_{ee} + V_{eç} + V_{çç} \tag{3.5}$$

Çekirdek kütlesi elektron kütlesinden çok büyüktür. Bu nedenle çekirdek elektronlara göre daha yavaş hareket ederken, elektronlar çekirdeğin hareketine göre anında tepki vererek konum alırlar. Yani elektron dağılımı çekirdeğin hareketine bağlıdır. Bu olay hızdan bağımsız olup, atom çekirdeği elektronlara kıyasla durağanmış gibi görünür. Başka bir ifade ile elektronların hareketi sabit bir çakirdek alanında gerçekleşiyor gibi görünür. İşte bu yaklaşım metodu; moleküller uyarılmış durumda değilken, elektronik enerji seviyeleri çok yakın olmadığı durumlarda ve atom çekirdeğinin bu ağır hareketinden dolayı, atom çekirdekleri arasında ki uzaklığın sabit kaldığını kabul eder (Born ve Oppenheimer, 1954). Bu yaklaşıklık ile denklem 3.5, denklem 3.6' ya dönüşür.

$$H = T_e + V_{ee} + V_{eç} \tag{3.6}$$

Bu yaklaşıklıkta sistemdeki çeirdekler sabit tutularak elde edilen schrödinger denklemi çözülür. Bunun sonucu olarak elektronik hareketlere dair dalga fonksiyonları elde edilir. Dalga fonksiyonu bulunduktan sonra çekirdekler arasındaki mesafe tekrar tekrar değiştirilerek enerji hesaplanır ve en kararlı durum tespit edilir (McQuarrie, 1983). Bu teoride molekül ile ilgili olarak dalga fonksiyonu çekirdek ve elektronlar için bulunan dalga fonksiyonunun çarpımı şeklindedir.

$$\varphi = \varphi_{elektron} \cdot \varphi_{çekirdek} \tag{3.7}$$

Varyasyon yaklaşımı: Sistemin en düşük enerji özdeğerlerini yani, taban durum enerjisi için veya bazı uyarılmış durumlara karşılık geliştirilen bir yaklaşıklıktır. Temelde bir deneme dalgası seçer ve bu deneme dalgası üzerinden enerjinin beklenen değerini mümkün olan en düşük durumlarda tespit etmeyi amaçlar. Çoklu elektronların bağlanmaya katkıda bulunması, en küçük ve basit moleküllerde bile kuantumsal olarak Schrödinger denkleminin çözümünü oldukça zor hale getirir. Ψ_e dalga fonksiyonu ile tanımlanan bir kuantum mekaniksel sistemde (E_0 taban enerji durumu olmak üzere) enerjinin beklenen değeri aşağıdaki gibi verilir.

$$E = \frac{\langle \Psi_e | H_e | \Psi_e \rangle}{\langle \Psi_e | \Psi_e \rangle} \geq E_0 \tag{3.8}$$

Schrödinger Dalga denkleinin özelliği gereği Ψ dalga fonksiyonu yerine yaklaşık bir dalga fonksiyonu seçilirse hesaplanan enerji sistemin taban durum enerjisinden her zaman büyük çıkacaktır. Bu yaklaşık dalga fonksiyonu değiştirilerek sistemin enerji durumunun sıfıra en yakın hali, seçilen yaklaşık dalga fonksiyonunun en doğru olma durumuna karşılık gelir. Kuantum mekaniksel sistemler için taban durumun eerjisinin tespitinde bu şekilde yapılan yaklaşıma varyasyon yaklaşımı denir (Haken ve Wolf, 2004).

Moleküler Orbital Teori: Bu teoriye göre atomlar etkileşerek bir molekül oluşturduklarında elektronların dizilimi tümüyle değişir. Başka bir ifadeyle elektronlar, artık atoma değilde moleküle bağlı olarak düşünülebilir ve moleküler

orbitallerde hareket ederler. Bir molekülü oluşturan atomların elektron orbital sayısının toplamı moleküler orbital sayısını verir. Eğer iki atomun, atomik orbital enerji seviyeleri birbirine çok yakın ise moleküler orbitaller oluşur. Elektronların moleküler orbitallere yerleşimi, atomik orbitallerde olduğu gibi Pauli ve Hund ilkeri gereğince meydana gelir. Bu nedenlerden dolayı molekül orbital teori der ki; molekülün toplam dalga fonksiyonu, moleküler orbital dalga fonksiyonlarının bir araya gelmesi sonucunda oluşur. Atomik orbitallerin lineer kombinasyonu şeklinde oluşan moleküler orbitaller aşağıdaki denklem ile ifade edilir (Licker, 2004). Denklemde Ψ_j; moleküler orbitaller, c_{ij}; bir katsayı, Ω_i; atomik orbitalleri ifade etmektedir.

$$\Psi_j = \sum_{i=1}^{n} c_{ij}\Omega_i \tag{3.9}$$

Yarı Deneysel (Semi-Empirik) Yöntemler: Aslında MM ve *ab inito* yöntemleri arasında kendisine yer bulan, kuantum mekaniği kullanan bir yöntemdir. Schrödinger dalga denklemini çözmeye çalışan *ab inito* yöntemler ile atom sayısı fazla olan moleküller için çözümleme yapılırken, çok fazla hesaplamanın yapılması ve buna bağlı olarak çok büyük bilgisayar olanağı gerektirmektedir. Tam da bu nokta da devreye giren yarı deneysel yöntemler hesapları kolaylaştırmak için Schrödinger denkleminin bazı kısımlarını deneysel veriler ile tamamlayarak hesaplama zamanının kısalmasına olanak sağlar.

Bu yöntemde, söz konusu molekül ile ilgili hesaplamalar yapılırken *ab initio* yöntemlerle uzun hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, program kütüphanesinden hazır veri olarak çağrılır. Buna ilaveten doğruluğu deneysel verilerden gelen bazı bilgiler hesaplamaya bu kütüphanelerden dahil edilerek hesaplama süresi kısaltılmış olur. Hem küçük hem de büyük moleküller de hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edebilmektedir. Yarı deneysel yöntemler moleküler mekanik yöntemlere göre yavaş olmasına karşın *ab inito* yöntemlerine göre 1000 kata kadar hızlı olabilmektedir. İyi tanımlanmış molekül sistemleri için çok güvenilir sonuçlar veren yöntem; örneğin bağsız etkileşimler gibi parametrizasyonu zor olan durumlarda

güvenilir olduğu söylenemez. Genellikle büyük sistemlerde ab initio veya YFT (Yoğunluk Fonksiyonel Teori) için geometrik optimizasyonları oluşturmada tercih edilmektedir. En çok bilinen yarı deneysel yöntemler arasında AM1, PM3, PM6 ve PM7 sayılabilir (Polat, 2015).

Ab inito yöntemler: "en başından beri" anlamına gelen latince kökenli bir tümcedir. Herhangi bir moleküler ve atomik sistemde; başlangıçta hiç deneysel verinin olmadığı ve aynı zamanda başlangıçta atom ve moleküllerin konumları bilinmeksizin sadece sistemin toplam elektron ve çekirdek sayısı ile Schrödinger dalga denklemini çözmek üzerine kurulu bir yöntemdir.

Bu yöntemin sistemin toplam elektron ve çekirdek sayısına bağlı olması, uzun hesaplama zamanlarına ihtiyacı zorunlu kılar. Başka bir deyişle; sistemde ki elektron sayısı ile hesaplama zamanı doğru orantılıdır (Karabulut, 2011). *Ab inito* metodu kullanılarak elde edilen sonuçlarda doğruluk derecesi yüksek olmasına karşı, çok atomlu sistemlerde hem hesaplama süresinin uzaması hem de Schrödinger eşitliğinin çözümün zorlaşması bu yöntemin eksi yönleridir. Bu nedenlerden dolayı bazı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur. Hartree-Fock teori (HF) ve Yoğunluk Fonksiyonel Teori (Density Functional Theory, YFT) olmak üzere; temel de iki tür *ab inito* yaklaşıklığı vardır.

1970'lerin başlarında ikinci veya daha büyük mertebeden türevlerin hesaplanmaya başlanması kuantum mekaniksel hesaplama yöntemleri için çok büyük bir gelişmeye neden olmuştur. Spektroskobik parametrelerin tespiti açısından; birinci türevler geometrik optimizasyonu ve ikinci türevler bize kuvvet sabitini yani titreşim frekanslarını verir (Pulay, 1969).

Hartree-Fock yöntemi: Mevcut sistemin elektronik enerjisini hesaplamayı hedeflemektedir. Schrödinger denkleminde elektron-elektron etkileşimlerinin yerine, sistemdeki bir elektrona çekirdeklerin oluşturdukları elektrostatik alan ve diğer tüm elektronların ortalama etkisini eklemektedir. Bu nedenle sistemin gerçek dalga

fonksiyonu yerine yaklaşık dalga fonksiyonunu bulmaya çalışır. Çok elektronlu sistemler için,

$$E\Psi_e(r,R)=\left\{\sum_{i=1}^{n}h_i+\sum_{i=1}^{n}\sum_{j<i}(J_{ij}-K_{ij})\right\}\Psi_e(r,R) \tag{3.10}$$

şeklindedir. Burada; J_{ij}, elektronlar arası Coulomb etki enerjisi ve K_{ij}, değiş-tokuş enerjisi olarak ifade edilir. Büyük parantez içerisinde ki ifade *Fock Operatörü* olarak bilinir ve gerekli düzenlemelerle enerji ifadesi,

$$F\Psi_e(r,R)=E_e\Psi_e(r,R) \tag{3.11}$$

şeklinde bir özdeğer denklemi olarak yazılabilir **(**Roothan, 1951**).** Aslında tam olarak bir öz değer denklemi olmayan Fock denkleminin çözümü dalga fonksiyonunu bilmek üzerine kurulmuştur.

Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (YFT): Hartree Fock yöntemi sistemin toplam dalga fonksiyonu üzerinden geleneksel bir çözüm elde etmeye çalışıyordu. Aynı zamanda HF modelinde elektron-elektron etkileşimleri hesaplamaya dahil edilmezler. Elektronların bir noktada bulunma olasılıklarını, atom merkezine olan uzaklıklarına bağlı bir fonsiyon tanımlayarak gerçekleştirir. Temelleri 1965 yılında Hohenberg ile Kohn tarafından atılmış olan YFT (Density Functional Theory) ise çok atomlu sistemlerde değişkeni dalga fonksiyonu olarak almanın sorunu güçleştirdiğini düşündüler. Bu sebeple sistemin toplam dalga fonksiyonu yerine konum ve zamanın bir fonksiyonu olmak üzere; temel değişken olarak elektron yoğunluğunu hesaplamalarına katmışlardır. Hohenberg ile Kohn bu teoriyi ortaya çıkarırken iki temel varsayım gerçekleştirmişlerdir (Hohenberg ve Kohn, 1964). Bunlar;

1. Sistem kuantum mekaniksel bir durumda ele alınıyorsa, sistemin taban durum özellikleri o sistemi oluşturan moleküllerin elektron yoğunluğu ile direk ilişkilidir. Buna göre toplam enerji;

$$E[\rho(\boldsymbol{r})] = F_{HK}[\rho(\boldsymbol{r})] + \int V_{DIŞ}(\boldsymbol{r})\rho(\boldsymbol{r})dr \quad (3.12)$$

Burda ilk terim elektronların kinetik enerjileri ile elektron-elektron etkileşme enerjilerini içeren F_{HK}, Hohenberg-Kohn fonksiyoneli olarak adlandırılır. Denklemdeki diğer terim ise çekirdeğin dış potansiyel alanı ile ilgilidir.

2. Moleküler yapının herhangi bir durumunda elektron yoğunluğuna karşılık gelen enerji değeri, her zaman için o sistemin gerçek taban durum enerjisinden büyüktür.

YFT' ye göre, bir sistemin birim hacminde ki elektronlarının sayısı, o sistemin elektron yoğunluğunu verir ve bu ifade (x, y, z) gibi negatif olmayan üç basit değere bağlıdır (Parr ve Yang, 1989). N elektronlu bir sistemin Ψ dalga fonksiyonuna bağlı olarak elektron yoğunluğu denklem 3.13' da verildiği gibidir.

$$\rho(\vec{r}_1) = N\int \ldots\int \left|\psi(\vec{x}_1,\vec{x}_2,\ldots\vec{x}_N)\right|^2 d\vec{x}_1 d\vec{x}_2 \ldots d\vec{x}_N \quad (3.13)$$

Bu teoriye göre; herhangi bir kuantum sisteminin elektron yoğunluğu bilinirse sistemin elektronik enerjisi hesaplanabilir ve sistemin toplam enerjisi;

$$E_{YFT}[\rho] = T[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (3.14)$$

olarak verilmektedir. Denklem 3.14' daki ilk terim; kinetik enerji, ikinci terim; çekirdek-elektron çekim enerjisi, üçüncü terim; elektron-elektron Coulomb itme enerjisi ve son terim ise değiş-tokuş korelasyon enerjisi olarak adlandırılır. YFT modelinde ilk üç terim aslında HF modelinden farklı değildir. Burada ki gelişme son terim ile ilgilidir. YFT modeli, değiş-tokuş korelasyon enerjisini toplam elektron yoğunluk fonksiyonunun bir integrali olarak toplam enerji ifadesine ekler (Mueller, 2007).

B3LYP karma yoğunluk fonksiyonu teorisi: Temelinin dalga kinematiğinden oluştuğu HF yöntemi, kinetik enerji için rasyonel sonuçlar üretirken, korelasyon enerjilerini hesaplayamamasının yanı sıra değiş-tokuş enerjisi için ise iyi neticeler vermez. YFT modelleri ise HF yönteminin aksine değiş tokuş enerjileri ve korelasyon enerjilerinin hesaplanmasında başarı göstermektedir. Buradan yola çıkarak; sadece HF yöntemi veya YFT yöntemi yerine ikisinin karışımı şeklinde karma (hibrid) modellerde literatürde mevcuttur. Karma modeller toplam enerji, bağ uzunlukları, iyonizasyon enerjileri gibi birçok büyüklüğün hesaplanmasında daha başarılı sonuçlar vermiştir (Gümüştüfek, 2013). Becke, değiş tokuş ve korelasyon enerjisi için karma modeli ortaya çıkarmıştır. Becke' nin önerdiği karma modeller BLYP ve B3LYP olup, bu tez çalışmasında da kullanılan ve bu karma modellerden en doğru sonuç verenlerinden biri, LYP korelasyon enerjili üç parametreli Becke karma metodu B3LYP' dir (Becke, 1993).

Baz Kümeleri: Moleküler orbital fonksiyonu, molekülü oluşturan atomların atomik orbital fonksiyonlarının lineer toplamı şeklinde ifade edilmektedir. İşte her atom için atomik orbital fonksiyonuna baz kümesi veya baz fonksiyonları adı verilir. Bu bağlamda bir baz seti moleküler orbital yaratmakta kullanılan bir fonksiyon kütüphanesidir.

Moleküler orbitaller iki farklı şekilde sınıflandırılırlar. Bunlar; küresel simetrisi olan ve genelde iki atomlu sistemler için Slater tipi orbitaller (STO) ve eksenel simetriye sahip olanlar için Gaussian tipi orbitaller (GTO) adını alırlar. GTO ile integraller daha hızlı hesaplandığından genelde tercih sebebidir ve günümüzde GTO' dan oluşan yüzlerce set mevcuttur. Aşağıda kendi içinde sınıflandırılmış bazı temel baz setleri verilmiştir (Turhan Irak, 2015);

- *Minimal Basis Set;* Her bir atom için gereken minimum baz fonksiyonu olarak ifade edilir. STO ve GTO karışımı, (STO–nG) : STO–3G, STO–4G şeklinde gösterilir. nG; n tane Gaussian ilkeli temsilini ifade eder.
- *Split–Valence Basis Set;* GTO fonksiyonları ile oluşturulan, 4–21G, 6–31G,

- *Polarization Basis Set;* Polarizasyon temel kümelerinden meydana gelen temel setlerdir. Polarizasyondan dolayı etkilenen diğer atomların geometri değişiminden ortaya çıkmıştır. p ve d orbitalleri sırasıyla bir * ve iki ** şeklinde ekleme yapılır.
  6–31G* (6-31G (p)), 6–31G** (6-31G (d,p)) vb.,
- *Difüzyon Fonksiyonları; Ö*zellikle uyarılmış durumların hesaplamaları için gelişitirilmiştir. Temel sette + veya ++ olarak gösterilir. Geniş s ve p orbital fonksiyonlarının tanımlanması ile elde edilmiştir.
  6–31+G*, 6–31++G** vb.

3.6. QSAR (Kantitatif Yapı-Etki İlişkisi) Analizleri

İngilizce bir terim olan QSAR ifadesi, "QuantitativeStructure-Activity Relationship" kelimelerinin baş harflerinden gelmektedir. Türkçeye Kantitatif Yapı-Etki İlişkilerini Analizi olarak çevrilebilir. QSAR analizi; bir grup molekülün, kimyasal yapıları ile bu yapıların daha önceden deneysel yolla ölçülmüş olan biyolojik aktivite verileri (örneğin; inhibisyon katsayısı, K_i) arasındaki ilişkiyi istatistiksel yöntemler kullanarak matematiksel bir denklem ile ifade edilmesini sağlar. Elde edilen matematiksel denklem yeni moleküllerin aktivite verilerini belli bir istatistiki hata sınırları içerisinde tahmin etmede kullanılır.

Moleküllerin yapıları moleküler tanımlayıcı denen nümerik rakamlar ile temsil edilir. Molekül tanımlayıcılar çok farklı yollardan elde edilebilir. Bunlar pek çok sınıfa ayrılmakla beraber en yaygın ve kabaca bir sınıflama yapılacak olsa başlıca sayılacaklar arasında;

- Topolojik,
- Geometrik,
- Elektronik,
- Elektrostatik
- Orbital enerjisi

ile ilgili moleküler tanımlayıcılar sayılabilir. Her türlü moleküler tanımlayıcı fiziksel yorumlamaya uygun değildir. Yorumlamaya uygun moleküler tanımlayıcılar ile

QSAR modellerinin oluşturulması aktivite mekanizmalarının açıklanmasın da büyük öneme sahiptir.

QSAR analizlerinin yaygın olarak kullanıldığı amaç; kimyasal bileşiklerin hedef (reseptör, enzim) ile arasındaki etkileşmelerde rol oynayan dinamiklerin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda oluşturulan modellerin geliştirilme sebepleri;

- İlaç, pestisit, kişisel ürünler gibi ürünlerin geliştirilme maliyetinde tasarruf edilmesi,
- Tahminlerin uzun ve pahalı olan hayvan testlerindeki gereksinimi azaltabilir olmasıdır.

QSAR modeli oluşturabilmek için moleküler tanımlayıcı hesaplamada YFT yaygın olarak kullanılan kuantum kimyasal bir yöntemdir (Foresman ve Frisch, 1996). Bu yöntem ile optimize edilen bir yapıdan yine aynı yöntem kullanılarak pek çok fiziksel yorumlamaya müsait moleküler tanımlayıcı hesaplanabilir. Bunlar arasında elektrostatik potansiyel yüzeylerinden elde edilen iso-yoğunluk tanımlayıcıları, orbital enerjisi değerleri (Homo, Lumo vs.) ve orbital yoğunluk haritaları sayılabilir. Bunlara ilaveten Codessa III yazılımı birçok geometrik, topolojik, elektrostatik kısmi yüklere dayalı moleküler tanımlayıcıyı YFT teori hesaplamaları sonuçlarını kullanarak hesaplar (Todeschini ve Consonni, 2000).

Geometrik Optimizasyon: Geometrik optimizasyonda amaç; moleküler sistemin denge durum, yani kararlı durumunun geometrisinin hesaplanmaktır. Matematiksel olarak, enerjinin konuma göre birinci türevinin (gradient) sıfır ve ikinci türevinin (kuvvet sabiti) pozitif olması anlamına gelmektedir. Bu yöntem kuvvet metodu olarak ta bilinmektedir. Moleküllerdeki geometrik değişimler sistemin enerjisinde ve diğer birçok özelliklerinde, ilk duruma göre önemli değişiklikler ortaya çıkaracaktır. Bir moleküler sistemin geometrik optimizasyonunu yaparak, yapının en kararlı yapısı tespit edilmiş olunur; yani minimum enerjili kararlı moleküler yapı bulunur. Bu nedenle geometri optimizasyon yapmak; sistemin geometrisinde bağ uzunlukları, bağ açıları ve dihedral açılarda değişim olacağının göstergesidir. Özetle geometrik optimizasyon, geometrik parametrelerini değiştirerek moleküler sistemin enerjisini

minumum hale getirecek şekilde matematiksel bir prosedürün uygulamasıdır (Turhan Irak, 2015).

Titreşim Frekansının Hesaplanması: Bir molekülün frekansı, molekülü oluşturan atomların titreşimlerinden dolayı konumdaki değişimi göz önünde bulundurarak, sistemin enerjisinin atom konumlarına göre 2. mertebeden türevleri ile tespit edilebilir. Molekülü oluşturan atom sayısı ne kadar fazla ise titreşim hareketi de o denli karmaşık bir hal alacaktır. Bunun yanı sıra molekülü oluşturan atomların türleri ve yaptıkları bağların farklılıkları da yine bu frekans hesabını zorlaştıracak etkenlerden sayılabilir.

Uzayda herhangi bir noktanın konumunu belirtmek için, o noktaya ait üç adet koordinat göstermek gerekmektedir. Aynı şekilde N adet nokta için de $3N$ tane koordinat bilinmesi şarttır. $3N$ ifadesi, N atomlu bir sistem için serbestlik derecesi olarak adlandırılır. Bir molekülün konumsal yer değişimi incelenirken sistemi bir bütün olarak düşünmek gerekir. Yani; sistem x boyunca hareket ediyorsa, sistemin kütle merkezi öteleniyormuş gibi veya sistem dönme hareketi gerçekleştiriyorsa, sistemin kütle merkezi etrafında döndüğü kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra molekülde ki her bir atomun da diğer atomlara göre bağıl hareketleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Sistemin genel hareketi incelenirken; öteleme hareketinden dolayı üç koordinat yani 3 serbestlik derecesi ve yine dönme hareketinden dolayı açısal olarak üç koordinat yani 3 serbestlik derecesi daha gerekmektedir. Buna göre sistemin geriye kalan serbestlik derecesi $3N-6$ olarak belirlenebilir ve bu sistemi oluşturan atomların hareketlerinden kaynaklanan serbestlik derecesidir. Diğer bir deyişle $3N-6$ serbestlik derecesi molekül içinde ki olası titreşim sayısını vermektedir (Cotton, 1971). Eğer molekülü oluşturan atomlar bir doğru boyunca yerleşmişlerse, yani; molekül çizgisel bir yapıya sahip ise dönme hareketi için iki serbestlik derecesinin bilinmesi yeterli olacağından, çizgisel molekülün titreşim sayısı $3N-5$ olarak hesaplanır.

Bu tez çalışmasında yer alan sulfonamit türevleri için öncelikle geometrik optimizasyon yapılarak kararlı minimum enerji geometrileri tespit edildi. Daha sonar YFT yöntemi ile B3LYP fonksiyoneli ve 6-31 G (d,p) temel seti kullanarak moleküler dalga fonksiyonlarını Gaussian03 yazılımı kullanılarak elde edildi. Bu işlem sonucunda; Gaussian03 çıktı (log) dosyaları Codessa III yazılımına giriş dosyası olarak atandı. Codessa III yazılımı, Gaussian 03 log dosyalarında hesaplanmış olan ve moleküler dalga fonksiyonlarından ortaya çıkan her bir molekül için, gerekli moleküler tanımlayıcıları hesaplamada kullanmaktadır.

3.7. Çoklu Doğrusal Regresyon (ÇDR) Analizi

QSAR modeli oluşturmada yaygın olarak kullanılan Çoklu Doğrusal Regresyon (ÇDR) analiz yöntemi, matematiksel tekniklerle değişkenler arasındaki lineer ilişkiyi bulmak için kullanılan en yaygın analizdir (Leach ve Gillet, 2007). Bu analizdeki en basit eşitlik;

$$y = mx + c \tag{3.15}$$

şeklindedir. Burada *y*; bağımlı değişken, *x* ise; bağımsız değişkendir. Lineer regresyonun amacı; denklemde tahmin edilen değerler ile gerçekte gözlemlenen değerler arasındaki farkı minimize eden c sabiti ve m katsayısını bulmaktır. m ve c değerlerinin eşitlikleri aynı zamanda şu şekildedir;

$$m = \frac{\sum_{i=1}^{N}(x_i - \langle x \rangle)(y_i - \langle y \rangle)}{\sum_{i=1}^{N}(x_i - \langle x \rangle)^2} \tag{3.16a}$$

$$c = \langle y \rangle - m\langle x \rangle \tag{3.16b}$$

Regresyon denklemi ile tanımlanan, sırasıyla bağımsız ve bağımlı değişkenler olan *x* ve *y* ; (*x*,*y*) noktalarıyla açıklanır.

$$\langle x \rangle = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i \tag{3.17a}$$

$$\langle y \rangle = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} y_i \tag{3.17b}$$

Denklem 3.17' de belirtilen bu durum birden fazla bağımsız değişken olduğunda kullanılan çoklu lineer regresyon analizi için geçerli olup QSAR çalışmalarında yaygın olarak kullanılan matematiksel tekniklerden biridir. Yapılan bu QSAR modelinde *y* bir özellik olup (biyolojik aktivite gibi) x ise moleküler tanımlayıcı olacaktır.

QSAR modelini çözümleyen bu analizin istatistikî açıdan kabul edilebilir ve güvenilir olması gerekir. Bir QSAR denkleminin istatistiki açıdan değerini belirleyen bazı istatistik parametreler vardır (Cam ve ark., 2019). Bunların başlıcaları;

Korelasyon Katsayı Karesi, R^2: Basit ve çoklu lineer regresyon analizlerinde 'nitelik' bulunduran en yaygın değerlendirmelerden birisi korelasyon katsayısı yani R^2'dir. R^2, 0 ile1 aralığında değere sahip olurken varyasyon oranını regresyon denklemi ile tanımlanan bağımlı değişken açıklar. Regresyon denklemindeki bağımsız değişkenler i tane değere sahip ise hesaplanan y_{calc} değeri; y_i deneysel değerine karşılık gelir ve bu değer ile hesaplanan eşitlikler şu şekildedir:

Total Kareler Toplamı,

$$TSS = \sum_{i=1}^{N}(y_i - \langle y \rangle)^2 \tag{3.18}$$

Açıklanan Kareler Toplamı,

$$ESS = \sum_{i=1}^{N}\left(y_{calc,i} - \langle y \rangle\right)^2 \tag{3.19}$$

Rezidüel Kareler Toplamı,

$$RSS = \sum_{i=1}^{N}\left(y_i - y_{calc,i}\right)^2 \tag{3.20}$$

Sonuç olarak ise;

$$TSS = ESS + RSS \tag{3.21}$$

Bu ifadelere bağlı olarak R^2 eşitliği ise aşağıdaki gibi verilir;

$$R^2 = \frac{ESS}{TSS} = \frac{TSS-RSS}{TSS} = 1 - \frac{RSS}{TSS} \quad (3.22)$$

R^2 değerinin 0'a karşılık gelmesi değişkenler arasında korelasyonun yok olduğuna tekabül ederken, değerin 1'e karşılık gelmesi korelasyonun mükemmel olduğu anlamına gelir. Pek çok istatiski uygulamalarda kullanılan bu korelasyon katsayısının QSAR modellemesinde geçerliliği ≥ 0.6 olup tek başına yanıltıcı olabilir.

Çapraz Validasyon Katsayısı, R^2_{CV} (Q^2): Diğer adı Cross-Validation metodu olan katsayı, regresyon analizi sonucunda korelasyon denklemindeki doğruluk ve güvenirliği saptamak için kullanılır. Cross-validation, bir veri setindeki bazı değerleri kaldırarak kalan değerlerle QSAR modelini türetir daha sonra bu modelde kaldırdığı değerleri uygulama da tahmin eder. Bunun en kolay uygulaması içerisinden tek bir veri çıkarılan leave-one-out (LOO) yaklaşımıdır. Veri setindeki her bir değer için bu metot uygulandığında R^2_{CV} (ya da Q^2) değeri açığa çıkar. İstatistiki analizler sonucunda açığa çıkan Q^2 değeri R^2 değerinden küçük olmasına rağmen regresyon denklemini tahmin etmede daha elverişlidir. Sonuç olarak R^2 uygunluğu ölçerken, Q^2 tahmin edilebilirliği ölçer. Basit bir LOO yaklaşımı için dahi Q^2 değeri hesaplanırken veri seti dört ya da beş gruba ayrılıp her defasında farklı bir grubun dışarıda bırakılması ile bu işlem birçok kez tekrarlanır.

Bazı durumlarda model oluşturulduktan sonra sentezlenen moleküllerle modelin doğruluğu test edebilmek PRESS (tahmin edilen Residüel Kareler toplamı) ile olur. RSS ile benzerdir ancak burada kullanılan değerler oluşturulan modeldeki $y_{calc,i}$ değil PRESS kullanılarak bulunan $y_{pred,i}$ değerleridir ve Q^2 ile bağlantılı olan eşitliği şu şekildedir;

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum_{i=1}^{N}(y_i - \langle y \rangle)^2};\ PRESS = \sum_{i=1}^{N}\left(y_i - y_{pred,i}\right)^2 \quad (3.23)$$

Tahmin Edilen Standart Hata, SE: Oluşturulan test setler için doğruluğun bir ölçüsüdür. QSAR modellerinin doğruluğunu teyit etmek amacıyla, oluşturulan denklemlerin test setlere uygulanması ile hesaplanan standart sapma miktarını verir ve aşağıdaki denlem ile ifade edilir.

$$SE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(y_i - y_{pred,i})^2}{n}} \tag{3.24}$$

Standart Sapma, s: Regresyon analizi neticesinde regresyon denkleminde gözlenen verilerle korelasyon mertebesini belirlememize yardımcı olan bir başka parametre de standart sapma (s)' dır. Türetilen QSAR modelindeki gözlemlenen verilerin ne kadar iyi tahmin edilebildiğini ölçer. Bu durum s değeri ne kadar küçük ise QSAR modelinin o denli iyi olduğunun bir göstergesidir.

$$s = \sqrt{\frac{RSS}{N-p-1}} \tag{3.25}$$

Fisher Testi, F: Bu denklem formu her bir parametre ile ilişkili olan serbestlik derece sayısını yansıtır. ESS, p serbestlik derecesi ile ilişkili olup RSS, $N-p-1$ serbestlik derecesi ile ilişkilidir. F için hesaplanan bu değer ile istatistiksel çizelgeda yer alan değerler karşılaştırılır. Çizelgeda yer alan F değerleri her bir değişken için farklı bir güvenirlik seviyesini belirtir. Model oluşturulurken hesaplanan denklem 3.26' daki F değeri çizelgeda yer alan F değerlerinden büyük ise söz konusu olan modelin güven düzeyinin istatistiki açıdan anlamlı olduğunu gösterir.

$$F = \frac{ESS}{p}\frac{N-p-1}{RSS} \tag{3.26}$$

t Testi: t istatistiği doğrusal regresyon denklemindeki her bir katsayının (s;standart hata gibi) önemini gösterir. F istatistiğinde de olduğu gibi denklem 3.27' deki t değeri, istatistiksel olarak listelenen çizelgedaki değerlerle karşılaştırılır; hesaplanan bu değer çizelgeda yer alan değerlerden büyük ise katsayının anlamlı olduğunu gösterir.

$$t = \left|\frac{k_i}{s(k_i)}\right|; s(k_i) = \sqrt{\frac{RSS}{N-p-1} \cdot \frac{1}{\sum_{j=1}^{N}(x_{i,j}-\langle x_i \rangle)^2}} \quad (3.27)$$

3.8. QSAR Modellerinin Uygulanabilirlik Sınırlarının Tanımlanması (AD)

Herhangi bir regresyon analizindenelde edilen bir QSAR modelinin,modelde bulunmayan moleküllerin aktivitesini belirleme kabiliyeti eğitim setindeki moleküllerin kimyasal yapısını temsil eden moleküler tanımlayıcıların değerlerine bağlıdır (Dimitrov ve ark., 2005). Dolayısıyla eğitim setindeki moleküllerin yapısal çeşitliliği o QSAR modelinin tahmin edebileceği kimyasal evrenin boyutlarını tayin eder. Eğitim seti ne kadar çok yapısal açıdan farklı moleküllerden oluşuyorsa o denli farklı moleküllerin aktivitesini tahmin etmede etkili olur. Modelin hangi moleküllerin aktivitelerini güvenle tahmin etmede uygun olduğunun belirlenmesi o modelin uygulanabilirlik sınırlarının (applicibility domain; AD) tayin edilmesi anlamına gelir. Bu sınırların belirlenmesinde modeli oluşturmada kullanılan eğitim setinde yer alan moleküler tanımlayıcı değerleri kullanılır. Uygulanabilirlik sınırı belirlemede birçok farklı yöntem geliştirilmiştir (Jaworska, 2005). Bunlardan literatürde sıkça kullanılanlardan bazıları;

- Geometrik yöntemler; Sınırlayıcı Kutu yöntemleri,
- Mesafe-tabanlı yöntemler; Euclidean mesafesi, Mahalanobismesafesi
- Parametrik olmayan yöntemler,
- Olasılık yoğunluğu dağılım yöntemleridir.

Bu çalışmada yukarıda belirtilen mevcut yöntemler içerisinden mesafe-tabanlı yöntemlerden Euclidean mesafesi kullanarak Leverage yaklaşımı ile QSAR modellerinin uygulanabilirlik sınırlarını belirledik. Mesafe-tabanlı yaklaşımlar veri setindeki bir noktanın diğer her noktaya olan mesafesini hesaplar.

Euclidean Mesafesi: Euclidean mesafesi, tanımlayıcı uzayındaki iki nokta arasındaki mesafedir ve tanımlayıcı değerlerinin arasındaki uzaklığın karesi (Pisagor teoremi) ile hesaplanır (Jaworska ve ark., 2005).

$$d_2 = \|x - y\|^2 = \sum_v (x_v - y_v)^2 \quad (3.28)$$

v indisi, tanımlayıcı indeksidir ve uygulama alanını küresel boyutta açığa çıkarır. Euclidean mesafesi izotropiktir, yani; ortogonal eksenler farklı bir set ile ifade edilse de değişmez. Buna dayalı olarak uygulanabilirlik alanının tahmin geçerliliği eğitim setinin merkez noktası etrafında izotropik olarak dağılıma bağlıdır.

Kaldıraç (Leverage) Yöntemi: Bir QSAR modeli için uygulanabilirlik alanı tayin edilme yöntemlerinden biri de kaldıraç gücü yöntemidir. Bu yöntem ile modeldeki bir bileşik kaldıraca göre değerlendirilir. Eğitim setine yer alan bileşiklerin kaldıracı h (etki matrisi veya yüzey matrisi), onun modeldeki etkisini ölçerek uygulanabilirlik alanındaki asıl değişkenini tanımlar (Eriksson ve ark., 2003).

$$h(\boldsymbol{x}) = N^{-1} + \boldsymbol{x}^T(X^TX)^{-1}\boldsymbol{x} \tag{3.29}$$

$\boldsymbol{x}$ vektörü; bileşiğin tanımlayıcı değerleri, X; N satırlı eğitim set bileşiklerinin matris ifadesini ve X^T; ise X matrisinin transpozunu temsil eder. Uyarıcı kaldıraç olarak tanımlanan h^* ise aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$h^* = 3 \times h = 3 \times \sum_i \frac{h_i}{n} = 3 \times \frac{p'}{n} i = (1, \dots\dots, n) \tag{3.30}$$

n; gruptaki molekül sayısı ve p'; model parametrelerinin (moleküler tanımlayıcı) sayısını temsil eder.

Kaldıraç gücü değerleri hem eğitim bileşikleri hem de oluşturulan yeni bileşikler için hesaplanabilir. İlk durum açısından, güvenilir olmayan bir model oluşturulduğunda, model parametrelerini büyük ölçüde etkileyen eğitim bileşiklerinin hesaplanmasında yararlanılır. İkinci durum açısından ise oluşan modelin uygulanabilirlik alanının sınır tayini kontrolünde yararlanılır. Bir bileşiğin kaldıraç gücü değerinin uyarıcı kaldıraçtan daha büyük olması tahmin edilen bu bileşiğin modelde extrapole olduğu anlamına gelir. Bu yüzden tahmin edilen bu değerin dikkatle kullanılması gerekir.

3.9. Moleküler Docking (kenetlenme)

Moleküler docking, bir molekülün (ilaç) diğer bir molekül ile (örneğin bir reseptör, enzim, protein ya da DNA) bağ oluşturması esnasında hangi oryantasyonu sergileyeceğini ve ne tür etkileşim (hidrojen bağı, elektrostatik, van der Waals vb.) gösterdiğini tayin etmeye yarayan bir moleküler modelleme tekniğidir. İki molekülün bağlanma esnasındaki oryantasyonlarının biliniyor olması bir skorlama fonksiyonu vasıtası ile bağlanma gücünü tayin etmemize olanak sağlar. Moleküler docking, yapı temelli ilaç tasarım teknikleri arasında önemli bir yere sahiptir. Bu teknik, ligandların reseptör aktif sitesi içerisindeki biyo-aktif konformasyonlarının belirlenmesine imkân verdiğinden biyolojik süreçlerin anlaşılmasında etkili bir yöntemdir.

Bu tez çalışmasında moleküler docking çalışmasını AutoDock 4.2 yazılımı ile yürüttük (Morris ve ark., 2009). AutoDock 4.2 yazılımı tarama yöntemi olarak Lamarckian genetik algoritmasını kullanır. Skorlama fonksiyonu fizik temelli olup aşağıdaki 3.31 eşitliği ile verilmektedir (Huey ve ark., 2007);

$$\Delta G = \left(V_{bağlı}^{L-L} - V_{bağlı-değil}^{L-L}\right) + \left(V_{bağlı}^{P-P} - V_{bağlı_{-değil}}^{P-P}\right) + \left(V_{bağlı}^{P-L} - V_{bağlı_{-değil}}^{P-L} + \Delta S_{kon.}\right) \quad (3.31)$$

Bu eşitlikte L ligantı, P ise reseptör protein ya da enzimi temsil eder. Son terimdeki ΔS bağlanma sonrası entropi kaybını ifade eder. Yukarıdaki denklem içindeki V potansiyeli, denklem 3.32' de gösterildiği gibi, van der Waals, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşim ve çözülme terimlerinin toplamını içeren bir yapıdadır.

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}}\right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}}\right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} \left(S_i V_j + S_j V_i\right) e^{-r_{ij}^2/2\sigma^2} \quad (3.32)$$

Bu denklemdeki her bir terim başındaki W (ağırlık sabiti), protein data bankasında (PDB) deneysel yapısı ve ligand protein bağlanma sabiti (K_i) bilinen 188 adet protein-ligand kompleksinden kalibre edilerek elde edilmiştir. İlk terim tipik dispersion ve itmeyi temsil eden 6/12 van der Waals potansiyelidir. Atomlar için A ve

B parametreleri Amber kuvvet alanındaki değerlerdir. İkinci terim yönelimli hidrojen bağı potansiyelini ifade etmekte olup hidrojen atomu için 10/12 potansiyeline dayanır. C ve D parametreleri oksijen veya azot atomları ile hidrojen bağının 1,9 Å olduğunda potansiyel kuyusunun 5 kcal/mol, kükürt ile hidrojen bağının 2,5 Å olması durumunda 1 kcal/mol olmasına göre kalibre edilerek belirlenmiştir. Üçüncü terim elektrostatik etkileşimleri Coulomb potansiyeli ile ifade edilişini gösterir. Son terimde ise atomların (V) hacmi büyüklüğüne bağlı potansiyel terimi olup bu hacmin her hangi bir atomu çözücü (su gibi) atomlarına karşı oluşturduğu engeli ifade eder. Bu hacim çözücü parametresi, S ile ağırlıklandırılmaktadır. Üstel terimdeki σ, mesafe ağırlık terimi olup 2,5 Å olarak belirlenmiştir.

3.10. Kullanılan Yazılımlar ve Donanım

Gaussian 03W: Bu tezde kullanılan Gaussian 03 programı bir paket programdır. Bu tez çalışmasında Unix tabanlı işletim sisteminde kullanılmıştır. İçinde Moleküler mekanik, yarı deneysel ve ab initio yöntemlerinin mevcut bulunmaktadır. Program birçok baz setini içermektedir. Gaussian 03W programı ile

- Atom ve moleküllerin enerji hesabı,
- Sistemlerin geometrik optimizasyonlarının yapılması,
- Titreşim frekansları, kuvvet sabitleri ve dipol moment hesabı,
- IR ve Raman spektrumları, termokimyasal özellikleri belirleme,
- Bağ ve tepkime enerjileri, molekül orbitalleri, atom yükleri, çok kutuplu momentler,
- NMR ve manyetik duyarlılık titreşimsel şiddetleri,
- Elektron ilgisi ve iyonlaşma enerjileri,
- Kutuplanabilirlik ve hiperkutuplanma, elektrostatik potansiyel ve elektron yoğunluğu

gibi niceliklerin hesaplamalarında kullanılabilmektedir (Frisch, 2009).

Gausview 5.0: Temel görevi Gaussian 03 programı için input (giriş) dosyaları oluşturmaktır. Gaussian 03 programının grafik ara yüzüdür. Bu program ile sıfırdan molekülleri üç boyutlu çizebilir, döndürebilir ve ekleme-çıkarma yapabiliriz. Aynı

zamanda sonuç dosyalarınında analiz edilmesinde görsel animasyonlar ile yardımcı olmaktadır. Bu tez çalışmasında Windows versiyonu kullanılmıştır.

Codessa III: Semichem Inc. (http://www.semichem.com/codessa/default.php) tarafından üretilen moleküler tanımlayıcı hesaplama ve QSAR modeli oluşturmada içinde birçok istatistik algoritmanın yer aldığı yazılımdır. Bu tez çalışmasında Gaussian çıktı dosyalarını kullanarak moleküler tanımlayıcı hesaplamada ve çoklu doğrusal regresyon algoritması ile QSAR modellerini oluşturmada kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında Codessa III, Unix tabanlı işletim sisteminde kullanılmıştır.

Matlab: The Math Works Inc. firması tarafından üretilen çok yönlü bilimsel hesaplama yazılımıdır. Bu çalışmada Milano Chemometricsand QSAR ResearchGroup (http://michem.disat.unimib.it/chm/) tarafından yazılan ve grup internet sitesinden indirilebilen bir Matlab yazılımı olan AD uygulaması QSAR modellerinin uygulanabilirlik sınırlarını hesaplamada kullanıldı.
http://michem.disat.unimib.it/chm/download/addownload.php
http://www.mathworks.com

BioVia DiscoveryStudioVisualizer: Biovia tarafından üretilen makro moleküllerin ve ligantların etkileşimini göstermede de kullanılabilen çok amaçlı ve çok fonksiyonlu görsel ara yüz yazılımıdır. Biz bu çalışmada sülfonamit türevlerinin CAII ve CAIX izoenzimlerinin aktif sitesi içerisindeki yerleşimini göstermek için kullandık. http://accelrys.com/

AutoDock Tools (ADT): AutoDock programını kullanmak için ligandların ve reseptörün dosyalarını hazırlamada ve dock edilen ligandların sonuçlarını analiz etmede kullanılmıştır (Morris ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında Unix tabanlı işletim sisteminde kullanılmıştır.
http://autodock.scripps.edu/resources/adt

AutoDock4.2: Sülfonamid türü bileşiklerimizin CAII ve CAIX izoenzimlerinin aktif sitesine docking çalışmasında kullanılmıştır (Morris ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında Unix tabanlı işletim sisteminde kullanılmıştır.
http://autodock.scripps.edu/

Donanım: Tüm hesaplamalar ve simülasyonlar yukarıda bahsedilen yazılımlar, Akdeniz Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri biriminden FBA-2015-288 nolu proje bütçesinden temin edilen Fujitsu marka Primery RX4770 M1 model, sunucu üzerinde çalıştırılarak gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Giriş

Bu bölümde, moleküler yapıları şekil 3.7' de, biyolojik aktivite (K_i) verileri Çizelge 3.2' de verilen moleküllerle elde edilen QSAR modelleri verilmektedir. Ayrıca, **7b**, **7c**, **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** ve **8f** nolu sulfonamit türevlerinin CAII (2QO8) ve CAIX (5FL5) izoenzimlerinin aktif sitelerine docking uygulamasının analizleri de verilmektedir.

4.2. QSAR Bulguları

Çizelge 3.2' de verilen dört farklı aktivite verisinin (pKi-CAII, pKi-CAIX, RpKi ve ΔpKi) bağımlı değişken, şekil 3.7' de bulunan sulfonamit türevlerinden hesaplanan moleküler tanımlayıcıların bağımsız değişken olarak ele alındığı, ÇDR algoritması uygulanarak QSAR modelleri elde edilmiştir. Öncelikle elde edilen her bir model için tüm moleküller (43 adet) eğitim seti (training set) gibi ele alınarak öncü QSAR modelleri oluşturulmuştur. Oluşturulan modellerde en uyumsuz olan bir molekül ekarte edilerek setlerdeki molekül sayısı 42'ye düşürülmüştür. Sonra, modelin geçerliliğinin test edilmesi için üç alt kümeye ayrılmıştır. Ayırma işlemi tüm moleküllerin K_i değerleri küçükten büyüğe doğru sıralandıktan sonra 1, 4, 7,…40' a kadar olanlar A seti, 2, 5, 8,….41' e kadar olanlar B seti ve 3, 6, 9,…42' ye kadar olanlar C seti olarak belirlendi. Bu ayrıştırma yönteminin amacı eğitim ve test setlerindeki moleküllerin yapısal ve aktivite açısından çeşitliliğini maksimize etmektir. Aktiviteye göre, ayrıştırma sonucunda elde edilen alt molekül setleri çizelge 4.1' de verilmektedir.

pKi-CAII, pKi-CAIX, RpKi ve ΔpKi aktivite değerleri için oluşturulan QSAR modellerinin istatistik değerleri çizelge 4.2' de verilmektedir.

Çizelge 4.1. Aktivite verilerine göre ayrılmış alt setlerde yer alan moleküller

pKi-CAII Aktivite Sıralamasına Göre			**pKi-CAIX Aktivite Sıralamasına Göre**		
A Seti	B Seti	C Seti	A Seti	B Seti	C Seti
1e	1b	1a	1a	1b	1d
8a	1c	2a	1c	2d	1e
8b	1d	2d	1f	4	2a
8e	1f	4	2b	5	3
8f	2b	5	6	7c	8a
9a	3	7b	7a	9b*	8c
9a*	7a	7c	7b	9d	8d
9c	8d	8c	8b	9e*	8g
9c*	8g	9b	8e	9f*	9a
9d*	9b*	9d	9b	9h	9a*
9f*	9e*	9e	9d*	9h*	9c
9g	9g*	9f*	9e	9i	9c*
9h	9i	9h*	9f	9i*	9g
9j*	9j	9i*	9g*	9j	9j*
RpKi Aktivite Sıralamasına Göre			**ΔpKi Aktivite Sıralamasına Göre**		
A Seti	B Seti	A Seti	B Seti	A Seti	B Seti
1b	1e	1a	1b	1a	1f
1f	2a	1c	1c	1e	2a
4	2d	1d	1d	2d	2b
7b	5	2b	7b	4	3
8d	6	3	8a	6	7c
8e	7a	8a	8b	7a	8c
9b*	7c	8b	8e	8f	8d
9d	8g	8c	8g	9c*	9a*
9d*	9a	9a*	9a	9d*	9b*
9e	9b	9c	9b	9f	9c
9h	9c*	9e*	9d	9g	9e
9i*	9f*	9f	9e*	9g*	9h
9j	9h*	9g*	9f*	9h*	9j
9j*	9g	9i	9i*	9i	9j*

Çizelge 4.2. pKi-CAII, pKi-CAIX, RpKi ve ΔpKi aktivite verileri için elde edilen QSAR modellerinin istatistiği.

Aktivite Tipi	Eğitim Seti	R^2	Q^2	F	s^2	Test Seti	$R_{ext.}^2$	SE
pKi-CAII model	A+B	0,804	0,699	23,643	0,333	C	0,756	0,579
	A+C	0,840	0,766	30,365	0,245	B	0,709	0,656
	B+C	0,783	0,658	20,806	0,346	A	0,836	0,490
pKi-CAIX model	A+B	0,942	0,896	72,327	0,114	C	0,954	0,329
	A+C	0,942	0,910	72,388	0,116	B	0,949	0,317
	B+C	0,955	0,924	95,454	0,091	A	0,904	0,391
RpKi model	A+B	0,865	0,738	28,248	0,0051	C	0,757	0,080
	A+C	0,846	0,696	24,242	0,0056	B	0,830	0,080
	B+C	0,845	0,685	24,046	0,0051	A	0,807	0,083
ΔpKi model	A+B	0,849	0,538	24,877	0,277	C	0,722	0,595
	A+C	0,823	0,675	20,591	0,304	B	0,813	0,560
	B+C	0,799	0,676	17,581	0,339	A	0,817	0,522

QSAR modelinin sağlamlığının tasdiki açısından rotasyona tabi tutularak üç alt setten ikisi eğitim seti geriye kalan birisi test seti olarak seçilerek modelin performansı gözlenmiştir. Çizelge 4.2' den de görüleceği üzere eğitim setleri ((A+B), (A+C) veya (B+C)) ile oluşturulan modellerin istatistiki manada uygunluğunun, oldukça yüksek olan R^2, Q^2 ve F ve oldukça düşük olan s^2 değerlerinden görülmektedir.

Çizelge 4.2' de istatistik değerleri verilen QSAR modellerini oluşturan moleküler tanımlayıcılar, denklemdeki katsayıları ve oluşturulan denklemler çizelge 4.3' te gösterilmektedir. Çizelge 4.3 incelendiğinde QSAR modellerinde yer alan bir çok moleküler tanımlayıcının mekanistik yorumlamaya uygun olduğu görülmektedir. Yine, modellerdeki her bir moleküler tanımlayıcının t-testi değerinin mutlak değerce 1,96'dan (p=0,05) büyük olması, bu tanımlayıcıların istatistiki açıdan anlamlı olduklarını göstermektedir.

Çizelge 4.4' de; Çizelge 4.2' de eğitim seti (A+B), test seti C seçildiği durumda ortaya çıkan tahmin değerleri verilmektedir. Mavi ile gösterilen moleküller eğitim setini kırmızı ile gösterilenler ise test setini ifade etmektedir. Şekil 4.1' de Çizelge 4.2' de verilen deneysel K_i değerlerinin, hesaplanan Ki değerlerine karşı grafiği

gösterilmektedir. Şekil 4.2' de Çizelge 4.2' de eğitim seti (A+B), test seti C seçildiği durumdan elde edilen modelin *Kaldıraç Yöntemine* göre uygulanabilirlik sınırları (AD) gösterilmektedir. Şekil 4.1' den de görüldüğü gibi alt setlere bölme işlemi eğitim ve test setinde bulunan moleküllerin aktivitelerinin geniş bir alana yayılmasını garanti etmiştir. Yani hem eğitim setinde hem de test setinde düşük, orta ve yüksek aktiviteli moleküller mevcuttur.

Bir QSAR modelinin uygulanabilirlik sınırları konusunda genel kabul, Y ekseninde verilen, molekül setindeki biyolojik aktivite (K_i) verilerine dayalı olarak ortaya çıkan 'standartlaştırılmış rezidü' değerinin -2,5 ile +2,5 arasında ve X ekseninde verilen, molekül setindeki moleküler tanımlayıcıların değerlerine bağlı ortaya çıkan h^* kesmesinden küçük olan bölgedir. Bu kabule bağlı kalarak Şekil 4.2 incelendiğinde pKi-CA II modeli için eğitim setinde bulunan 3 nolu molekülün yapısal tesirli sapan değer (outlier), 4 nolu molekülün ise hem yapısal sapan değer hem de yanıt sapan değer olduğu görülüyor. pKi-CA IX modelinde **1f, 3** ve **4** nolu moleküllerin yapısal tesirli sapan değer olurken, **7c** nolu molekülün ise yanıt sapan değer olma sınırında olduğu görülüyor. RpKi modelinde bulunan **1d, 8c** ve **8g** nolu moleküllerin yapısal tesirli sapan değer olduğu gözlenirken, **8b** nolu molekülün yanıt sapan değer olduğu görülüyor. ΔpKi modelinde ise **1e, 1f, 3, 4** nolu moleküllerin yapısal tesirli sapan değer olduğu gözlenirken, **7c** nolu molekülün yanıt sapan değer olduğu görülüyor.

RpKi modeli dışındaki üç modelde de **3** ve **4** nolu moleküllerin yapısal tesirli sapan değer olduğu gözleniyor. Bu beklenen bir durumdur, çünkü şekil 3.7 incelendiğinde 43 molekülden sadece **3** ve **4** nolu moleküllerin sulfonamit olmayıp sülfonat yapısında oldukları gözlenmektedir. Benzer şekilde sülfonat grubu içeren **1f** ve **1e** nolu moleküllerin ΔpKi yapısal tesirli sapan değer olduğu gözleniyor.

Çizelge 4.3. Elde edilen QSAR modellerinde yer alan moleküler tanımlayıcılar ve katsayıları.

Aktivite tipi	Des. no	Moleküler tanımlayıcı	Katsayı			t-test		
			A+B	B+C	A+C	A+B	B+C	A+C
pKi-CAII	D0	Intercept	2,074	0,605	0,516	2,073	0,649	0,653
	D1	Summed Mulliken Positive Charge	0,816	1,051	1,113	4,423	6,909	8,897
	D2	IsoDensity Surface, Surface Integral of ESP	0,526	0,397	0,442	3,332	2,751	3,679
	D3	PSASA-2, Zefirov	-0,012	-0,015	-0,015	-5,082	-7,038	-8,163
	D4	IsoDensity Surface, (Variance of ESP+)*(Variance of ESP-)/(Variance of ESP)**2	11,773	15,048	11,399	3,108	4,059	3,568
Oluşturulan Denklem	$y = 2{,}074 + 0{,}816 \times \mathbf{D1} + 0{,}526 \times \mathbf{D2} - 0{,}012 \times \mathbf{D3} + 11{,}773 \times \mathbf{D4}$							
pKi-CAIX	D5	Intercept	11,0752	11,657	11,505	13,258	16,981	15,502
	D6	Wiener Index	0,0013	0,0015	0,0013	7,569	9,812	8,541
	D7	Number of C-O Bonds	-1,596	-1,652	-1,662	-15,739	-17,412	-16,262
	D8	Average Zefirov Charge for a S Atom of a O-S Bond	54,576	55,267	57,507	10,524	13,837	11,086
	D9	Average Bond Order for a O Atom	-3,094	-3,532	-3,391	-7,026	-8,599	-8,147
	D10	Center of Mass, Z	11,135	19,436	10,134	2,009	3,870	1,748
Oluşturulan Denklem	$y = 11{,}0752 + 0{,}0013 \times \mathbf{D6} - 1{,}596 \times \mathbf{D7} + 54{,}576 \times \mathbf{D8} - 3{,}094 \times \mathbf{D9} + 11{,}135 \times \mathbf{D10}$							

Çizelge 4.3. **(devamı)**

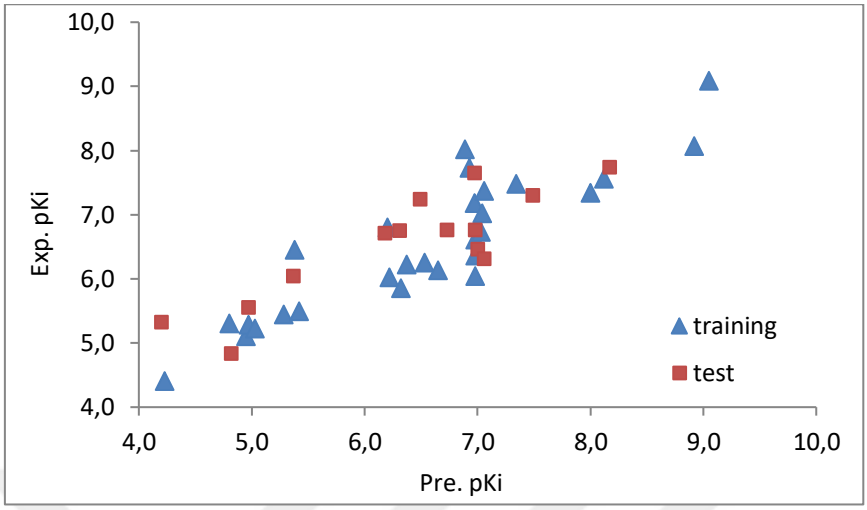
Aktivite tipi	Des. no	Moleküler tanımlayıcı	Katsayı			t-test		
			A+B	B+C	A+C	A+B	B+C	A+C
RpKi	D11	Intercept	4,329	3,717	3,943	9,234	8,414	7,568
	D12	Uniform-Mass, Moment of Inertia of Mass, Largest	-0,00083	-0,00084	-0,00084	-6,359	-6,882	-4,690
	D13	Average Mulliken Charge for a C Atom of a H-C Bond	-0,803	-0,852	-0,952	-4,843	-5,950	-5,360
	D14	Average Bond Order for a C-C Bond	-2,550	-2,150	-2,287	-8,009	-7,080	-6,687
	D15	Number of N-N Bonds	0,406	0,357	0,335	6,620	5,649	4,999
	D16	WPSASA-2, Zefirov	0,0014	0,0018	0,0012	3,583	4,669	3,312
Oluşturulan Denklem	$y = 4{,}329 - 0{,}00083 \times \mathbf{D12} - 0{,}803 \times \mathbf{D13} - 2{,}550 \times \mathbf{D14} + 0{,}406 \times \mathbf{D15} + 0{,}0014 \times \mathbf{D16}$							
ΔpKi	D17	Intercept	-1,732	1,235	-1,585	-0,959	0,409	-0,800
	D18	Balaban Index J	5,559	4,595	6,242	6,941	4,130	6,777
	D14	Average Bond Order for a C-C Bond	-9,023	-10,031	-10,329	-7,542	-6,001	-6,234
	D19	Fractional Minimum Zefirov Negative Charge	-11,271	-7,983	-10,295	-4,761	-3,326	-4,484
	D20	YZ Shadow / YZ Rectangle	5,767	5,229	5,338	3,350	3,361	3,201
	D21	Zefirov Charges' Quadrupole Moment Eigenvalue, Smallest	-0,165	-0,156	-0,195	-4,378	-3,879	-2,765
Oluşturulan Denklem	$y = -1{,}732 + 5{,}559 \times \mathbf{D18} - 9{,}023 \times \mathbf{D14} - 11{,}271 \times \mathbf{D19} + 5{,}767 \times \mathbf{D20} - 0{,}165 \times \mathbf{D21}$							

Çizelge 4.4. Eğitim seti (A+B), test seti C olduğu durumlar için tahmin edilmiş aktivite değerleri (t üssü işaretleri, test setleri ifade etmektedir).

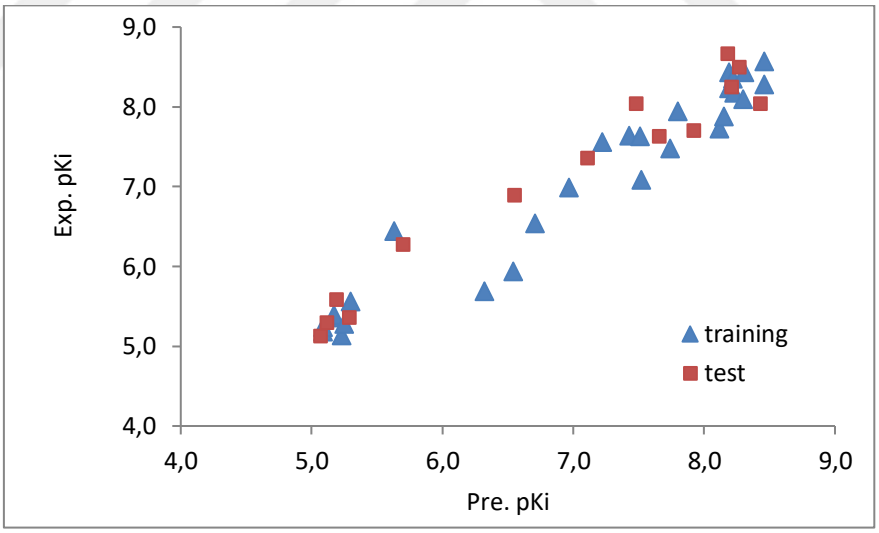
Mol. No	R^1	R^2	Deneysel pKi-CAII	Hesaplanan pKi-CAII	Deneysel pKi-CAIX	Hesaplanan pKi-CAIX	Deneysel RpKi-	Hesaplanan RpKi	Deneysel ΔpKi	Hesaplanan ΔpKi
1a	OH		6,18	6,716^t	8,19	8,233	0,75	0,807^t	-2,02	-2,534
1b	NH_2		6,97	7,179	8,22	8,351	0,85	0,805	-1,25	-1,496
1c	NHMe		7,03	6,735	8,31	8,439	0,85	0,788^t	-1,28	-1,645
1d	NMe_2		6,2	6,803	8,18	8,670^t	0,76	0,798^t	-1,99	-1,540
1e	$NHCH_2SO_3Na$		6,98	6,046	8,27	8,500^t	0,84	0,823	-1,29	-1,573
1f	$N(Me)CH_2SO_3Na$		6,98	6,609	8,46	8,570	0,83	0,968	-1,47	-1,740^t
2a	OH		6,97	7,652^t	8,21	8,247^t	0,85	0,754	-1,24	-1,503^t
2b	NH_2		7,06	7,372	8,23	8,175	0,86	1,003^t	-1,17	-0,127^t
2d	NMe_2		6,98	6,765^t	8,19	8,439	0,85	0,869	-1,22	-0,584
3			4,23	4,410	5,29	5,359^t	0,8	0,721^t	-1,06	-1,085^t
4			4,2	5,329^t	5,23	5,136	0,8	0,768	-1,04	-0,503
5			6,73	6,768^t	6,71	6,545	1	1,125	-	-
6			-	-	6,54	5,940	1,38	1,338	2,46	1,896
7a			8,92	8,070	7,43	7,639	1,2	1,200	1,49	1,498
7b			7,49	7,304^t	6,97	6,990	1,08	1,087	0,53	0,090
7c			6,31	6,754^t	8,46	8,280	0,75	0,792	-2,15	-0,565^t
8a			9,05	9,085	6,55	6,898^t	1,38	1,374^t	2,5	1,546
8b			6,93	7,731	7,52	7,090	0,92	1,097^t	-0,59	-0,071
8c			8,17	7,737^t	7,48	8,042^t	1,09	0,991^t	0,69	0,394^t
8d			8	7,337	5,7	6,278^t	1,4	1,316	2,3	2,284^t
8e			7,34	7,479	5,63	6,448	1,3	1,304	1,7	1,554

Çizelge 4.4. **(devamı)**

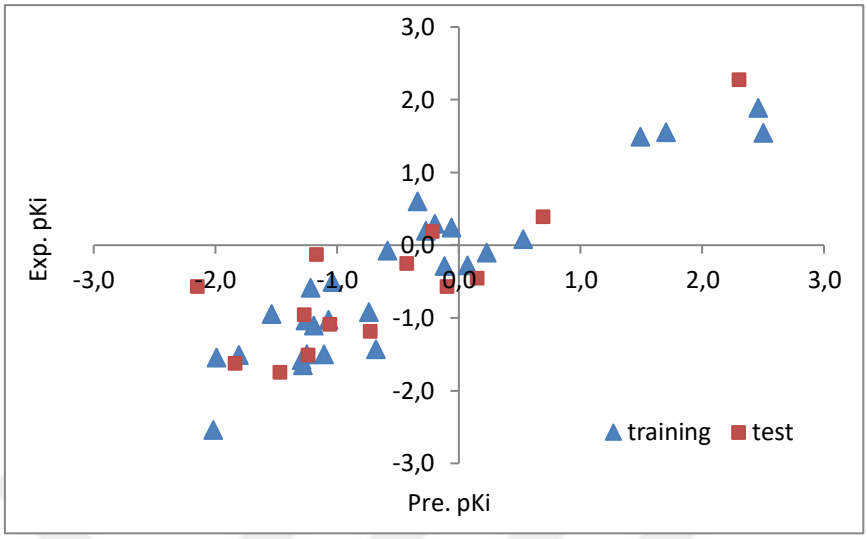
Mol. No	R^1	R^2	Deneysel pKi-CAII	Hesaplanan pKi-CAII	Deneysel pKi-CAIX	Hesaplanan pKi-CAIX	Deneysel RpKi-	Hesaplanan RpKi	Deneysel ΔpKi	Hesaplanan ΔpKi
8f			8,12	7,559	-	-	-	-	-0,34	0,606
8g			6,89	8,019	8,43	8,041[t]	0,82	0,794	-1,54	-0,943
9a	H	MeO	4,8	5,306	5,07	5,125[t]	0,95	0,930	-0,27	0,205
9b	4'-Br	MeO	4,97	5,557[t]	5,09	5,238	0,98	0,925	-0,12	-0,280
9c	4'-Cl	MeO	5,28	5,442	5,12	5,295[t]	1,03	0,940[t]	0,15	-0,445[t]
9d	4'-CN	MeO	5,37	6,047[t]	5,3	5,561	1,01	0,954	0,07	-0,274
9e	4'-F	MeO	4,82	4,834[t]	5,25	5,284	0,92	0,978	-0,43	-0,244[t]
9f	4'-Me	MeO	4,97	5,286	5,17	5,393	0,96	0,994[t]	-0,2	0,298
9g	3'-NO_2	MeO	5,42	5,500	5,19	5,585[t]	1,04	0,923	0,23	-0,093
9h	4'-NO_2	MeO	6,22	6,026	6,32	5,690	0,98	0,900	-0,1	-0,568[t]
9i	3'-NH_2	MeO	5,03	5,226	5,09	5,186	0,99	0,967[t]	-0,06	0,243
9j	4'-NH_2	MeO	4,95	5,101	5,17	5,364	0,96	0,960	-0,22	0,196[t]
9a*	H	H	6,37	6,228	7,11	7,361[t]	0,9	0,873[t]	-0,73	-1,179[t]
9b*	4'-Br	H	5,38	6,458	7,22	7,561	0,75	0,872	-1,84	-1,617[t]
9c*	4'-Cl	H	6,98	6,365	7,66	7,631[t]	0,91	0,878	-0,68	-1,429
9d*	4'-CN	H	7,04	7,026	8,15	7,878	0,86	0,886	-1,11	-1,493
9e*	4'-F	H	6,32	5,856	7,51	7,631	0,84	0,905[t]	-1,19	-1,098
9f*	4'-Me	H	7,06	6,314[t]	8,12	7,729	0,87	0,930	-1,07	-1,024
9g*	3'-NO_2	H	6,53	6,251	7,8	7,948	0,84	0,851[t]	-1,26	-1,029
9h*	4'-NO_2	H	6,49	7,238[t]	8,3	8,099	0,78	0,829	-1,81	-1,503
9i*	3'-NH_2	H	7	6,467[t]	7,74	7,484	0,9	0,910	-0,74	-0,914
9j*	4'-NH_2	H	6,65	6,133	7,92	7,706[t]	0,84	0,881	-1,27	-0,955[t]



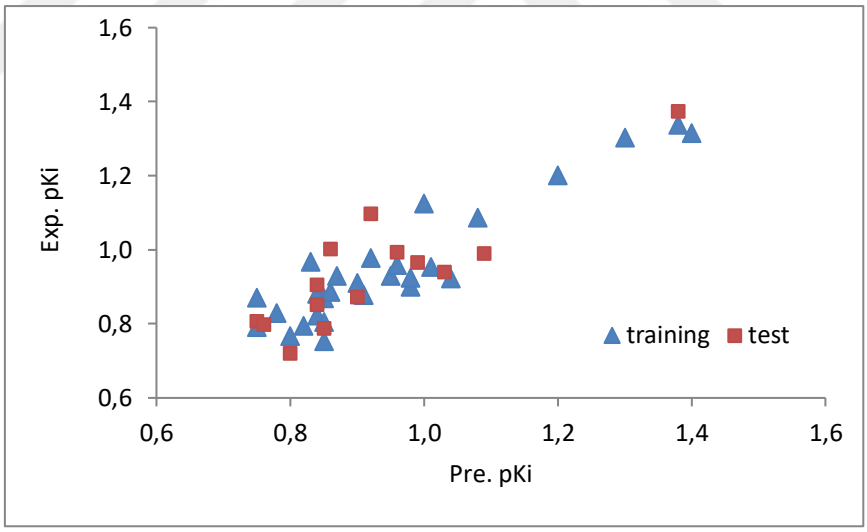
a) pKi-CAII modeli



b) pKi-CAIX modeli

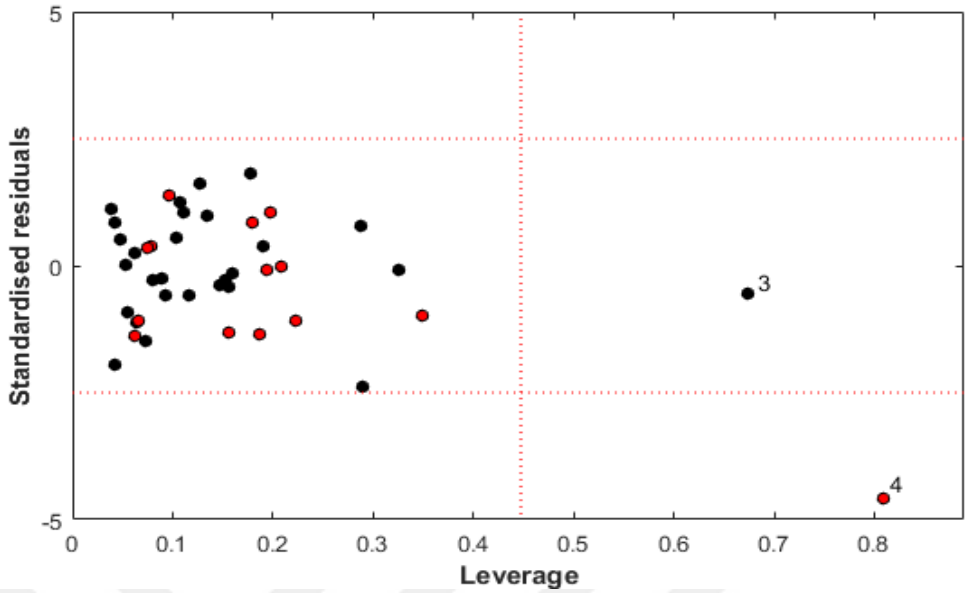


a) RpKi modeli

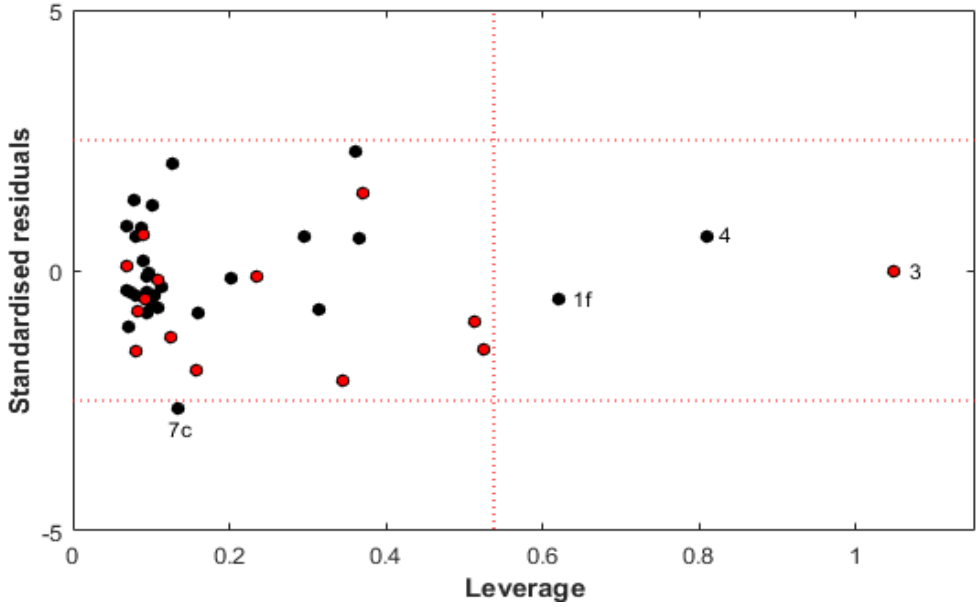


b) ΔpKi modeli

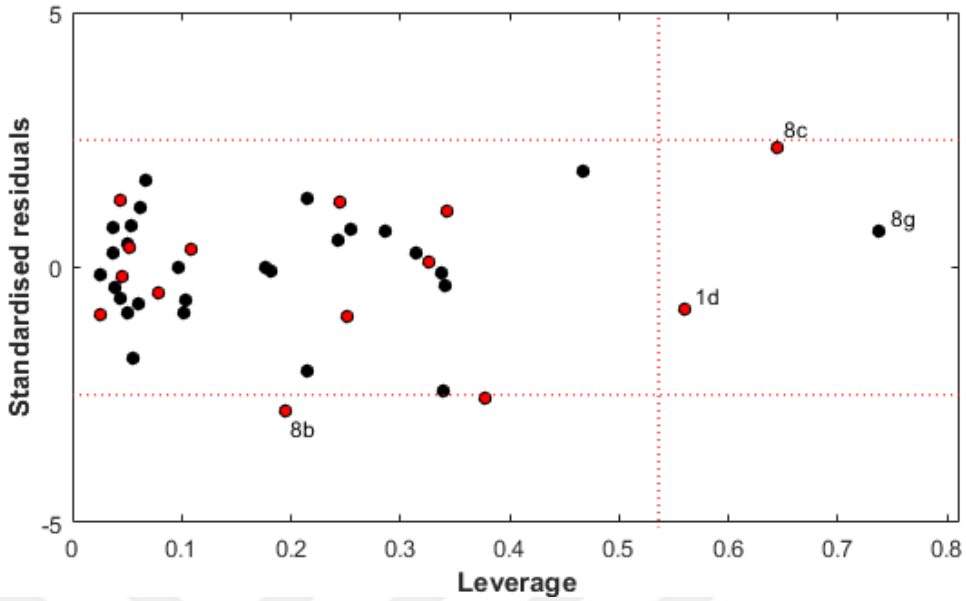
Şekil 4.1. Eğitim seti (A+B), test seti C olduğu durumlar için deneysel aktivite değerinin tahmin edilmiş aktivite değerine karşı çizilmiş grafikleri.



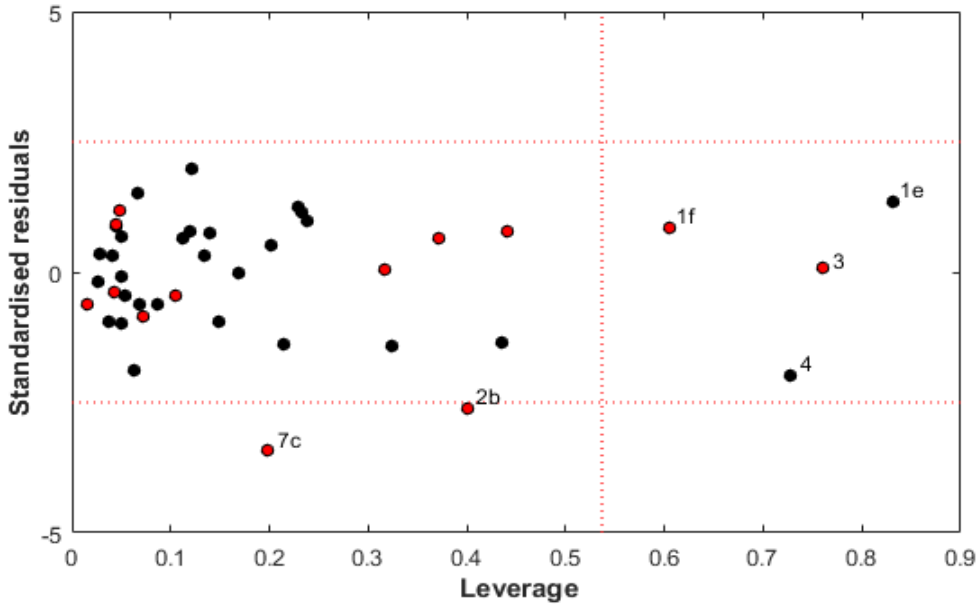
a) pKi-CAII modeli



b) pKi-CAIX modeli



c) RpKi modeli



d) ΔpKi modeli

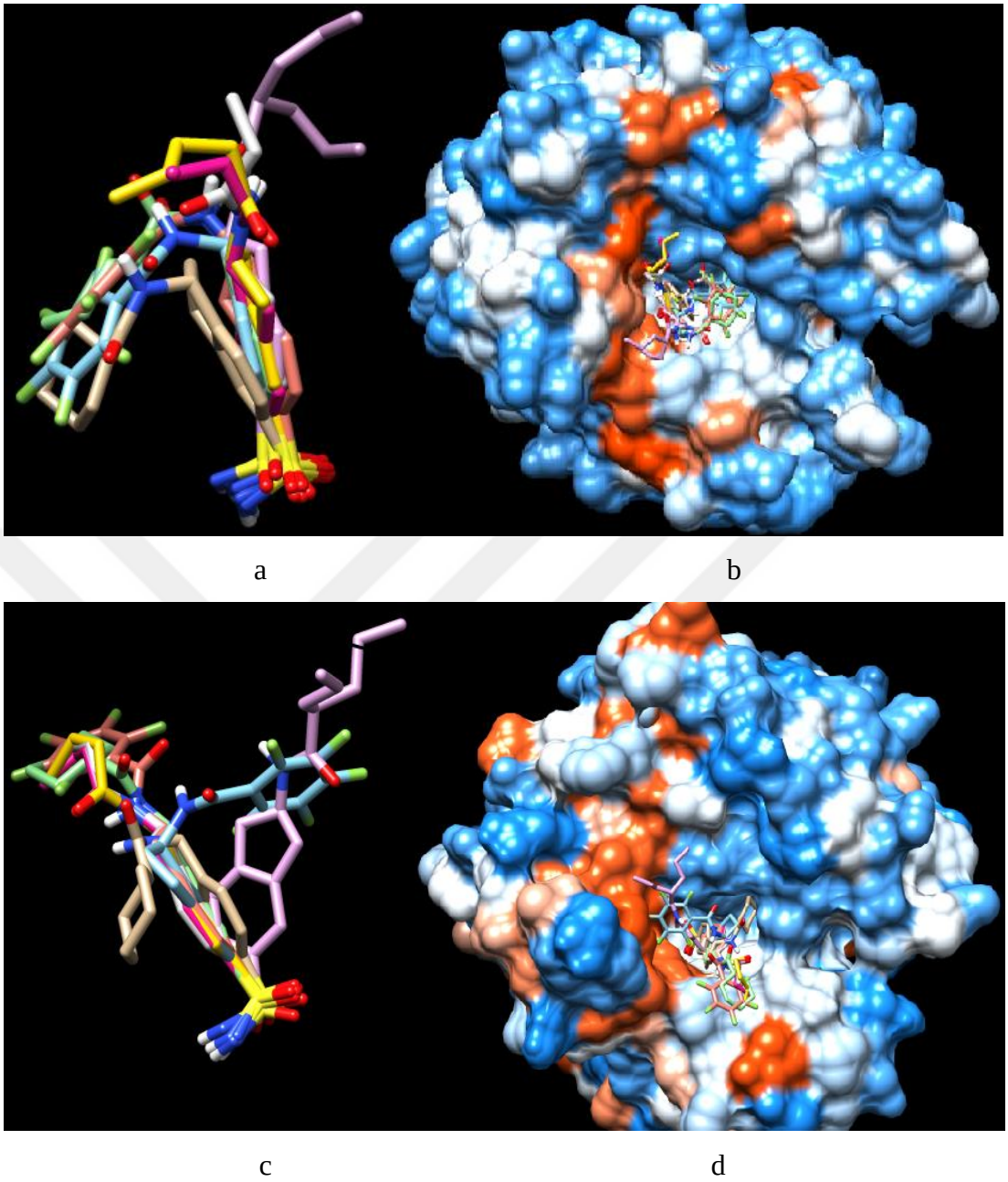
Şekil 4.2. Eğitim seti (A+B), test seti C olduğu durumlar için modelin uygulanabilirlik sınırları (applicibility domain, AD). Kırmızı noktalar test set ve siyah noktalar eğitim set bileşenlerini ifade etmektedir.

4.3. Moleküler Docking Bulguları

Çizelge 3.2' de bulunan **7b**, **7c**, **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** ve **8f** nolu moleküller ile 2QO8 (CAII) ve 5FL6 (CAIX) kodlu deneysel yolla elde edilmiş yapılara, CAII ve CAIX aktif siteleri içerisinde sergilediği etkileşimler analiz etmek için, docking prosedürü uygulandı.

2QO8 kodlu protein data bankasındaki yapı **8a** ligantı ile kompleks halinde bulunmaktadır. Kullandığımız AutoDock4.2 yazılımının güvenirliliğini test etmek için 2QO8 yapısında bulunan **8a** ligantını sildikten sonra standart protein dokcing hazırlama protokolünü uygulayarak, modelleme ile ürettiğimiz **8a** yapısını bu yapıya dock edip deneysel **8a** yapısı ile farkının RMSD değerini inceledik. 250 koşumluk genetik algoritma docking simülasyonu sonucu program default (varsayılan değerleri) değerlerine göre sonuçlar dört sınıfta toplandı. En çok konformasyon içeren ikinci sınıfın RMSD değerleri ortalaması 1,48 Å olup 11. komformasyonun RMSD değeri 1,20 Å olarak bulundu. Docking çalışmalarında deneysel değer ile docking pozu arasındaki RMSD değeri 2,5 Å altında olursa doğru bağlanma konformasyonunun tespit edildiği kabul edilir. Bu sonuçlara göre uyguladığımız docking prosedürünün doğru yöntem olduğu kabul edilebilir. Yaptığımız tüm docking simülasyonlarında bir parametre dışında AutoDock 4.2 yazılımının default değerleri kullanılmıştır. Default değerlerinde her bir ligant için 100 olan genetik algoritma koşum sayısı 250 'ye yükseltilmiştir.

Şekil 4.3'de **7b**, **7c**, **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** ve **8f** moleküllerinin 2QO8 (CAII) ve 5FL6 (CAIX) aktif siteleri içerisinde seçilmiş docking pozlarının üst üste bindirilmiş görüntüsü verilmektedir. Şekil 4.2 a)' da sadece ligantlar b)' de ligantlar ve 2QO8 birlikte, c)' de sadece ligantlar ve d)' de ligantlar ve 5FL6 birlikte görülmektedir. Ligantların renklendirilmesi, **7b** altın sarısı, **7c** mavi, **8a** mor, **8b** yeşil, **8c** turuncu, **8d** gümüş, **8e** pembe ve **8f** sarı olarak gösterilmektedir.



a b

c d

Şekil 4.3. **7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e** ve **8f** moleküllerinin 2QO8 (CAII) ve 5FL6 (CAIX) aktif siteleri içerisindeki yerleşimi.

Bio-aktif konformasyon olarak adlandırılan, içinde en çok konformasyon bulunan sınıfın en düşük serbest enerji değerini veren konformasyonlardır. Tabi bu seçim için tek şart ZBF (çinko bağlanma fonksiyonu) şartını sağlamasıdır. Şekil 4.3' de verilen konformasyonların seçimi bu kurala göre belirlenmiştir.

Bunun sebebi literadürdeki bir çalışmada (Weber ve ark., 2006) deneysel bio-aktif konformasyonu bilinen altı ligantın CAII aktif sitesine dock edildiğinde deneysel değerlere en yakın konformasyonun her ligant için ek çok ligand içeren sınıfta bulunmuş olmasıdır. Docking çalışması yapılan ligantların, deneysel inhibisyon sabitleri olan Ki ile bio-aktif konformasyonu olarak seçilen konformasyonların enzim ile oluşturdukları kompleksin serbest enerji değerleri çizelge 4.5' te verilmektedir.

Çizelge 4.5' de bulunan inhibisyon sabitleri ile bağlanma serbest enerji değerleri arasında CAII için zayıf (r=0,20) ve CAIX için (r=0,55) orta düzeyde korelasyon olduğu gözlenmektedir. **7b**, **7c**, **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** ve **8f** moleküllerinin CAII ve CAIX aktif siteleri içerisindeki aminoasitlerle yaptıkları Hidrojen bağı etkileşimleri Çizelge 4.6' da ve Zayıf van der Waals etkileşimleri Çizelge 4.7'de verilmektedir.

Çizelge 4.5. **7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e ve 8f** moleküllerinin inhibisyon sabitleri ile docking bağlanma serbest enerji değerleri.

Molekül No	Bağlanma serbest enerjisi (kcal/Mol)		İnhibasyon katsayısı, Ki (nanoMol)	
	CAII	CAIX	CAII	CAIX
7b	-8,50	-8,75	32	108
7c	-7,23	-7,40	490	3,5
8a	-6,64	-7,05	0,9	282
8b	-7,57	-7,20	118	30
8c	-7,08	-7,08	6,7	33
8d	-7,02	-6,64	10	2015
8e	-7,04	-6,73	46	2320
8f	-7,09	-6,63	7,6	3,4

Çizelge 4.6. **7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e** ve **8f** moleküllerinin CAII ve CAIX aktif siteleri içerisindeki aminoasitlerle yaptıkları Hidrojen Bağı etkileşimleri.

Ligant Moleküller	**Hidrojen Bağı**	
	CAII	**CAIX**
7b	ASN67 (H)-O18 GLN92 (H)-O18 THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	HIS68 (NH)-O18 THR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11
7c	THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	TRP9 (HE1)-O18 THR201 (O)-H2 THR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11
8a	THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	GLN92 (NH)-O18 THR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11
8b	THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	PRO202 (O)-H2 HR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11
8c	THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	THR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11
8d	GLN92 (H)-O18 THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	TRP9 (HE1)-O18 THR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11
8e	THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	THR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11
8f	THR199 (OG1)-H14 THR199 (NH)-O11	THR200(OG1)-H14 THR200(NH)-O11

Çizelge 4.7**. 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e** ve **8f** moleküllerinin CAII ve CAIX aktif siteleri içerisindeki aminoasitlerle yaptıkları yakın van der Waals etkileşimleri.

Ligant Moleküller	**Yakın van der Waals Etkileri**	
	CAII	**CAIX**
7b	LEU198, THR199, THR200, HIS64, ASN67, GLN92, VAL121	LEU199, THR200, THR201, PRO202, PRO203, TRP210, HIS68, SER69, GLN71, GLN92
7c	LEU198,THR199,THR200, PRO202, HIS64, ASN62, ASN67, GLN92, TRP5	LEU199, THR200, THR201, PRO202, TRP9
8a	LEU198,THR199,THR200, PRO202, LEU204, HIS64, VAL121, VAL135	LEU199,THR200, TRP210, LEU91, GLN92, VAL121, VAL130
8b	LEU198,THR199,THR200, PRO202, LEU204, TRP208, VAL121, TRP5, HIS64, ASN62	LEU199, THR200, THR201, PRO202, PRO203, TRP9
8c	LEU198,THR199,THR200, PRO201, TRP209, VAL121, TRP5, HIS64, ASN62, ASN67	LEU199, THR200, THR201, PRO202, PRO203, TRP9
8d	LEU198,THR199,TRP209, ILE91, GLN92, VAL121, PHE131	LEU199, THR200, THR201, PRO202, PRO203, TRP9
8e	LEU198,THR199,TRP209, ILE91, GLN92, VAL121, PHE131	LEU199,THR200,THR201, PRO202, PRO203, TRP9
8f	LEU198,THR199,TRP209, GLU69, ILE91, GLN92, VAL121, PHE131	LEU199,THR200,THR201, PRO202, PRO203, TRP9

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Giriş

Bu bölümde, bir önceki bölümde verilen QSAR modelleri ve moleküler docking simülasyonlarının sonuçları tartışılacak olup, elde edilen bulgulardan sülfonamit türevlerinin CAII ya da CAIX' a karşı seçicilik sergilemesindeki yapısal faktörlerin neler olduğu üzerine odaklanmıştır. Bu yolla elde edilecek bilgiler, seçiciliği mevcut olanlardan daha yüksek yeni moleküllerin tasarımında kullanılabilecek olması açısından önem arz etmektedir.

5.2. QSAR Modelleri

5.2.1. pKi-CAII QSAR modeli

Çizelge 5.1' de pKi-CAII QSAR modelinden elde edilen veriler tek tablo halinde verilmiştir. İstatistiği verilen pKi-CAII modelinin istatistiksel olarak uygunluğunun yüksekliği (yüksek R^2 ve F, düşük s^2) ve bunun yanı sıra tahmin gücünün de oldukça iyi olduğu (yüksek R_{ext}^2 ve düşük SE) görülmektedir. Modelin dayanıklılığının yüksek olduğu ise A, B ve C alt setleri rotasyon yapıldığında modelin istatistik değerlerinde önemli bir değişimin olmadığından anlaşılmaktadır.

Çizelge 5.1' de verilen pKi-CAII modeli incelendiğinde D0 (intercept) ile beraber üç pozitif katsayılı (D1, D2 ve D4) birde negatif katsayılı (D3) moleküler tanımlayıcıdan meydana geldiği görülmektedir. Negatif katsayılı moleküler tanımlayıcının, *PSASA-2*' nin (total charge weighted partial positively charged molecular surface area) anlamı; molekülün çözücü erişebilir yüzey alanının, moleküldeki pozitif kısmi yüklü atomların yüklerinin toplamı ile çarpımıdır. Bunun anlamı sülfonamit türevlerinde, çözücü erişebilir yüzey alanı ve pozitif kısmi yüklü atom sayısındaki artışla CAII' ye bağlanma eğilimi arasında ters orantı olduğudur.

Çizelge 5.1. pKi-CAII modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları.

Sülfonamid türevleri N=43 adet	1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2d, 3, 4, 5, 6, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g, 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9f, 9g, 9h, 9i, 9j, 9a*, 9b*, 9c*, 9d*, 9e*, 9f*, 9g*, 9h*, 9i*, 9j*
A Seti N=14 adet	1e, 8a, 8b, 8e, 8f, 9a, 9a*, 9c, 9c*, 9d*, 9f*, 9g, 9h, 9j*
B Seti N=14 adet	1b, 1c, 1d, 1f, 2b, 3, 7a, 8d, 8g, 9b*, 9e*, 9g*, 9i, 9j,
C seti N=14 adet	1a, 2a, 2d, 4, 5, 7b, 7c, 8c, 9b, 9d, 9e, 9f*, 9h*, 9i*,
Not: 6 nolu sülfonamid türevi outlier olarak seçildi.	

İstatistik							
Eğitim Seti	**R^2**	**Q^2**	**F**	**s^2**	**Test Seti**	**$R_{ext.}^2$**	**SE**
A+B	0,804	0,699	23,643	0,333	C	0,756	0,579
A+C	0,840	0,766	30,365	0,245	B	0,709	0,656
B+C	0,783	0,658	20,806	0,346	A	0,836	0,490

QSAR denkleminde yer alan moleküler tanımlayıcıların katsayı ve t-testi değerleri						
Moleküler tanımlayıcı	**Katsayı**			**t-testi**		
Intercept	2,074	0,605	0,516	2,073	0,649	0,653
Summed Mulliken Positive Charge	0,816	1,051	1,113	4,423	6,909	8,897
IsoDensity Surface, Surface Integral of ESP	0,526	0,397	0,442	3,332	2,751	3,679
PSASA-2, Zefirov	-0,012	-0,015	-0,015	-5,082	-7,038	-8,163
IsoDensity Surface, (Variance of ESP+)*(Variance of ESP-)/(Variance of ESP)**2	11,773	15,048	11,399	3,108	4,059	3,568

QSAR Denklemi
$y = 2{,}074 + 0{,}816 \times \mathbf{D1} + 0{,}526 \times \mathbf{D2} - 0{,}012 \times \mathbf{D3} + 11{,}773 \times \mathbf{D4}$

Çizelge 4.4 incelendiğinde, **8e**, **8f**, ve **8g** moleküllerinde hidrofobik "kuyruk" (–nCH2-CH3) uzadıkça ve **9a**'den **9j'** ye kadar olan moleküllerin ise R^2 pozisyonuna MeO grubu bağlandığında, *PSASA-2*'nın mutlak değerinin artacağı görülebilir. Zaten çizelge 4.4' deki pKi-CAII değerleri incelendiğinde, yukarıda adı geçen moleküllerin aktivite değerlerinin diğerlerine oranla daha düşük bir trend sergilediği görülmektedir. Bunun sebebi; çözücü erişebilir yüzey alanı büyüdükçe ligantın CAII aktif sitesinin hidrofobik yüzeyiyle yaptığı itici van der Waals etkileşiminin artmasıdır ve bu da aktiviteyi olumsuz etkilemektedir.

pKi-CAII modelinde yer alan pozitif katsayılı iki moleküler tanımlayıcıdan birincisi, *Surface Integral of ESP (Elektro Statik Potansiyel Yüzey İntegrali*), ikincisi ise *(Variance of ESP+)*(Variance of ESP-)/(Variance of ESP)*^{2} Pozitif Elektro Statik Potansiyel Yüzeyinin değişiminin *Negatif Elektro Statik Potansiyel Yüzeyinin* değişi ile çarpımının *Toplam Elektro Statik Potansiyel Yüzeyinin* karesine bölümüdür.

Bu iki molekül tanımlayıcı da, moleküllerin elektro statik potansiyel haritasından türetilmektedir. Bunlardan birincisi; *Surface Integral of ESP*, genellikle molekülün yüzey alanıyla doğru orantılıdır. Yani molekülün yüzey alanı büyüdükçe biyolojik aktivitesi artmaktadır. Buradan şöyle bir çıkarım yapılabilir; Enzimin aktif sitesi içerisine giren ligantın yüzey alanı büyüdükçe, çevre aminoasitlerle çekici etkileşim yapma ihtimali artar. Bu durum, negatif katsayılı moleküler tanımlayıcı, *PSASA-2* için yaptığımız yorumlarla zıt görünüyor gibi olsa da öyle değildir. Çünkü bir molekülün toplam yüzey alanı ile molekülün çözücü erişebilir yüzey alanı arasında bir doğru korelasyonun olması şart değildir.

İkinci *Elektro Statik Potansiyel Yüzey İntegrali* ile ilişkili moleküler tanımlayıcının yorumlanması daha zor olmakla beraber bazı öngörülerde bulunmak mümkündür. Öncelikle söylenebilecek ilk şey, bu moleküler tanımlayıcının payında bulunan her bir terimin değerinin büyümesi, molekülde bulunan atom çeşitliliği ile doğru orantılıdır.

$$(Variance\ of\ ESP+)*(\ Variance\ of\ ESP-)/(\ Variance\ of\ ESP)^2 \qquad (5.1)$$

Molekülün atom heterojenliğinin artması ESP haritasında pozitif ve negatif lokal bölgelerin oluşmasına imkan sağlar. Molekülde negatif ESP bölgelerin var olabilmesi için O, N, S ve Cl gibi atomların molekülde var olmasını gerektirir. Bu atomların olması ligantın hidrojen bağı yapabilme kapasitesini artırır. Dolayısıyla bu moleküler tanımlayıcının katsayısının pozitif olması, ligantların atom heterojenliğinin artması ile molekülün biyolojik aktivitesinin artması arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Modeldeki diğer moleküler tanımlayıcı *Summed Mulliken Positive Charge*, Mulliken pozitif yüklerinin toplanması temeline dayanır. Bu moleküler tanımlayıcının direk yorumlaması pek mümkün olmamakla beraber, etkileşime girecek olan ligantın CAII ile kompleks oluşturması esnasındaki reaksiyon serbest enerjisi ile ilişkili olduğu söylenebilir.

5.2.2. pKi-CAIX QSAR modeli

Çizelge 5.2' de pKi-CAIX QSAR modelinden elde edilen veriler tek tablo halinde verilmiştir. İstatistiği verilen pKi-CAIX modelinin uygunluğunun mükemmele yakınlığının yanında (yüksek R^2 ve F, düşük s^2) , tahmin gücünün de çok iyi olduğu (yüksek R_{ext}^2 ve düşük SE) görülmektedir. Modelin dayanıklılığının yüksek olduğu ise A, B ve C alt setleri rotasyon yapıldığında modelin istatistik değerlerinde önemli bir değişim olmadığından anlaşılmaktadır.

Çizelge 5.2. incelendiğinde pKi-CAIX modeli incelendiğinde D5 (intercept) dışında, üç pozitif (D6, D8 ve D10) iki negatif (D7 ve D9) katsayılı beş moleküler tanımlayıcıdan oluşmaktadır. Pozitif katsayılı tanımlayıcılardan ilki *Wiener (W) indeks*idir (Wiener, 1947).

Çizelge 5.2. pKi-CAIX modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları.

Sülfonamid türevleri N=43 adet	1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2d, 3, 4, 5, 6, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g, 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9f, 9g, 9h, 9i, 9j, 9a*, 9b*, 9c*, 9d*, 9e*, 9f*, 9g*, 9h*, 9i*, 9j*
A Seti N=14 adet	1a, 1c, 1f, 2b, 6, 7a, 7b, 8b, 8e, 9b, 9d*, 9e, 9f, 9g*,
B Seti N=14 adet	1b, 2d, 4, 5, 7c, 9b*, 9d, 9e*, 9f*, 9h, 9h*, 9i, 9i*, 9j,
C seti N=14 adet	1d, 1e, 2a, 3, 8a, 8c, 8d, 8g, 9a, 9a*, 9c, 9c*, 9g, 9j*
Not: 8f nolu sülfonamid türevi outlier olarak seçildi.	

İstatistik							
Eğitim Seti	**R^2**	**Q^2**	**F**	**s^2**	**Test Seti**	**$R_{ext.}^2$**	**SE**
A+B	0,942	0,896	72,327	0,114	C	0,954	0,329
A+C	0,942	0,910	72,388	0,116	B	0,949	0,317
B+C	0,955	0,924	95,454	0,091	A	0,904	0,391

QSAR denkleminde yer alan moleküler tanımlayıcıların katsayı ve t-testi değerleri						
Moleküler tanımlayıcı	**Katsayı**			**t-testi**		
Intercept	11,0752	11,657	11,505	13,258	16,981	15,502
Wiener Index	0,0013	0,0015	0,0013	7,569	9,812	8,541
Number of C-O Bonds	-1,596	-1,652	-1,662	-15,739	-17,412	-16,262
Average Zefirov Charge for a S Atom of a O-S Bond	54,576	55,267	57,507	10,524	13,837	11,086
Average Bond Order for a O Atom	-3,094	-3,532	-3,391	-7,026	-8,599	-8,147
Center of Mass, Z	11,135	19,436	10,134	2,009	3,870	1,748

QSAR Denklemi
$y = 11{,}0752 + 0{,}0013 \times \mathbf{D6} - 1{,}596 \times \mathbf{D7} + 54{,}576 \times \mathbf{D8} - 3{,}094 \times \mathbf{D9} + 11{,}135 \times \mathbf{D10}$

$$W = \frac{1}{2}\sum_{i,j}^{N_{SA}} d_{ij} \quad (5.2)$$

Burada d_{ij}, moleküldeki *i, j* atom çiftlerini birbirine bağlayan en kısa yolu veren bağ sayısı ve N_{SA} 'da moleküldeki hidrojenden farklı atom sayısını temsil etmektedir.

Bu topolojik moleküler tanımlayıcı doğası gereği yorumlaması oldukça zordur. Randic ve Jure topolojik indekslerin yorumlanması konusunda yaptıkları bir çalışmada *Wiener indeksinin* yorumlanması konusunda şöyle bir sonuca varmışlardır (Randic ve Jure, 2001); Molekülün hacmi ve atom sayısı büyüdükçe *W* büyümekte, ama bu büyümede merkez civarında olan atomların katkısı uç noktalarda olan atomlardan daha fazla olmaktadır. Bu bilgiler ışığında çalışılan CAIX enzimi, biyolojik aktivitesi görece diğerlerine göre düşük olan **3**, **4**, **8d, 8e, 8f**, gibi moleküllerin geometrik merkezinin indan halkası dışına kaydığı ve bu yüzden merkezdeki atom yoğunluğunun azalması ile *W* değerini düştüğü düşünülebilir. Bu durum bu moleküllerin düşük aktivite sergilemesine sebep olabilmektedir.

pKi-CAIX modelinde yer alan pozitif katsayılı tanımlayıcılardan diğeri de *Center of Mass, Z*' dir. Bu geometrik tanımlayıcı molekülün kütle dağılımını karakterize eder. Diğer bir deyişle; Molekül X, Y, Z koordinat sistemine yerleştirildikten sonra her bir eksen üzerindeki ağırlık merkezi hesaplanması ile elde edilir. Çalışmaya konu olan moleküllere bakıldığında **9a**, **9b**, **9c**, **9d**, **9e**, **9f**, **9g**, **9h**, **9i** ve **9j** moleküllerinin $\mathbf{R_2}$ pozisyonlarına bağlanan MeO grubunun Z eksenindeki kütle merkezi değerini azaltıcı yönde etkilediği, dolayısıyla bu moleküllerin MeO grubu yerine hidrojen bağlı olan analoglarına göre daha az aktif oldukları söylenebilir. Benzer şekilde, indan-sulfonamitlerde de bağlayıcı grubun indan halkasının 3 pozisyonu yerine 2 pozisyonuna bağlandığında *W* değerinin azaldığı dolayısıyla bu moleküllerin 3 pozisyonuna bağlı analoglarına göre daha düşük aktivite sergiledikleri gözlenmektedir.

pKi-CAIX modelinde yer alan diğer bir pozitif katsayılı tanımlayıcı da *Average Zefirov Charge for a S atom of S-O bond*' dur. Bu tanımlayıcı ZBF işlevi gören oksijen atomuna komşu atom olan P (sülfür) atomunun kısmi yükü değerini vermektedir.

Sülfür atomu üzerindeki kısmi yük, polarizasyon etkisinden dolayı molekülün diğer atomların üzerindeki kısmi yüklere bağlıdır. Özellikle, çalışma kümesindeki sülfonat (SO_3Na) grubu içeren **3**, **4** ve **5** nolu moleküllerin Zefirov kısmi yükleri negatif olduğundan modelde aktiviteyi azaltıcı yönde etki göstermektedir. Bu moleküllerin CAIX aktivitesine bakıldığında görece diğerlerinden daha düşük aktivite sergiledikleri gözlenmektedir.

pKi-CAIX modelinde yer alan negatif katsayılı iki moleküler tanımlayıcı, *Number of C-O bonds* ve *Average Bond Order for a O Atom*' dur. Bunlardan birincisi, karbon oksijen bağ sayısı, sülfonat (SO_3Na) grubu içeren **1e**, **1f**, **3**, **4** ve MeO grubu takılı tetrahidroizokinolin sulfonamitlerinde (**9a'** dan **9j**' ye kadar moleküllerde) diğer moleküllere göre görece yüksek olduğundan bu moleküllerin aktivitesi daha az olduğu gözlenmektedir.

İkinci moleküler tanımlayıcı olan oksijen bağlarının ortalama mertebesi, NO_2 içeren **9g**, **9h**, **9g***, **9h*** ve sülfonat (SO_3Na) içeren **1e**, **1f**, **3** ve **4** grubu içeren moleküllerde daha yüksek değere sahiptir**.** Bu moleküllerin biyolojik aktivitelerine bakıldığında **1e** ve **1f** dışındakilerin görece düşük aktivite sergileyen moleküller olduğu söylenebilir.

5.2.3. RpKi QSAR modeli

Çizelge 5.3' de RpKi QSAR modelinden elde edilen veriler tek tablo halinde verilmiştir. Bu modelinde verilen istatistiği incelendiğinde uygunluğunun oldukça iyi olmasının yanında (yüksek R^2 ve F, düşük s^2) , tahmin gücünün de çok iyi olduğu (yüksek R_{ext}^2 ve düşük SE) görülmektedir. Modelin dayanıklılığının yüksek olduğu ise yine A, B ve C alt setleri rotasyon yapıldığında modelin istatistik değerlerinde önemli bir değişim olmadığından anlaşılmaktadır.

Çizelge 5.3. RpKi modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları.

Sülfonamid türevleri N=43 adet	1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2d, 3, 4, 5, 6, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g, 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9f, 9g, 9h, 9i, 9j, 9a*, 9b*, 9c*, 9d*, 9e*, 9f*, 9g*, 9h*, 9i*, 9j*
A Seti N=14 adet	1b, 1f, 4, 7b, 8d, 8e, 9b*, 9d, 9d*, 9e, 9h, 9i*, 9j, 9j*
B Seti N=14 adet	1e, 2a, 2d, 5, 6, 7a, 7c, 8g, 9a, 9b, 9c*, 9f*, 9h*, 9g
C seti N=14 adet	1a, 1c, 1d, 2b, 3, 8a, 8b, 8c, 9a*, 9c, 9e*, 9f, 9g*, 9i
Not: 8f nolu sülfonamid türevi outlier olarak seçildi.	

İstatistik							
Eğitim Seti	**R^2**	**Q^2**	**F**	**s^2**	**Test Seti**	**$R_{ext.}^2$**	**SE**
A+B	0,865	0,738	28,248	0,0051	C	0,757	0,080
A+C	0,846	0,696	24,242	0,0056	B	0,830	0,080
B+C	0,845	0,685	24,046	0,0051	A	0,807	0,083

QSAR denkleminde yer alan moleküler tanımlayıcıların katsayı ve t-testi değerleri						
Moleküler tanımlayıcı	**Katsayı**			**t-testi**		
Intercept	4,329	3,717	3,943	9,234	8,414	7,568
Uniform-Mass, Moment of Inertia of Mass, Largest	-0,00083	-0,00084	-0,00084	-6,359	-6,882	-4,690
Average Mulliken Charge for a C Atom of a H-C Bond	-0,803	-0,852	-0,952	-4,843	-5,950	-5,360
Average Bond Order for a C-C Bond	-2,550	-2,150	-2,287	-8,009	-7,080	-6,687
Number of N-N Bonds	0,406	0,357	0,335	6,620	5,649	4,999
WPSASA-2, Zefirov	0,0014	0,0018	0,0012	3,583	4,669	3,312

QSAR Denklemi
$y = 4{,}329 - 0{,}00083 \times \mathbf{D12} - 0{,}803 \times \mathbf{D13} - 2{,}550 \times \mathbf{D14} + 0{,}406 \times \mathbf{D15} + 0{,}0014 \times \mathbf{D16}$

RpKi QSAR modeli D11 (intercept) dışında, üç negatif katsayılı (D12, D13 ve D14) ve iki pozitif katsayılı (D15 ve D16) beş moleküler tanımlayıcıdan oluşmaktadır. Bu modeldeki bağımlı değişkenin tanımı gereği,

$$RpKi=(Log\ Ki\text{-}CAII / Log\ Ki\text{-}CAIX) \quad (5.3)$$

olmak üzere; bir moleküler tanımlayıcı pozitif katsayıya sahipse bu tanımlayıcının değerindeki artışın CAII aktivitesindeki artışla doğru CAIX aktivitesindeki artışla ters orantılı olması anlamına geliyor. Bu bağlamda; Moleküler tanımlayıcı negatif katsayıya sahip olursa yukarıda bahsedilen durumun tam tersi anlamına gelmektedir.

RpKi modelinde yer alan pozitif katsayılı iki moleküler tanımlayıcı, *Number of N-N bonds* ve *WPSASA-2, Zefirov*' dur. Bunlardan birincisi azot-azot bağ sayısı 1 ve 2 nolu molekül gruplarında bir iken diğer tüm moleküllerde sıfırdır. Bu moleküllerde aktivite CAIX lehinedir.

İkinci tanımlayıcı, *WPSASA-2, Zefirov,* yorumlaması oldukça karmaşık bir içeriğe sahip olup;

$$WPSASA2 = PPSA2 * TMSA/1000 \quad (5.4)$$

şeklinde tanımlanır. Burada *PPSA2* kısmi pozitif yüklü moleküler yüzey alanının, molekülün toplam yükü ile çarpımı, *TMSA* ise molekülün toplam yüzey alanı olarak ifade edilir. Burada moleküldeki oksijen ve azot atomu sayısındaki artışın, kısmi pozitif yüklü moleküler yüzey alanı artışı ile ters orantılı olduğu düşünülebilir.

RpKi modelinde yer alan negatif katsayılı üç moleküler tanımlayıcıdan ilki *Moment of Inertia of Mass, Largest*' tır. Bu moleküler tanımlayıcı molekülün eylemsizlik momentini ifade etmektedir. Molekül çubuğumsu şekil aldıkça bu moment değeri giderek büyür. Bu durum, sulfonamit türevlerinin CAII ve CAIX enzimlerinin aktif sitelerinin içinde yer aldığı durumda değerlendirildiğinde, çubuğumsu yapıdaki sülfonamitlerin aktivitelerinin CAIX lehine olduğu anlamına gelmektedir.

Diğer negatif katsayılı moleküler tanımlayıcıdan biriside *Average Mulliken Charge for a C Atom of a H-C Bond*' tur. Hidrojen bağlı karbon atomlarının ortalama kısmi yükü, molekülün çevre aminoasitlerle etkileşiminde ki elektrostatik potansiyeli belirleyen temel bileşenlerden birisidir. Bu tez çalışmasında kullanılan tüm moleküller için bahsi geçen moleküler tanımlayıcı negatif değere sahiptir. Tüm yükle ilişkili tanımlayıcılar da olduğu gibi, bu tanımlayıcıda kompleks oluşumu esnasında serbest enerjinin oluşumunda etkili bir faktördür. Bu modelde, tez çalışmasında kullanılan sülfonamit türevlerinin hidrojen bağlı karbon kısmi yüklerinin mutlak değerindeki artış CAII aktivitesinin lehine ve CAIX aktivitesi aleyhine bir durum sergilemektedir.

Modeldeki son negatif katsayılı moleküler tanımlayıcı *Average Bond Order for a C-C Bond* olup, bu moleküler tanımlayıcının mutlak değerindeki artış CAIX aktivitesinin lehine CAII aktivitesi aleyhine bir durum sergilemektedir.

5.2.4. ΔpKi QSAR modeli

Çizelge 5.4' de ΔpKi QSAR modelinden elde edilen veriler tek tablo halinde verilmiştir. Bu modelinde verilen istatistiği incelendiğinde uygunluğunun oldukça iyi olmasının yanında (yüksek R^2 ve F, düşük s^2) , tahmin gücünün de iyi olduğu (yüksek R_{ext}^2 ve düşük SE) görülmektedir. Modelin dayanıklılığının yüksek olduğu ise A, B ve C alt setleri rotasyon yapıldığında modelin istatistik değerlerinde önemli bir değişimin olmadığından anlaşılmaktadır.

ΔpKi modeli D17 (intercept) dışında, üç negatif katsayılı (D14, D19 ve D21) ve iki pozitif katsayılı (D18 ve D20) beş moleküler tanımlayıcıdan oluşmaktadır. Bu modeldeki bağımlı değişkenin tanımı gereği,

$$\Delta pKi = (LogKiCAII - LogKiCAIX) \quad (5.5)$$

olmak üzere; pozitif değere sahip bir moleküler tanımlayıcı ve bu moleküler tanımlayıcının başında ki çarpan değeri de pozitif ise bu tanımlayıcının değerindeki

Çizelge 5.4. ΔpKi modeli için elde edilen tüm QSAR sonuçları.

Sülfonamid türevleri N=43 adet	1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2d, 3, 4, 5, 6, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f, 8g, 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9f, 9g, 9h, 9i, 9j, 9a*, 9b*, 9c*, 9d*, 9e*, 9f*, 9g*, 9h*, 9i*, 9j*
A Seti N=14 adet	1b, 1c, 1d, 7b, 8a, 8b, 8e, 8g, 9a, 9b, 9d, 9e*, 9f*, 9i*
B Seti N=14 adet	1a, 1e, 2d, 4, 6, 7a, 8f, 9c*, 9d*, 9f, 9g, 9g*, 9h*, 9i
C seti N=14 adet	1f, 2a, 2b, 3, 7c, 8c, 8d, 9a*, 9b*, 9c, 9e, 9h, 9j, 9j*
Not: 5 nolu sülfonamid türevi outlier olarak seçildi.	

İstatistik							
Eğitim Seti	**R^2**	**Q^2**	**F**	**s^2**	**Test Seti**	**$R_{ext.}^2$**	**SE**
A+B	0,849	0,538	24,877	0,277	C	0,722	0,595
A+C	0,823	0,675	20,591	0,304	B	0,813	0,560
B+C	0,799	0,676	17,581	0,339	A	0,817	0,522

QSAR denkleminde yer alan moleküler tanımlayıcıların katsayı ve t-testi değerleri						
Moleküler tanımlayıcı	**Katsayı**			**t-testi**		
Intercept	-1,732	1,235	-1,585	-0,959	0,409	-0,800
Balaban Index J	5,559	4,595	6,242	6,941	4,130	6,777
Average Bond Order for a C-C Bond	-9,023	-10,031	-10,329	-7,542	-6,001	-6,234
Fractional Minimum Zefirov Negative Charge	-11,271	-7,983	-10,295	-4,761	-3,326	-4,484
YZ Shadow / YZ Rectangle	5,767	5,229	5,338	3,350	3,361	3,201
Zefirov Charges' Quadrupole Moment Eigenvalue, Smallest	-0,165	-0,156	-0,195	-4,378	-3,879	-2,765

QSAR Denklemi
$y = -1{,}732 + 5{,}559 \times \mathbf{D18} - 9{,}023 \times \mathbf{D14} - 11{,}271 \times \mathbf{D19} + 5{,}767 \times \mathbf{D20} - 0{,}165 \times \mathbf{D21}$

artışın CAII aktivitesindeki artışla doğru CAIX aktivitesindeki artışla ters orantılı olması anlamına gelmektedir. Moleküler tanımlayıcı negatif katsayıya sahip olursa yukarıda bahsedilen durumun tam tersi gerçekleşecektir.

ΔpKi modelinde yer alan pozitif katsayılı iki moleküler tanımlayıcı *Balaban Index, J* ve *YZ Shadow / YZ Rectangle*' dir. Bunlardan birincisi topolojik ikincisi ise geometrik moleküler tanımlayıcıdır.

Birinci moleküler tanımlayıcı olan, Balaban indeksi;

$$J = (M/\mu + 1)\sum_{bonds}(S_i S_j)^{-1/2} \quad (5.6)$$

olarak tanımlanır. Burada *M* moleküler grafikteki bağ sayısı, μ moleküler grafikteki siklomatik sayı ve $S_i S_j$ *(i=1, 2, 3…N; N* moleküler grafikteki köşe sayısı) atomlar arası mesafeler toplamı olarak ifade edilir. Bu moleküler tanımlayıcı ilk bakışta moleküldeki atom sayısı büyüdükçe değerinin de büyümesi beklenir ama moleküler hacim ve yüzey alanı ile doğru orantılı değildir. Yorumlaması hiç kolay olmayan bir tanımlayıcıdır. Çalışmada yer alan moleküller için **1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f**, **3**, **4**, **5** ve tüm **9** ilebaşlayanlar için yüksek tüm **7** ve **8'** ler için görece daha düşük değerdedirler.

Çalışılan moleküllerde Balaban indeksinin değerinin artışı CAIX lehine aktiviteyi artırmaktadır. Bu moleküler tanımlayıcı ile CAII veya CAIX aktivitesi tek başına ele alınarak regresyon yapıldığında katsayı negatif görünmektedir. Yani sülfonamit türevlerinde CAII ve CAIX aktivitesi ile bu moleküllerin Balaban indeksi değerleri arasında doğrusal olmayan bir ilişki vardır. Buna karşı aktivitelerin farkı alındığında dorusal bir ilişki görülmektedir.

İkinci pozitif katsayılı moleküler tanımlayıcı *YZ Shadow / YZ Rectangle*' dir. Bu moleküler tanımlayıcının anlamı, molekülün Y ve Z aksislerinin oluşturduğu düzlemdeki gölgenin yüzey alanının, bu aksislerin oluşturduğu düzlemdeki atomlardan uç noktada bulunan atomlardan gecen dikdörtgen çizildiğinde bu dikdörtgenin alanına oranıdır. Molekülün dallanması durumunda gölge alanı

dikdörtgen alanından daha az artacağı için bu tür moleküllerde görece bu tanımlayıcının değeri küçük olacaktır.

ΔRpKi modelinde yer alan negatif katsayılı üç moleküler tanımlayıcı *Average Bond Order for a C-C Bond, Fractional Minimum Zefirov Negative Charge* ve *Zefirov's Charge Quadrupole Moment Eigenvalue, Smallest*' tır. Bunlardan birincisi RpKi modelinde olduğu gibi bu modelde de negatif katsayısı ile yerini almakta olup, bu moleküler tanımlayıcının mutlak değerindeki artış CAIX aktivitesinin lehine CAII aktivitesi aleyhine bir durum sergilemektedir.

Diğer iki moleküler tanımlayıcı da molekülün üzerindeki yük dağılımı ile ilgilidir. Molekülü oluşturan atomların heterojenliği (kısmi yük dağılımı) artıkça bu iki moleküler tanımlayıcının mutlak değeri de artacağından, bu artış CAIX lehine seçiciliği arttırması beklenir.

5.3. Docking Analizleri

Çalışma setinde bulunan moleküllerden **7b**, **7c**, **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** ve **8f** numaralı indan sulfonamitler CAII aktif sitesine dock edildi. Bu ligantların seçilmesinin sebebi yapısal olarak birbirinin yakın analogları olmasına rağmen aktivitelerindeki radikal farklılıklar olmasıdır. Örneğin **7b**' nin CAII aktivitesi 32 nMol iken **8c**' nin biyolojik aktivitesi 490 nMol olup yaklaşık 15 kat daha düşük değerdedir. Benzer şekilde **8c**' nin CAIX aktivitesi 33 nMol iken **8d**' nin biyolojik aktivitesi 2015 nMol olup yaklaşık 61 kat daha düşük değerdedir. Yine aynı şekilde; **8a**'nın CAII aktivitesi 0,9 nMol iken, CAIX aktivitesi 282 nMol olup yaklaşık 313 kat daha düşük değerdedir**.**

8a' nın x-ışınları kristallografi yapısı (2QO8) ile bu tez çalışmasında yapılan doking sonucunda elde edilen yapısı arasında oldukça iyi bir uyum söz konusu olup, RMSD değeri 1,17 Å olarak bulundu. Bu ligant, tüm sülfonamitler gibi (baş tarafından, SO_2NH) THR199 aminoasidi ile iki hidrojen bağı ve H üzerinden Zn koordinasyonu yanında kuyruk tarafından birçok aminoasit ile de van der Waals etkileşimi gerçekleştirmektedir.

Çalışmaya konu olan diğer tüm ligantların aksine **8a**' nın kuyruk bölümünün bir kolunun yönelimi aktif sitenin hidrofobik bölümüne yöneldiği gözlenmektedir. Kuyruğun hidrofobik bölümüne yönelen bölümü VAL135, LUE204 ve PRO202 aminoasitleri ile van der Waals etkileşimi yaptığı gözlenmektedir.

Docking çalışması sonucu seçilen sekiz adet ligantın 2QO8 CAII ve 5FL6 CAIX enzimleri ile olan etkileşimlerinin ve ligantın aktif bölgedeki yerleşiminin, *BioVia DiscoveryStudioVisualizer* programı ile elde edilen ekran görüntüleri EK-1' de verilmiştir.

5.3.1. 7b sülfonamidinin docking analizi

7b' nin CAII ve CAIX ile yaptığı başlıca etkileşimler çizelge 4.6 ve çizelge 4.7' de gösterilmektedir. Bu ligant, her iki izoform ile ZBF etkileşimini gerçekleştirdiği gözlenmiştir, yani; THR199 (CAIX' da THR200) aminoasidi ile iki hidrojen bağı ve Zn ile koordinasyon bağı yapıyor. Ligantın linker (halka ve kuyruk arasındaki köprü, HN-C=O bölümü) bölgesindeki oksijen (O-18) CAII' de ASN67 ve GLN82 ile CAIX' da HIS67 ile hidrojen bağı yaptığı gözleniyor. CAII' de LUE198, HIS64 ve VAL121 ligantın indan halkası ile van der Waals etkileşim mesafesinde olduğu gözlenmektedir.

İndan halkası LUE198 ve VAL121 ile alkil-pi, HIS64 ile T şekilli pi-pi etkileşimi sergilediği gözlenmektedir. CAIX' da yukarıda bahsedilen üç etkileşimden biri korunurken (LUE199 ile alkil-pi etkileşimi) ZBF bölgesindeki kükürt atomunun TRP210 ile kükürt-pi etkileşimi sergilediği görülmektedir. CA II' de ligantın kuyruk halkası HIS64 ile alkil-pi ve ALA65 ile alkil etkileşimi sergilediği gözlenirken CAIX' da hem HIS94 hem de HIS68 ile alkil-pi etkileşimi sergilemektedir.

5.3.2. 7c sülfonamidinin docking analizi

7c' nin ZBF etkileşimleri CAII ve CAIX'da benzer şekilde olup, oksijen ve azota bağlı hidrojen atomu üzerinden iki adet hidrojen bağı (CAII' de THR199 ve CAIX' da

THR200 ile) kurmaktadır. Ayrıca kükürt atomu da CAII' de TRP209, CAIX' da TRP210 aminoasitleri ile kükürt-pi etkileşimi sergilemektedir.

7c' nin indan halkası CAII'de LUE198 aminoasidi ile sigma-pi etkileşimi sergilerken, CAIX' da benzer şekilde LUE199 aminoasidi ile alkil-pi etkileşimi ve ligantın kendi florlanmış kuyruktaki fenil halkasıyla da T şekilli pi-pi etkileşimi sergilemektedir. **7c**'nin köprü bölgesindeki oksijen CAII' de GLN92 ile CAIX' da GLN71 aminoasidi ile zayıf hidrojen bağı (yaklaşık 2,15 Å) kurduğu gözlenmektedir. Kuyruk kısmındaki florlanmış fenil halkası CAII, HIS64, ALA65 ve ASN67 aminoasitleri ile halojen etkileşimi sergilemektedir. Ayrıca, HIS64 ile florlanmış fenil T şekilli pi-pi etkileşimi içinde olduğu gözlenmektedir. CAIX' da ki durum ise GLN71 aminoasidi ile halojen etkileşimi VAL130 aminoasidi ile alkil-pi etkileşimi sergilediği gözlenmektedir.

5.3.3. 8a sülfonamidinin docking analizi

8a' nın ZBF etkileşimleri hem CAII hem de CAIX için **7c**' de olduğu gibidir. **8a**' nın indan halkası CAII' de LUE198 aminoasidi ile sigma-pi etkileşimi sergilerken, CAIX' da benzer şekilde LUE199 aminoasidi ile alkil-pi etkileşimi sergilemektedir. Köprü bölgesindeki hidrojen bağ yapma kabiliyeti olan oksijen, CAII' de bir bağ kurmamışken CAIX' da GLN92 aminoasidi ile hidrojen bağı yaptığı gözlenmektedir.

8a' nın kuyruk bölgesinin aktif site içerisindeki yönelimi de CAII ve CAIX' da oldukça farklılaşmaktadır. CAII' de kuyruk belgesinin her iki kolu da aktif sitenin hidrofobik yüzeyine yönelerek PHE131 aminoasidinin yan zincirindeki fenil halkası ile güçlü alkil-pi etkileşimi sergilerken, CAIX' da PHE131 aminoasidi olmadığından **8a** kuyruk kısmıyla beraber hidrofobik yüzeyden görece daha uzak bir lokasyonda bulunmaktadır. Belki de **8a**' nın CAII aktivitesinin CAIX aktivitesine göre yüzlerce kat fazla olması bununla açıklanabilir.

5.3.4. 8b sülfonamidinin docking analizi

8b' nin ZBF etkileşimleri hem CAII hem de CAIX için **8a**' da olduğu gibidir. **8a**' nın indan halkası CAII' de LUE198 aminoasidi ile sigma-pi ve VAL131 aminoasidi ile alkil-pi etkileşimi sergilerken, CAIX' da benzer şekilde sadece LUE199 aminoasidi ile alkil-pi etkileşimi sergilemektedir. Köprü bölgesindeki oksijen, CAII' de ve CAIX' da bir bağ kurmamışken diğer ligantlardan farklı olarak **8b**' nin köprü bölgesindeki azota bağlı hidrojen CAIX' da PRO202 aminoasidi ile hidrojen bağı yaptığı gözlenmektedir.

8b' nin kuyruk kısmındaki siklohekzan halkası CAIX' da TRP9 aminoasidi ile alkil-pi, PRO202 ve PRO203 aminoasitleri ile alkil etkileşimi sergilerken, CAII' de sadece HIS64 aminoasidi ile alkil-pi etkileşimi sergilemektedir. HIS64 aminoasidinin iç ve dış iki konformasyonda salındığını düşündüğümüzde bu etkileşimin görece CAIX' da olan etkileşimlerden daha az olduğu söylenebilir. Bununda **8b**' nin CAIX aktivitesinin CAII aktivitesine göre daha yüksek olmasını açıklamakta bir faktör olduğu düşünülebilir.

5.3.5. 8c sülfonamidinin docking analizi

8c' nin ZBF etkileşimleri hem CAII hem de CAIX için **8b**' de olduğu gibidir. Bu ligantın indan halkasının CAII ve CAIX enzimleri içinde oldukça farklılık göstermektedir. CAIX' da sadece alkil-pi etkileşimi mevcut iken CAII' de LEU198 aminoasidi ile pi-sigma, VAL121 aminoasidi ile alkil-pi ve HIS94 aminoasiti ile T şekilli pi-pi etkileşim sergilemektedir. Ayrıca ligantın kuyruk bölümündeki florlanmış fenil halkası da indan halkasıyla T şekilli pi-pi etkileşim göstermektedir.

Ligantın köprü bölgesindeki N ve O atomlarının sergilediği etkileşimlerde oldukça farklıdır. CAIX' da azota bağlı hidrojen PRO202 aminoasidinin oksijeni ile hidrojen bağı yaparken CAII' de köprü atomları enzim ile bir etkileşim sergilememektedir. Buna karşın florlanmış fenil halkasındaki florlar ile çevre aminoasitler (THR200, PRO201, ASN62, ASN67 ve GLN92) arasına halojen

etkileşimi gözlenmektedir. Bu ligantın görece CAIX' a karşı CAII' ye karşı yüksek aktivitesi indan halkası ve kuyruktaki fenil halkasının CAII aktif sitesi içerisinde daha fazla etkileşim yapmasıyla açıklanabilir.

5.3.6. 8d sülfonamidinin docking analizi

8d ligantının ZBF etkileşimleri hem CAII hem de CAIX için **8c**' de olduğu gibidir. Öncelikle dikkat edilmelidir ki; bu ligantın CAII aktivitesi oldukça yüksek (K_i=10 nM) iken CAIX aktivitesi görece (K_i=2015) daha düşüktür. Bu ligantın indan halkası CAII ve CAIX enzimleri içinde oldukça farklılık göstermektedir. Indan halkası CAIX'da sadece LEU199 aminoasidi ile pi-alkil etkileşimi sergilerken CAII' de HIS94 aminoasidi ile T şekilli pi-pi, LEU198 aminoasidi ile sigma-pi ve VAL121 aminoasidi ile de alkili-pi etkileşimi sergilemektedir.

Ligantın köprü bölgesindeki N ve O atomlarının, CAII' de oksijen atomu GLN92 aminoasidi ile hidrojen bağı kurarken azot atomu bir bağ yapmıyor, CAIX' da ise oksijen atomu TRP9 aminoasidi ile azota bağlı hidrojen ise PRO202 aminoasidi ile hidrojen bağı yapmaktadır.

Ligantın kuyruk bölgesindeki etkileşimlere gelince, CAIX' da ligantın CH_3 metil grubu PRO203 aminoasidi ile sadece uzun mesafeli (5,04 Å) bir alkil etkileşimi sergilerken CAII' de CH_2 grubu PHE131 aminoasidi ile sigma-pi, CH_3 grubu PHE131 aminoasidi ile alkil-pi ve CH_3 grubu ILE91 aminoasidi ile alkil etkileşimi sergilemektedir.

5.3.7. 8e sülfonamidinin docking analizi

8e ligantının yapısının **8d** ligantın yapısından farkı, kuyruk bölgesinde CH_2 zincirinin bir birim daha uzun olmasıdır. Bu ligantın ZBF, indan halkası ve köprü bilgesindeki O ve N atomlarının yaptığı tüm etkileşimler **8e**' deki etkileşimlerle aynı olduğu gözlenmektedir. Kuyruk bölgesindeki etkileşimler ise CAII' de CH_3 grubu

ILE91 aminoasidi ile alkil etkileşimi sergilerken, CAIX' da CH_3 grubu TRP9 aminoasidi ile pi-alkil ve PRO202 aminoasidi ile alkil etkileşimi sergilemektedir.

8e ligantı, **8d** ligantı ile birlikte değerlendirildiğinde her iki ligantın da CAII aktivitelerinin yüksek, CAIX aktivitelerinin ise düşük olduğu gözleniyor. Bu iki ligantın indan halkalarının CAII aktif sitesi içerisinde yaptığı çoklu etkileşimler aktiviteyi domine ettiği anlaşılmaktadır.

5.3.8. 8f sülfonamidinin docking analizi

8f ligantının ZBF etkileşimleri hem CAII hem de CAIX için **8e** ligantının docking mekanizmasında olduğu gibidir. Indan halkasının CAIX aktif sitesi içerisindeki etkileşimi sadece VAL121 aminoasidi ile alkil-pi etkileşimi olarak gözlenirken, köprü bölgesinin O ve N'ye bağlı hidrojen atomunun çevre aminoasitlerle hidrojen bağı kurduğu gözlenmektedir.

Kuyruk bölgesindeki CH_3 grubu VAL20, PRO202 ve PRO203 aminoasitleri ile alkil etkileşimi ve TRP9 aminoasidi ile pi-alkil etkileşimi içerisinde olduğu gözlenmektedir. Tüm bu etkileşimlerin toplamı bu ligantın CAIX aktivitesinin K_i=3,4 nM olmasını açıklamakta yeterli olurken, CAII aktif sitesi içerisinde az sayıda etkileşim sergilemesine rağmen CAII aktivitesinin de yüksek (K_i=7,6 nM) olmasının eldeki bilgilerle açıklanması mümkün değildir. Belki de CAII aktif sitesi içerisinde bağlanma pozu olarak seçilen konformasyonun doğru bir seçim olmadığı düşünülebilir.

5.4. Sonuç ve Değerlendirme

Karbonik anhidraz enzim inhibitörü deneysel aktivite verileri bilinen 43 sülfonamit türeviyle yürütülen QSAR ve bunlardan 8 tanesi ile yürütülen moleküler docking simülasyonları sonucunda yeni aktivitesi ve seçiciliği yüksek sülfonamitlerin tasarımında kullanılabilecek modeller oluşturuldu. Bunlar kısaca özetlenecek olursa;

1) CAII inhibitörü sülfonamitlerin kimyasal çeşitleme ile elde edilecek yeni türevlerin tasarımında kullanılabilecek QSAR modelinin istatistik verileri oldukça iyi düzeydedir. (eğitim seti; n=28, R^2 =0,80, Q^2=0,69, F=23,64, s^2=0,33, test seti n=14, $R^2_{ext.}$=0,75 ve SE=0,57)

2) CAIX inhibitörü sülfonamitlerin kimyasal çeşitleme ile elde edilecek yeni türevlerin tasarımında kullanılabilecek QSAR modellerinin istatistik verileri de mükemmele yakın düzeydedir. (eğitim seti; n=28, R^2 =0,94, Q^2=0,89, F=72,32, s^2=0,11, test seti n=14, $R^2_{ext.}$=0,95 ve SE=0,32)

3) Çalışılan sülfonamit gruplarının yeni türevlerinin CAII aktivitesinin mi CAIX aktivitesinin mi yüksek olduğunu tanımlamamızı sağlayacak seçici RpKi-CAII/CAIX modelinin istatistik verileri de oldukça iyi düzeydedir. (eğitim seti; n=28, R^2 =0,86, Q^2=0,73, F=28,24, s^2=0,0051, test seti n=14, $R^2_{ext.}$=0,75 ve SE=0,08)

4) CAII ya da CAIX aktivitesinin seçiciliğini ortaya koymada kullanılabilecek bir diğer QSAR modelinin ΔpKi-(CAII-CAIX) de istatistik verileri de oldukça iyi düzeydedir. (eğitim seti; n=28, R^2 =0,84, Q^2=0,53, F=24,87, s^2=0,27, test seti n=14, $R^2_{ext.}$=0,72 ve SE=0,59).

Yukarı da verilen bu modeller çalışmaya konu olan diazenil benzensülfonamit, sülfonat, 1-aril-6, 7-dimetoksi-1, 2, 3, 4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamid ve 1-aril-6-metoksi-l, 2, 3, 4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamidlerin yeni türevlerinin CAII ve CAIX enzim inhibisyon aktivitelerinin tahminin de kullanılabilir.

Ayrıca moleküler docking çalışmasına konu olan **7b**, **7c**, **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, **8e** ve **8f** numaralı indan sulfonamitlerin CAII ve CAIX aktif sitesi içindeki yerleşimleri analiz edildiğinde aktiviteyi ve seçiciliği etkileyen bazı etkileşimlerin varlığı ortaya konulabildi. Örneğin **8c** ve **8d** ligantları CAII aktiviteleri bir birine yakın değerde (**8c**-K_i=6,7 nM, **8d**-K_i=10 nM) iken CAIX aktiviteleri arasında büyük derecede (**8c**-K_i=33 nM, **8d**-K_i=2015 nM) fark vardır. Docking analizlerinde **8c**' nin her iki izoenzim

içerisinde de indan halkasının yaptığı ligantın enzim içerisindeki kalıcılığını artırıcı etkileşimlerinin yanında, ligantın kuyruk bölgesini oluşturan florlanmış fenil halkası vasıtasıyla tutuculuğunu artırıcı halojen etkileşimleri sergilediği gözlenmektedir.

8d ligantı incelendiğinde ise indan halkasının yaptığı etkileşimler her iki izoenzim için, **8c** ile benzerlik gösterirken kuyruk bölgesinin etkileşimleri oldukça farklılık göstermektedir. CAII aktif sitesinde **8d**'nin kuyruk bölgesindeki CH_2 ve CH_3 grubu PHE131 aminoasidinin fenil halkasıyla alkil-pi etkileşimi ile stabilize olurken, CAIX içerisinde bu grup bir etkileşim sergilememektedir (CAIX aktif sitesinde PHE131 aminoasidi mevut değildir). **8d**' nin **8c**' ye göre CAIX aktivitesindeki kat ve kat düşüklük belki de bu etkileşim eksikliği ile açıklanabilir.

Diğer yandan **7c** ile **8c**' nin CA II aktiviteleri kıyaslandığında (**7c**-K_i=490 nM, **8c**-K_i=6,7 nM) seksen kattan daha fazla bir fark olduğu görülmektedir. **7c** ile **8c**' nin yapısal farklı, **7c**' de köprü (linker) grubu indan halkasının 1 pozisyonuna bağlıyken **8c**' de 2 pozisyonuna bağlı olmasıdır. Bu yapısal fark bu ligantların CAII ve CAIX aktif sitesi içerisindeki lokasyonunu bir miktar değiştirmektedir (bakınız bölüm 4 şekil 4.3).

CAII aktif sitesi içerisindeki Docking pozlarındaki etkileşimler incelendiğinde **7c** ve **8c**' nin kuyruk bölgesindeki sergilediği etkileşimler benzer iken **7c**' nin indan halkasının tutuculuğunu artıran etkileşimlerinin eksik olduğu gözlenmektedir. Belki de bu etkileşim eksikliği **7c**' nin CAII aktivitesinin **8c**' ye göre kat ve kat eksik olmasını açıklamaktadır. **7c**' nin CAIX aktivitesinin ise oldukça (7c-K_i=3,5 nM) yüksek olduğu gözlenmektedir. **7c**' nin Docking analizi ise bu yüksek aktivite değeri ile uyum içerisindedir. Ligantın indan halkası, hidrojen bağı yapan köprü atomlar ve kuyruk bölgesindeki florlanmış fenil halkası çevre aminoasitler ile tutuculuğunu artırıcı birçok etkileşim sergilediği gözlenmektedir.

Sonuç olarak hem QSAR modellerinden hem de docking analizlerinden elde edilen bilgiler seçiciliği ve aktivitesi yüksel diazenil benzensülfonamit, 1-aril-6, 7-

dimetoksi-1, 2, 3, 4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamit ve 1-aril-6-metoksi-l, 2, 3, 4-tetrahidroizokinolin-2-sülfonamit türevlerinin tasarımında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

ABBATE, F., CASİNİ, A., OWA, T., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C. T., 2004. Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. Bioorg. Med. Chem, Lett.,14(1):217-223.

AGRAWAL, V. K., SHARMA, R. and KHADIKAR, P. V., 2002. QSAR studies on carbonic anhydrase inhibitors: a case of ureido and thioureido derivatives of aromatic/heterocyclic sulfonamides. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 10(9): 2993-2999.

ALTERIO V, HILVO M, DI FIORE A, SUPURAN CT, PAN P, PARKKILA S, SCALONI A, PASTOREK J, PASTOREKOVA S, PEDONE C, SCOZZAFAVA A, MONTI SM and DE SIMONE G., 2009. Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Tumor-Associated Human Carbonic Anhydrase IX. Proc Natl Acad Sci., 38:16233-8.

ALTERIO, V., DI FIORE, A., D'AMBROSIO, K., SUPURAN, C. T. and DE SIMONE, G., 2012. Multiple binding models of inhibitors carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. Chemical Review, 112(8): 4421-4468.

BECKE, A. D., 1993. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. J. Chem. Phys., 98 (2): 1372-1377.

BERNADAT, G., SUPURAN, C.T., IORGA, B. I., 2013. Carbonic anhydrase binding site parameterization in OPLS-AA force field. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21(6):1427-30.

BORN, M., and OPPENHEIMER, J. R., 1954. Zur Quantentheorie der Moleküln, Ann. Phys., 84: 457-484.

BOYLUĞ, Z. E., 2016. Yoğunluk Fonksiyonel Teori Temelli Kantitatif Yapi-Etki Analizleri (QSAR): Kumarin Moleküllerinin Karbonik Anhidraz Enzimine Karşi İnhibisyon Etkisinin Modellenmesi. Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 129s.

BRAHIMI-HORN, M. C. and POUYSSEGUR, J., 2007. Hypoxia in cancer cell matbolism and pH regulation. Essays Biochemistry, 43: 165-178.

BREIMAN, L. and FRIEDMAN, J. H., 1985. Estimating Optimal Transformations for Multiple Regression and Correlation. Journal of the American Statistical Association, 80(391): 580–619.

CAM I. B., YORULMAZ N., YASAR M. M., EROGLU E., 2019. Development of Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Models of Aspartyl-Derivatives Based on Eigenvalues (EVA) of Calculated Vibrational Spectra. Food Biophysics, 14(3):300-312.

CARTA F., POTHEN B., MARESCA A., TIWARI M., SINGH V. and SUPURAN C. T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of cytosolic carbonic anhydrase isozymes II and VII with simple aromatic sulfonamides and some azo dyes. Chem. Biol. Drug. Des., 74(2):196-202.

CARTA F., MARESCA A., SCOZZAFAVA A., VULLO V. and SUPURAN C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Diazenylbenzenesulfonamides are potent

and selective inhibitors of the tumor-associated isozymes IX and XII over the cytosolic isoforms I and II. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17: 7093-7099.
CLARE, B. W. and SUPURAN, C. T., 1994. Carbonic-Anyhdrase Activators.Part 3. Structure-Activity Correlations of a Series of Isozyme-II Activators. Journal of Pharmaceutical Sciences, 83(6): 768-773.
CLARE, B. W. and SUPURAN, C.T., 1997. Carbonic anhydrase inhibitors.Part 41. Quantitative structure-activity correlations involving kinetic rate constants of 20 sulfonamide inhibitors from a non-congeneric series. Europan Journal of Medicinal Chemistry, 32(4): 311-319.
CLARE, B. W. and SUPURAN, C.T., 1999. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 61.Quantum chemical QSAR of a group of benzenedisulfonamides. Europan Journal of Medicinal Chemistry, 34(6): 463-474.
CLARE, B. W. and SUPURAN, C.T., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 86. A QSAR study on some sulfonamide drugs which lower intra-ocular pressure, using the ACE non-linear statistical method. European Journal of Medicinal Chemistry, 35(9): 859−865.
CLARE, B. W. and SUPURAN, C.T., 2005. Predictive flip regression: A technique for QSAR of derivatives of symmetric molecules. Journal of Chemical Information and Modeling, 45(5): 1385-1391.
CLARE, B. W. and SUPURAN, C.T., 2005. A physically interpretable quantum-theoretic QSAR for some carbonic anhydrase inhibitors with diverse aromatic rings, obtained by a new QSAR procedure. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13(6): 2197-2211.
CORNELL W. D., CIEPLAK P., BAYLY C. I., GOULD I. R., MERZ K. M. JR., FERGUSON D. M., SPELLMEYER D. C., FOX T., CALDWELL J. W., KOLLMAN P. A., 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. J. Am. Chem. Soc. 117 (19): 5179–5197.
COTTON, F. A., 1971. Chemical Applications of Group Theory. Wiley, London, 228.
DE BENEDETTI, P. G., MENZIANI, M. C. and FRASSINETI, C., 1985. A Quantum Chemical QSAR Study of Carbonic Anhydrase Inhibition by Sulfonamides Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors: Quantum Chemical QSAR. Quantitative Structure-Activity Relationships, 4(1): 23-28.
DE SIMONE, G., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C. T., 2009. Which carbonic anyhdrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfomates?. Chemical Biology and Drug Design, 74(3): 317-321.
DIMITROV, S., DIMITROVA, G., PAVLOV, T., DIMITROVA, N., PATLEWICZ, G., NIEMELA, J., MEKENYAN, O., 2005. A stepwise approach for defining the applicability domain of SAR and QSAR models. Journal of chemical information and modeling, 45(4): 839-849.
ELDEHNA W. M., AL-ANSARY G. H., BUA S., NOCENTINI A., GRATTERI P., ALTOUKHY A., GHABBOUR H., AHMED H. Y. and SUPURAN C. T., 2017. Novel indolin-2-one-based sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, in vitro biological evaluation against carbonic anhydrases isoforms I, II, IV and VII and molecular docking studies. Eur J. Med. Chem., 127:521-530.
ERIKSSON, L., JAWORSKA, J., WORTH, A. P., CRONIN, M. T., MCDOWELL, R. M., GRAMATICA, P. 2003. Methods for reliability and uncertainty

assessment and for applicability evaluations of classification and regression-based QSARs. Environ. Health Perspect, 111:1361-75.

FIDAN I, SALMAS RE, ARSLAN M., ŞENTÜRK M., DURDAGI S., EKINCI D., ŞENTÜRK E., COŞGUN S. and SUPURAN C. T., 2015. Carbonic anhydrase inhibitors: Design, synthesis, kinetic, docking and molecular dynamics analysis of novel glycine and phenylalanine sulfonamide derivatives. Bioorg. Med. Chem., 23(23):7353-8.

FORESMAN J. B., FRISCH A., 1996. Exploring Chemistry with Elektronic Structure Methods. Gaussian, Inc, Pittsburgh, PA. 302.

FRISCH, M. J., TRUCKS, G. W., SCHLEGEL, H. B., SCUSERIA, G. E., ROBB, M. A., CHEESEMAN, J. R., SCALMANI, G., BARONE, V., MENNUCCI, B., PETERSSON, G. A., NAKATSUJI, H., CARICATO, M., LI, X., HRATCHIAN, H. P., IZMAYLOV, A. F., BLOINO, J., ZHENG, G., SONNENBERG, J. L., HADA, M., EHARA, M., TOYOTA, K., FUKUDA, R., HASEGAWA, J., ISHIDA, M., NAKAJIMA, T., HONDA, Y., KITAO, O., NAKAI, H., VREVEN, T., MONTGOMERY JR., J. A., PERALTA, J. E., OGLIARO, F., BEARPARK, M., HEYD, J. J., BROTHERS, E., KUDIN, K. N., STAROVEROV, V. N., KOBAYASHI, R., NORMAND, J., RAGHAVACHARI, K., RENDELL, A., BURANT, J. C., IYENGAR, S. S., TOMASI, J., COSSI, M., REGA, N., MILLAM, J. M., KLENE, M., KNOX, J. E., CROSS, J. B., BAKKEN, V., ADAMO, C., JARAMILLO, J., GOMPERTS, R., STRATMANN, R. E., YAZYEV, O., AUSTIN, A. J., CAMMI, R., POMELLI, C., OCHTERSKI, J. W., MARTIN, R. L., MOROKUMA, K., ZAKRZEWSKI, V. G., VOTH, G. A., SALVADOR, P., DANNENBERG, J. J., DAPPRICH, S., DANIELS, A. D., FARKAS, O., FORESMAN, J. B., ORTIZ, J. V., CIOSLOWSKI, J., FOX, D. J., 2009. Gaussian, Inc. Wallingford CT.

GAO, B.B., CLERMONT, A., ROOK, S., FONDA, S. J., SRINIVASAN, V. J., WOJTKOWSKI, M., FUJIMOTO, J. G., AVERY, R. L., ARRIGG, P. G.,BURSELL, S.E., AIELLO, L. P. and FEENER, E. P., 2007. Extracellular carbonic anyhrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. Nature Medicine, 13(2): 383-392.

GITTO R., DAMIANO F. M., LUCA L. M., FERRO S., VULLO D., SUPURAN C. T. and CHIMIRRI C., 2011. Synthesis and biological profile of new 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines as selective carbonic anhydrase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 19: 7003-7007.

GOHLKE, H. and KLEBE, G., 2002. Drug Score meets CoMFA: adaptation of fields for molecular comparison (AFMoC) or how to tailor knowledge-based pair-potentials to a particular protein. Journal of Medicinal Chemistry, 45(19): 4153-4170.

GOLDEN, J. B., 2003. Prioritizing the human genome: knowledge management for drug discovery. Current Opinion in Drug Discovery and Development, 6(3): 310-316.

GÜLER, S., 2005. Bazi moleküllerin fizikokimyasal özellikleri ile biyolojik aktivitesi arasındakı ilişkinin QSAR yöntemi ile araştırılması. Harran üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 108s.

GÜMÜŞTÜFEK, İ., 2013. 2–Fenilbenzimidazolasit Molekülünün Titreşimsel Spektrumlarının Teorik ve Deneysel Yöntemlerle İncelenmesi. Nevşehir

Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65s.

HÅKANSSON, K. and LİLJAS, A., 1994. The Structure of A Complex Between Carbonic Anhydrase II And A New Inhibitor, Trifluoromethane Sulphonamide. FEBS Lett., 350(2-3): 319-322.

HOHENBERG, P. VE KOHN, W., 1964, Inhomogeneous Electron Gas. Physical Review, 136 (3B): B864-B871.

HAKEN, H., WOLF, H. C., Çeviri: Okur, İ., 2004. Molekül Fiziği ve Kuantum Kimyası. Değişim Yayınları, 4. Ed., İstanbul, 63-289.

HEN, N., BIALER, M., YAGEN, B., MARESCA, A., AGGARWAL, M., ROBBINS, A. H., MCKENNA, R., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C. T., 2011. Anticonvulsant 4-aminobenzenesulfonamide derivatives with branched-alkylamide moieties: X-ray crystallography and inhibition studies of human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, and XIV. Journal of Medicinal Chemistry, 54(11): 3977-3981.

HILLEBRECHT, A., SUPURAN, C.T. and KLEBE, G., 2006. Integrated approach using protein and ligand information to analyze selectivity- and affinity-determining features of carbonic anhydrase isozymes. Chem. Med. Chem, 1(8): 839-853.

HUANG, H., PAN, X., TAN, N., ZENG, G. and JI, C., 2007. 3D-QSAR study of sulfonamide inhibitors of human carbonic anhydrase II. European Journal of Medicinal Chemistry, 42(3): 365-372.

HUEY R., MORRIS G. M., OLSON A. J. and GOODSELL D. S., 2007. A semiempirical free energy forcefield with charge-based desolvation. J. Comput. Chem., 28(6):1145-52.

IMMING, P., SINNING, C. and MEYER, A., 2006. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. Nature Reviews.Drug Discovery, 5(10): 821-834.

IMTAİYAZ H. M., SHAJEE B., WAHEED A., AHMAD F., SLY W. S., 2013. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21(6):1570-82.

JAISWAL, M., KHADIKAR, P. V., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C. T., 2004. Carbonic Anhydrase inhibitors: the first QSAR study on inhibition of tumor-associated isoenzyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14(12): 3283-3290.

JAWORSKA, J., NIKOLOVA-JELIAZKOVA, N. ve ALDENBERG, T., 2005. QSAR applicability domain estimation by projection of the training set descriptor space: a review. Atla- Nottingham, *33*(5): 445.

KARABULUT, S., 2011. Bazı Düz Zincirli İmitlerin Sentezi, İmitlerin ve 1,3-Dikarbonil Bileşiklerinin Tautomer Oranlarının Deneysel ve Hesapsal Olarak İncelenmesi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 135s.

KEHA, E. and KÜFREVİOĞLU, İ.,2012. Biyokimya. Aktif Yayınevi, 8.baskı, 645s.

KEILIN, D. and MANN, T., 1940. Carbonic Anhydrase. Purification and Nature of the Enzyme. Biochem. J., 34(8-9): 1163-76.

KHADIKAR, P. V., SHARMA, V., KARMARKAR, S. and SUPURAN, C.T., 2005. QSAR studies on benzenesulfonamide carbonic anhydrase inhibitors: need of hydrophobic parameter for topological modeling of binding constants of

sulfonamides to human CA-II. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15(4): 923-930.

LANDRY, Y. and GIES, J. P. 2008. Drugs and their molecular targets: an updated overview. Fundamental and Clinical Pharmacology, 22(1): 1-18.

LEACH, A. R. ve GILLET, V. J., 2007. An introduction to chemoinformatics. Springer Science and Business Media, London, New York, 260s.

LICKER, M. J., 2004. McGraw-Hill Concise Encyclopedia of Chemistry. New York: McGraw-Hill. ISBN 978-0-07-143953-4, 500s.

LILJAS, A., KANNAN, K. K., BERGSTEN, P. C., WAARA, I., FRIDBORG, K., STRANDBERG, B., CARLBOM, U., JARUP, L., LEJVGREN, S. and PETEF, M., 1972. Crystal structure of human carbonic Anhydrase. Nature-New Biology, 235: 131–137.

MCQUARRIE, D. A., 1983. Quantum Chemistry. University Science Books. Oxford University Press, Oxford, 518s.

MELDRUM, N. U. and ROUGHTON, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase, its preparation and properties. The Journal of Physiology, 80(2): 113-142.

MİLLER, W. H., DESSERT, A. M. and ROBLİN, R. O. JR., 1950. Heterocyclic Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors. J. Am. Chem. Soc., 72: 4893-4896.

MORRIS G. M., HUEY R., LINDSTROM W., SANNER M. F., BELEW R. K., GOODSELL D. S. and OLSON A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor Flexibility. J. Comput. Chem. 30(16): 2785-91.

MUELLER, M. P., 2007. Fundamentals of quantum chemistry: molecular spectroscopy and modern electronic structure computations. Springer Science & Business Media, 265s.

OVERINGTON, J. P., AL-LAZIKANI, B. and HOPKINS, A. L., 2006. How many drug targets are there?. Nature Review Drug Discovery, 5(12): 993-996.

ÖZ, B.E., 2015. Yeni Sentezlenmiş Kromon Temelli Sülfonamidlerin (KTS) Sitozolik Karbonik Anhidraz I-II (Ca I-II) ve Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz IX-XII (Ca IX-XII) İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştirilmasi. Yıldırım Beyazid Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 117s.

ÖZENSOY, Ö., 2006. Kanser ile ilişkili Karbon Anhidraz IX ve XII izoenzimlerinin (CA-IX, CA-XII) ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı bileşiklere karşı inhibisyon etkilerinin araştırılması. T.C. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Balıkesir, 209s.

PACCHIANO F., AGGARWAL M., AVVARU B. S., ROBBINS A. H., SCOZZAFAVA A., MCKENNA R. and SUPURAN C. T., 2010. Selective hydrophobic pocket binding observed within the carbonic anhydrase II active site accommodate different 4-substituted-ureido-benzenesulfonamides and correlate to inhibitor potency. Chem. Commun. (Camb)., 46(44): 8371-3.

PARR, R. G., YANG W., 1989. Density Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Pres, Inc. New York. USA, 333s.

PASTOREKOVA, S., PARKKILA, S. and ZAVADA, J., 2006. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. Advances in Clinical Chemistry, 42: 167-216.

PETTERSEN E.F., GODDARD T.D., HUANG C.C., COUCH G.S., GREENBLATT D.M., MENG E.C. and FERRIN T. E., 2004. UCSF Chimera visualization sistem for exploratory research and analysis. J Comput Chem., 13: 1605-12.

PINARD M. A., BOONE C. D., RIFE B. D., SUPURAN C. T. and MCKENNA R., 2013. Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases. Bioorg. Med. Chem., 21(22): 7210-5.

POLAT, S., 2015. 4-etil-5-(2-hidroksifenil)-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-tiyon'nun yapisal ve biyolojik etkilerinin incelenmesi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 73s.

PULAY, P., 1969. Ab initio calculations of force constant and equilibrium geometries. Mol. Phys., 17: 197.

RANDIĆ, M., and JURE Z., 2001. On interpretation of well-known topological indices. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 41.3: 550-560.

ROOTHAN, C. C. J., 1951. New Developments in Molecular Orbital Theory. Rev. Mod. Phys., 23: 69.

SCHOLZ, T. H., SONDEY, J. M., RANDALL, W. C., SCHWAM, H., THOMPSON, W. J., MALLORGA, P. J., SUGRUE, M. F. and GRAHAM, S. L., 1993. Sulfonyl methane sulfonamide inhibitors of carbonic Anhydrase. Journal of Medicinal Chemistry, 36(15): 2134-2141.

STAMS, T., CHEN, Y., BARİACK-SJODİN, P. A., HURT, J. D., LİAO, J., MAY,J. A., DEAN, T., LAİPİS, P., and CHİRİSTİANSON, D. W., 1998. Protein Science.Wiley online library, 7 (3): 533-802.

SUPURAN, C. T. and CLARE, B. W., 1995. Carbonic anyhdrase Inhibitors 24. A Quantitative Structure-Activity Relationship study of positively charged Sulfonamide inhibitors. Europan Journal of Medicinal Chemistry, 30(9): 687-696.

SUPURAN, C. T. and CLARE, B. W., 1998. Carbonic anhydrase inhibitors - Part 47: Quantum chemical quantitative structure-activity relationships for a group of sulfanilamide Schiff base inhibitors of carbonic anhydrase. Europan Journal of Medicinal Chemistry, 33(6): 489-500.

SUPURAN, C. T., SCOZZAFAVA, A., ILİES, M. A., IORGA, B., CRİSTEA, T., BRİGANTİ, F., CHİRALEU, F. and BANCİU, M. D., 1998. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Part 53. Synthesis of Substituted-Pyridinium Derivatives of Aromatic Sulfonamides: The First Non-Polymeric Membrane-Impermeable Inhibitors with Selectivity for Isozyme IV. Eur. J. Med. Chem., 33: 577-594.

SUPURAN, C. T. and CLARE, B. W., 1999. Carbonic anhydrase inhibitors - Part 57: Quantum chemical QSAR of a group of 1, 3, 4-thiadiazole- and 1, 3, 4-thiadiazoline disulfonamides with carbonic anhydrase inhibitory properties. Europan Journal of Medicinal Chemistry, 34(1): 41-50.

SUPURAN, C. T. and CLARE, B. W. 2001. Orbital symmetry in QSAR: some Schiff's base inhibitors of carbonic Anhydrase. SAR and QSAR in Enviromental Research, 12(1): 17-29.

SUPURAN, C. T., SCOZZAFAVA, A. and CONWAY, J., 2004. Carbonic Anyhdrase: Its Inhibitors and Activators. Boca Raton: CRC Press, 283-302.

SUPURAN, C. T., 2008. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. Nature Review Drug Discovery, 7(2): 168-181.

SUPURAN C. T. and WINUM J.-Y., 2009. Introduction to Zinc Enzymes as Drug Targets. Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors, Chapter 1, 1-12.

SUPURAN, C. T., 2009. Carbonic Anhydrases as Drug Targets: General Presentation. Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors, Chapter 2, 13-38.

TESTA, B. and PURCELL, W. P., 1978. A QSAR Study of Sulfonamide Binding to Carbonic Anhydrase as Test of Steric Models. European Journal of Medicinal Chemistry, 13(6): 509-514.

THAKUR, A., THAKUR, M., KHADIKAR, P. V., SUPURAN, C.T. and SUDELE, P., 2004. QSAR study on benzene sulphonamide carbonic anhydrase inhibitors: topological approach using Balaban index. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 12(4): 789-793.

THIRY A., LEDECQ M., CECCHI A., DOGNE´ J.M., WOUTERS J., SUPURAN C.T. and MASEREEL M., 2006. Indanesulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors. Toward Structure-Based Design of Selective Inhibitors of the Tumor-Associated Isozyme CA IX. Journal of Medicinal Chemistry, 49: 2743-2749.

TODESCHINI, R., CONSONNI, V., 2008. Handbook of molecular descriptors. John Wiley & Sons,11: 667.

TUCCINARDI, T., NUTI, E., ORTORE, G., SUPURAN, C. T., ROSSELLO, A. and MARTINELLI, A., 2007. Analysis of Human Carbonic Anhydrase II: Docking Reliability and Receptor-Based 3D-QSAR Study. Journal of Chemical Information and Modeling, 47(2): 515-525.

TUCCINARDI, T., ORTORE, G., ROSSELLO, A., SUPURAN, C.T. ve MARTINELLI, A. 2007. Homology modeling and receptor-based 3D-QSAR study of carbonicanhydrase IX, Journal of Chemical Information and Modelling, 47(6): 2253-2262.

TURHAN IRAK, Z. Ş., 2015. Click Tepkimesi Mekanizmasinin Teorik Olarak İncelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 165s.

WEBER, A., BÖHM, M., SUPURAN, C. T., SCOZZAFAVA, A., SOTRIFFER, C. A. and KLEBE, G., 2006. 3D QSAR selectivity analyses of carbonic anhydrase inhibitors: insights for the design of isozyme selective inhibitors. Journal of Chemical Information and modeling, 46(6): 2737-2760.

WIENER, H., 1947. Structural Determination of Paraffin Boiling Points. J. Am. Chem. Soc., 69 (1): 17–20.

WILKINSON B. L., BORNAGHI L. F., HOUSTON T. A., INNOCENTI A., SUPURAN C. T. and POULSEN S. A., 2006. A novel class of carbonic anhydrase inhibitors: Glycoconjugate benzene sulfonamides prepared by click-tailing. J. Med. Chem., 49: 6539–6548.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı	**:**	Nuri YORULMAZ
Uyruğu	**:**	Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Adıyaman - 14.09.1981
Telefon	**:**	
Faks	**:**	
e-mail	**:**	nyorulmaz@harran.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, ilçe, il	Bitirme Yılı
Lise	Atatürk Lisesi, Merkez, Mersin	1999
Üniversite	Harran Üniversitesi, Merkez, Şanlıurfa	2003
Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi, Merkez, Şanlıurfa	2006
Doktora		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2005-devam	Harran Üniversitesi Fen Edb. Fak. Fizik Bölümü	Arş. Gör.

UZMANLIK ALANI

Moleküler Modelleme, Docking, QSAR, Radyasyon Güvenliği, Sağlık Fiziği,

YABANCI DİLLER

Orta Düzey İngilizce

DİĞER ÖZELLİKLER

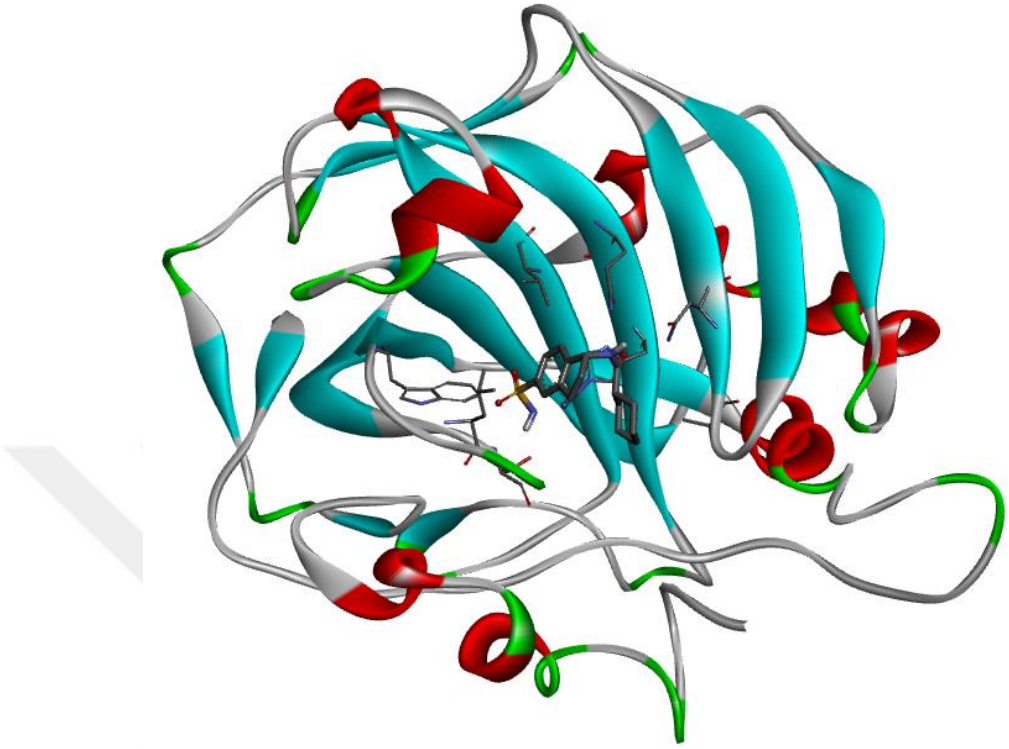
Windows ve Linux tabanlı işletim sistemi kullanımı,
MCNP (Monte Carlo N-Particle)
C++, turbo Pascal

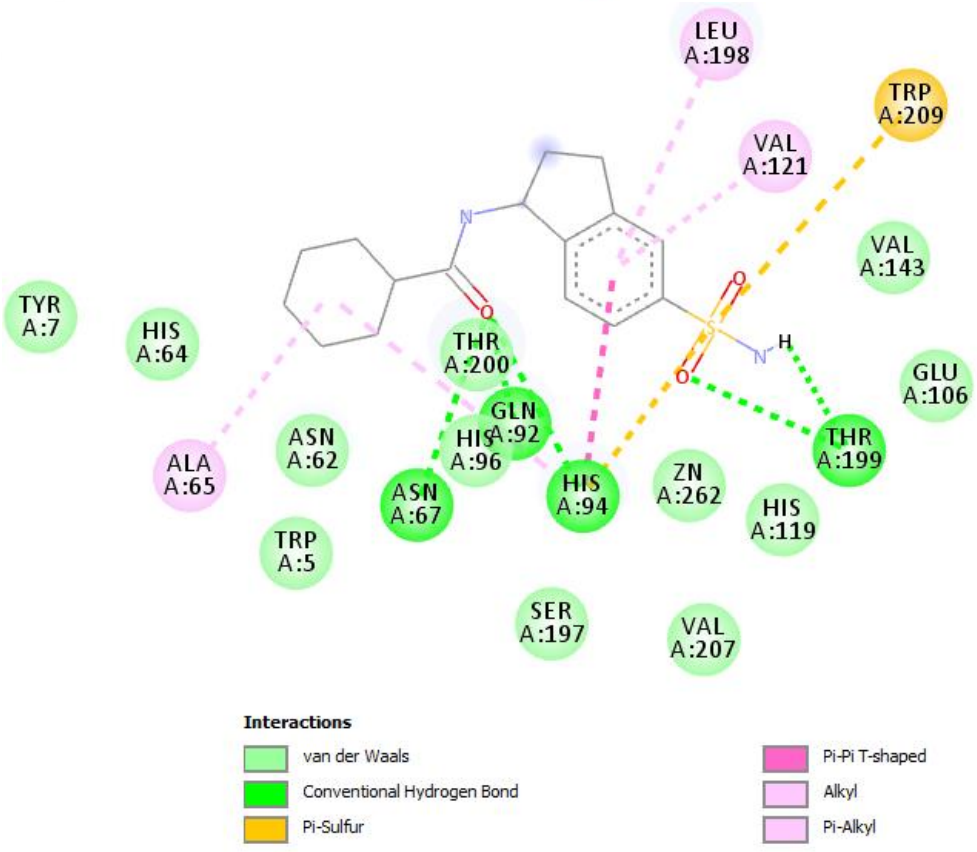
YAYINLAR

YORULMAZ, N., OLTULU, O., & EROĞLU, E., 2018. Development of selective QSAR models and molecular docking study for inhibitory activity of sulfonamide derivatives against carbonic anhydrase isoforms II and IX. Journal of Molecular Structure, 1163: 270-279.

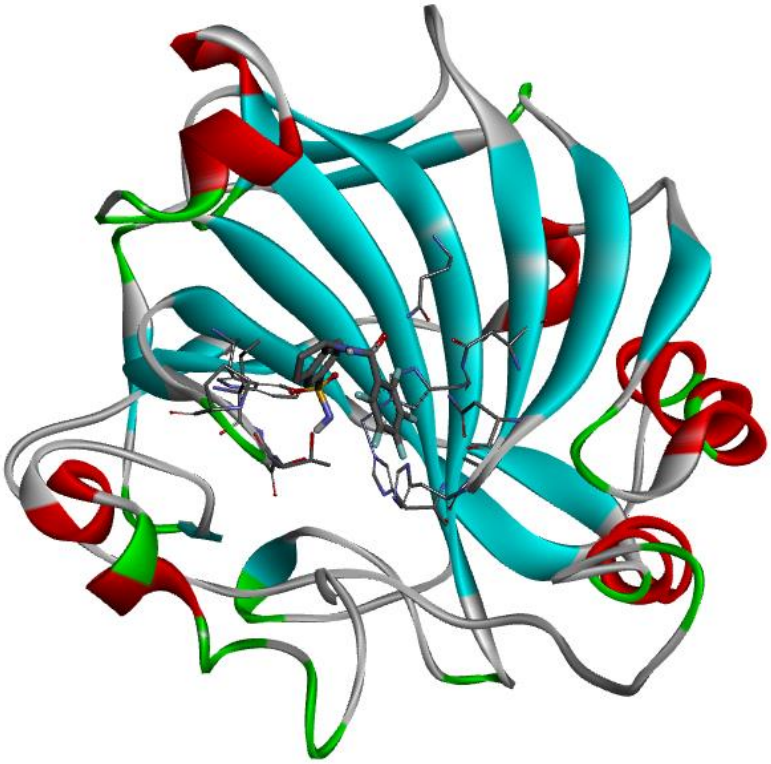
EK-1. Ligant-Enzim Docking Etkileşimleri

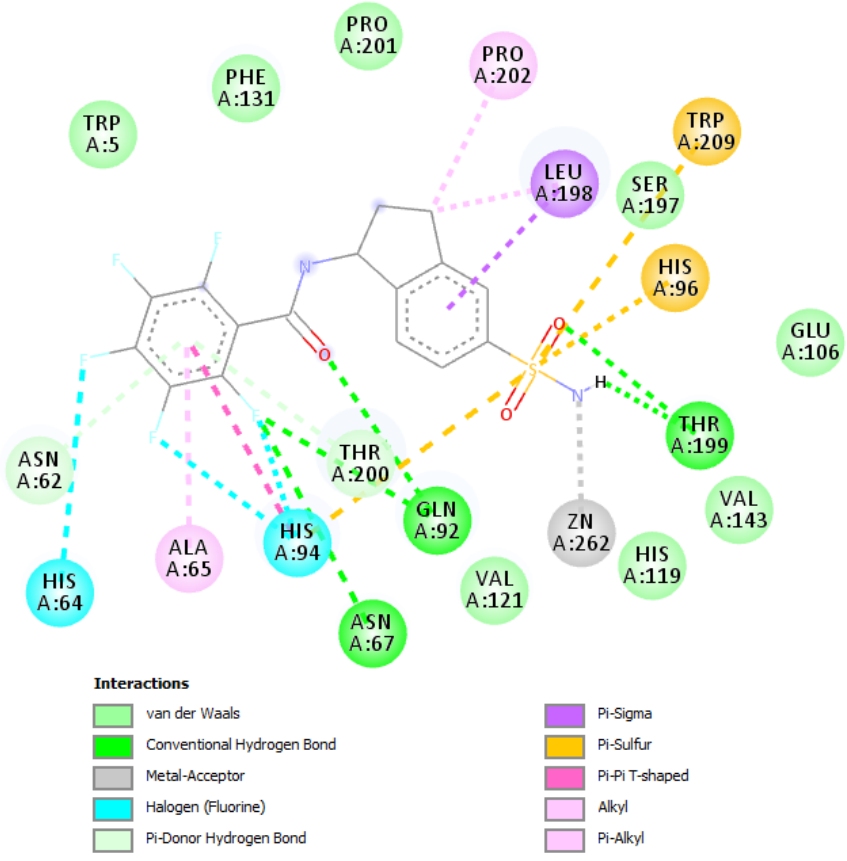
7b – 2QO8



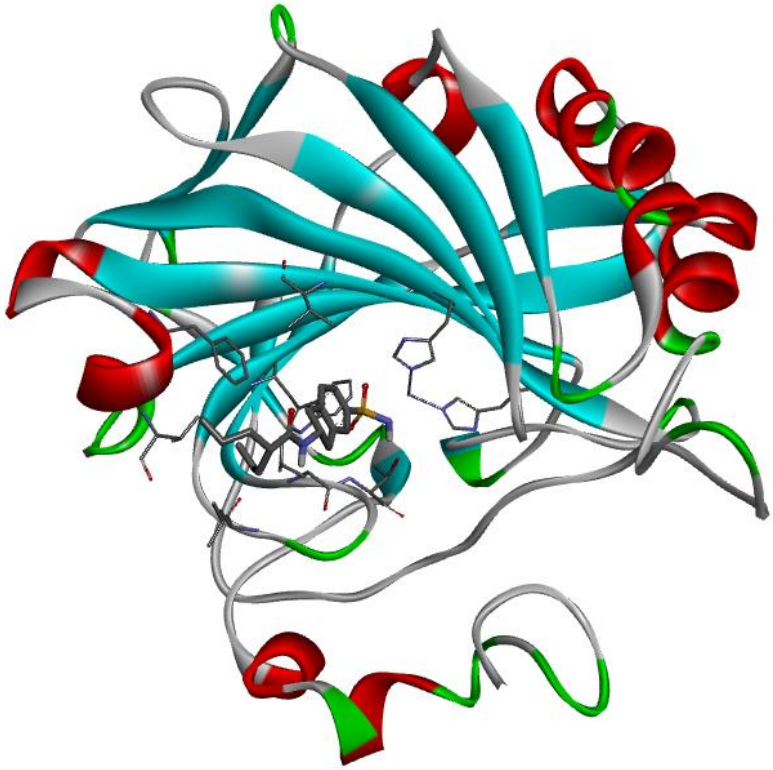


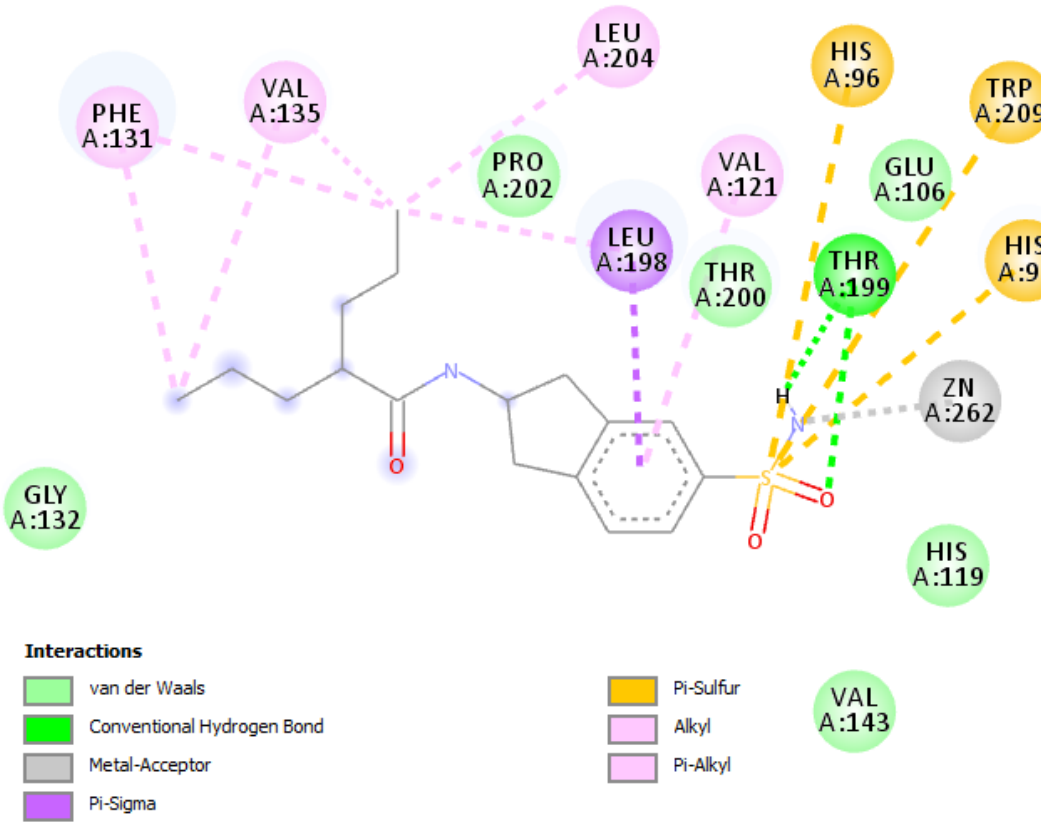
7c – 2QO8



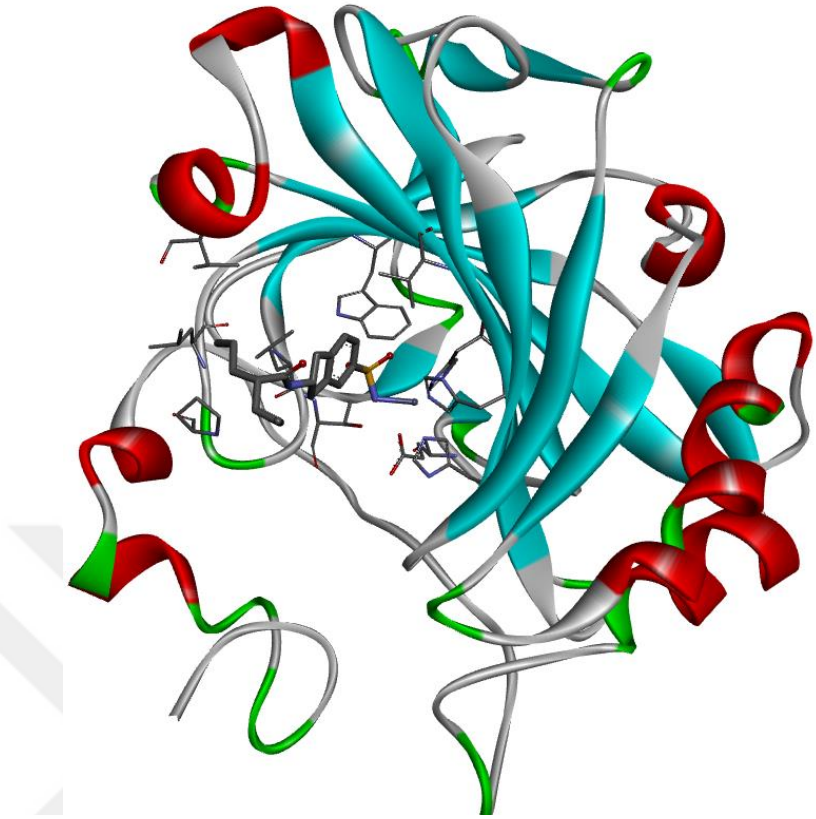

PRO A:201
PRO A:202
PHE A:131
TRP A:5
TRP A:209
LEU A:198
SER A:197
HIS A:96
GLU A:106
THR A:199
THR A:200
ASN A:62
GLN A:92
VAL A:143
ZN A:262
HIS A:94
ALA A:65
HIS A:119
HIS A:64
VAL A:121
ASN A:67
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Halogen (Fluorine)
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Pi-Pi T-shaped
Alkyl
Pi-Alkyl

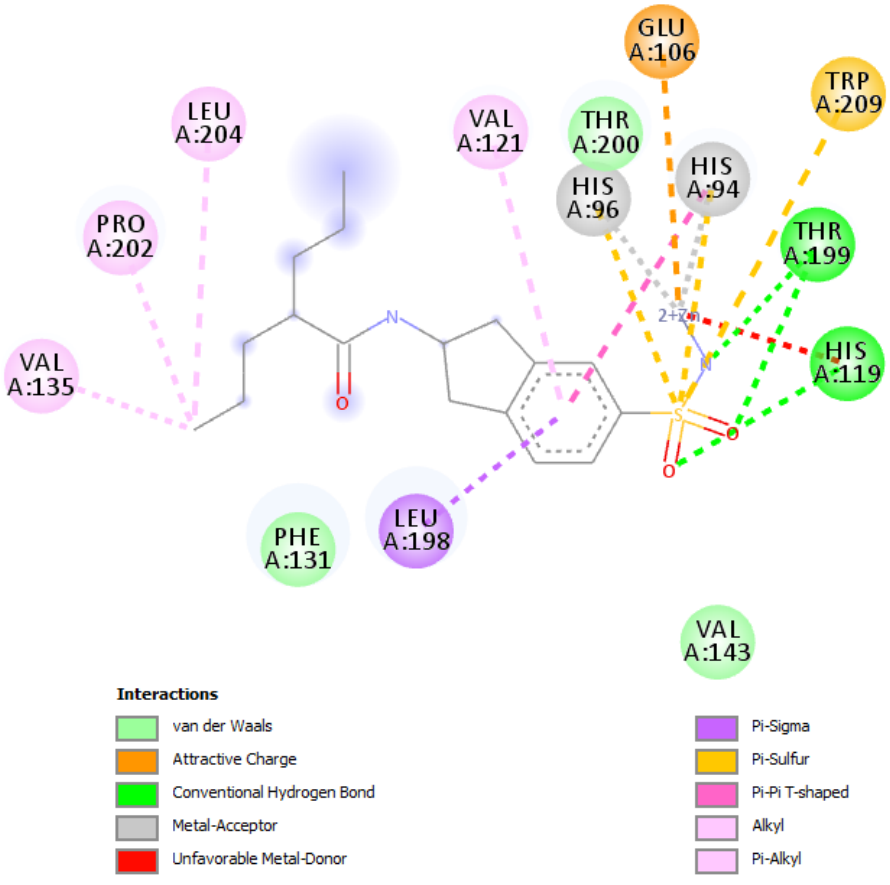
8a – 2QO8



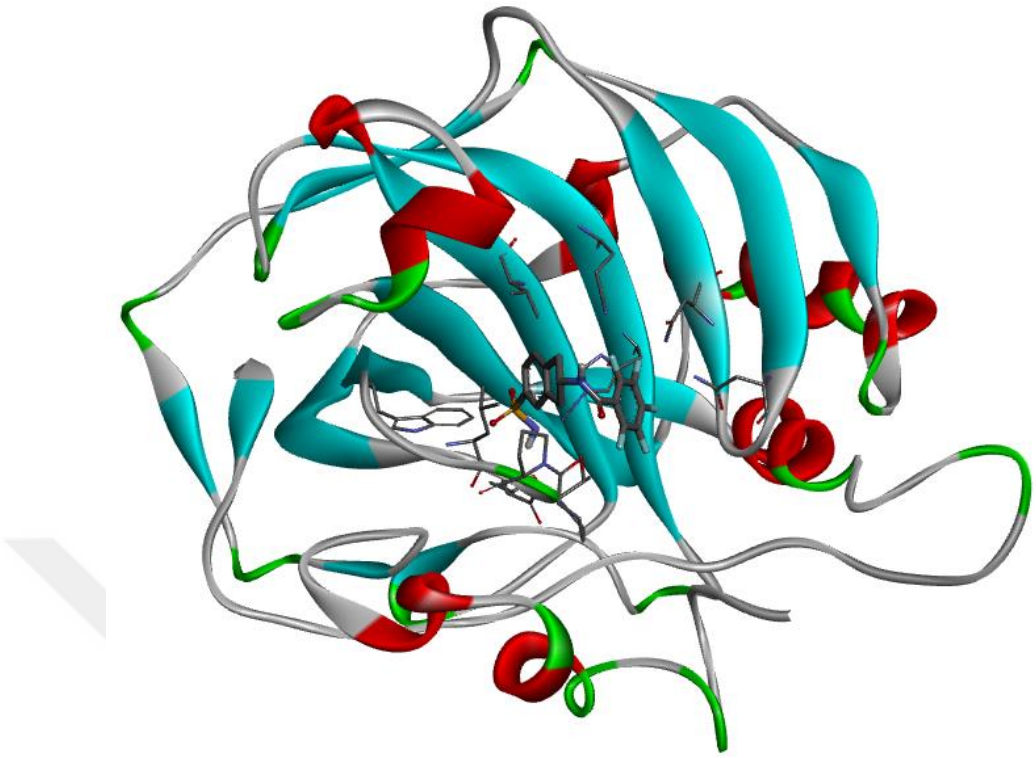

LEU
A:204
HIS
A:96
TRP
A:209
PHE
A:131
VAL
A:135
PRO
A:202
VAL
A:121
GLU
A:106
LEU
A:198
THR
A:200
THR
A:199
HIS
A:9
ZN
A:262
GLY
A:132
HIS
A:119
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Alkyl
Pi-Alkyl
VAL
A:143

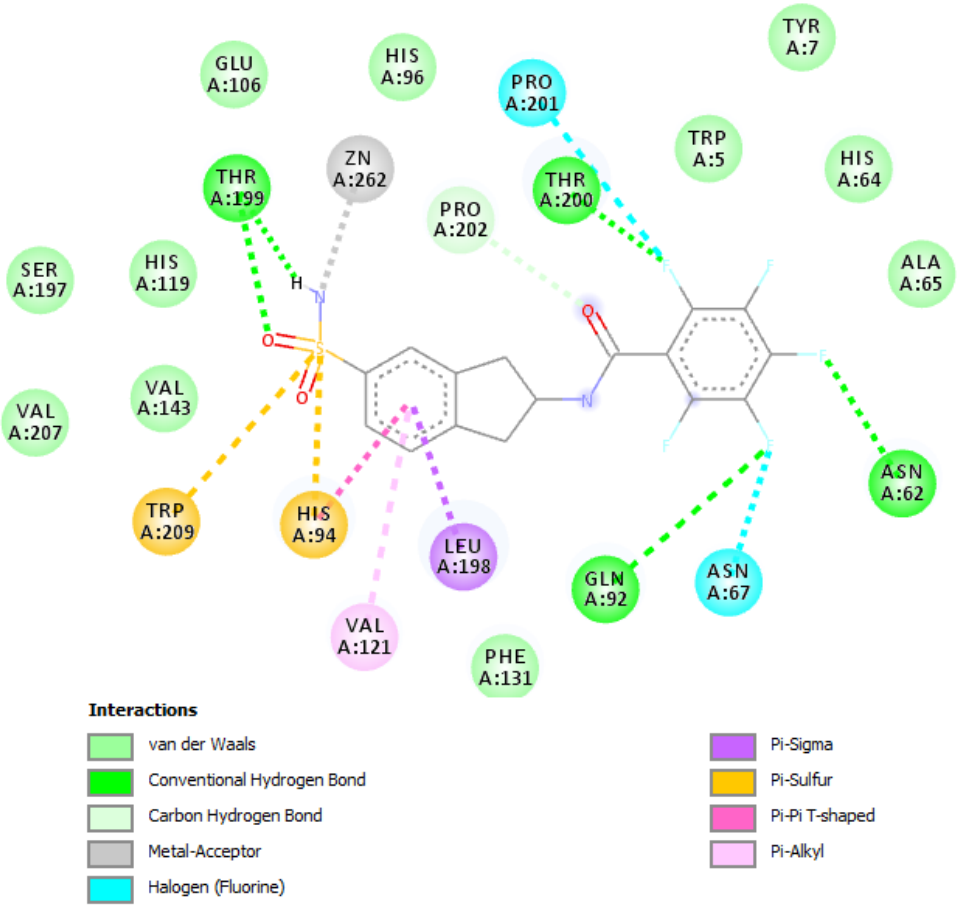
8b – 2QO8



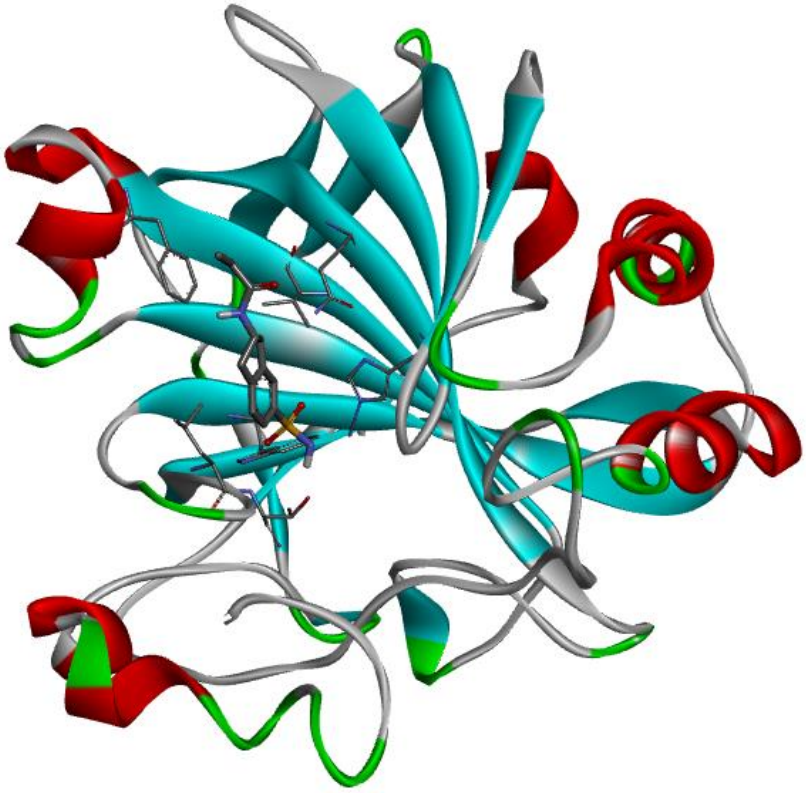

GLU A:106
TRP A:209
LEU A:204
VAL A:121
THR A:200
HIS A:94
HIS A:96
PRO A:202
THR A:199
VAL A:135
HIS A:119
PHE A:131
LEU A:198
VAL A:143
Interactions
van der Waals
Attractive Charge
Conventional Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Unfavorable Metal-Donor
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Pi-Pi T-shaped
Alkyl
Pi-Alkyl

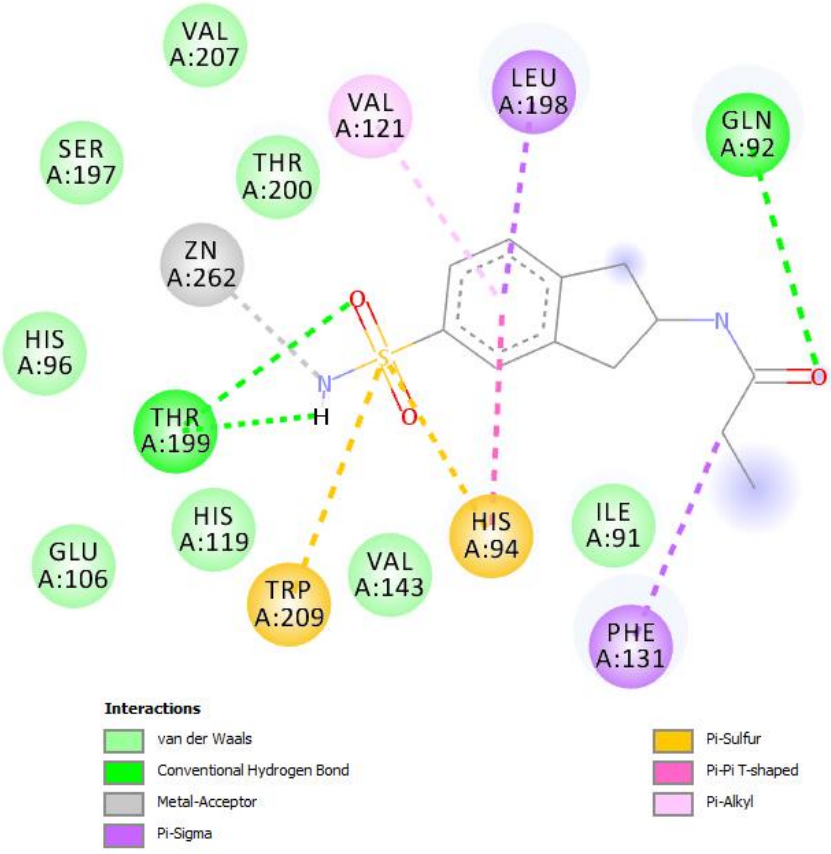
8c – 2QO8



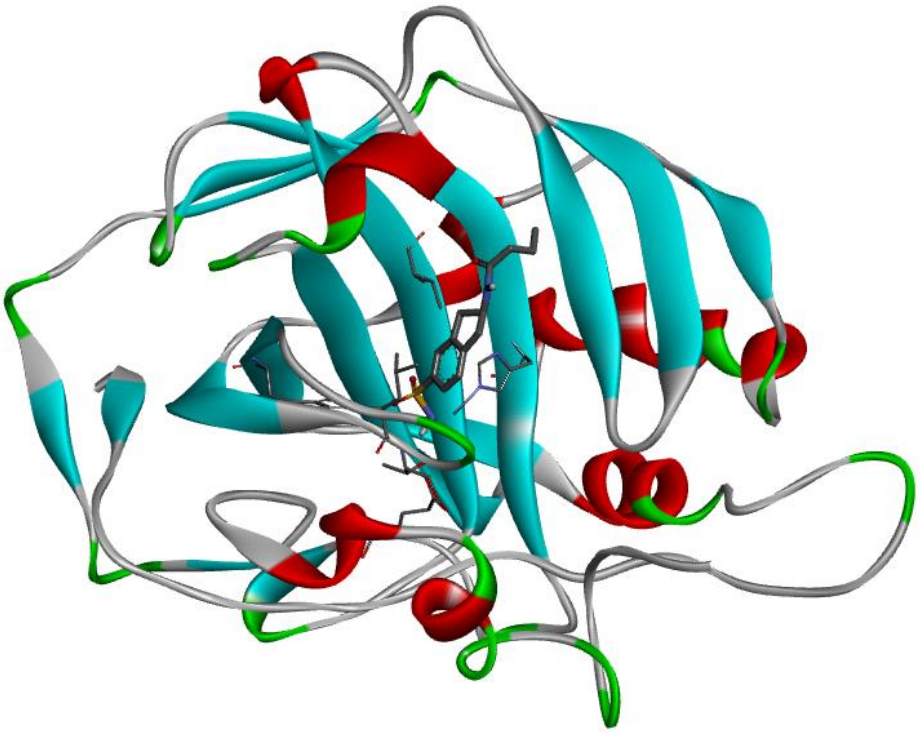

TYR A:7
GLU A:106
HIS A:96
PRO A:201
TRP A:5
HIS A:64
ZN A:262
THR A:199
THR A:200
PRO A:202
SER A:197
HIS A:119
ALA A:65
VAL A:143
VAL A:207
ASN A:62
TRP A:209
HIS A:94
LEU A:198
GLN A:92
ASN A:67
VAL A:121
PHE A:131
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Halogen (Fluorine)
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Pi-Pi T-shaped
Pi-Alkyl

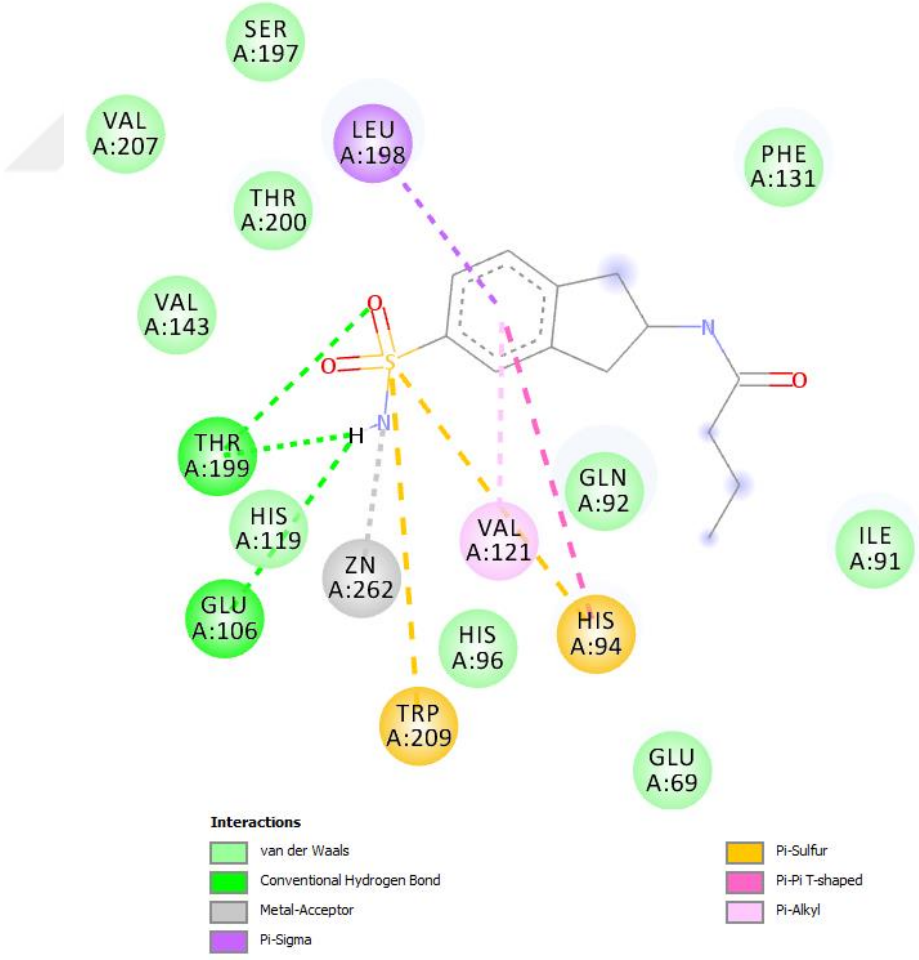
8d – 2QO8



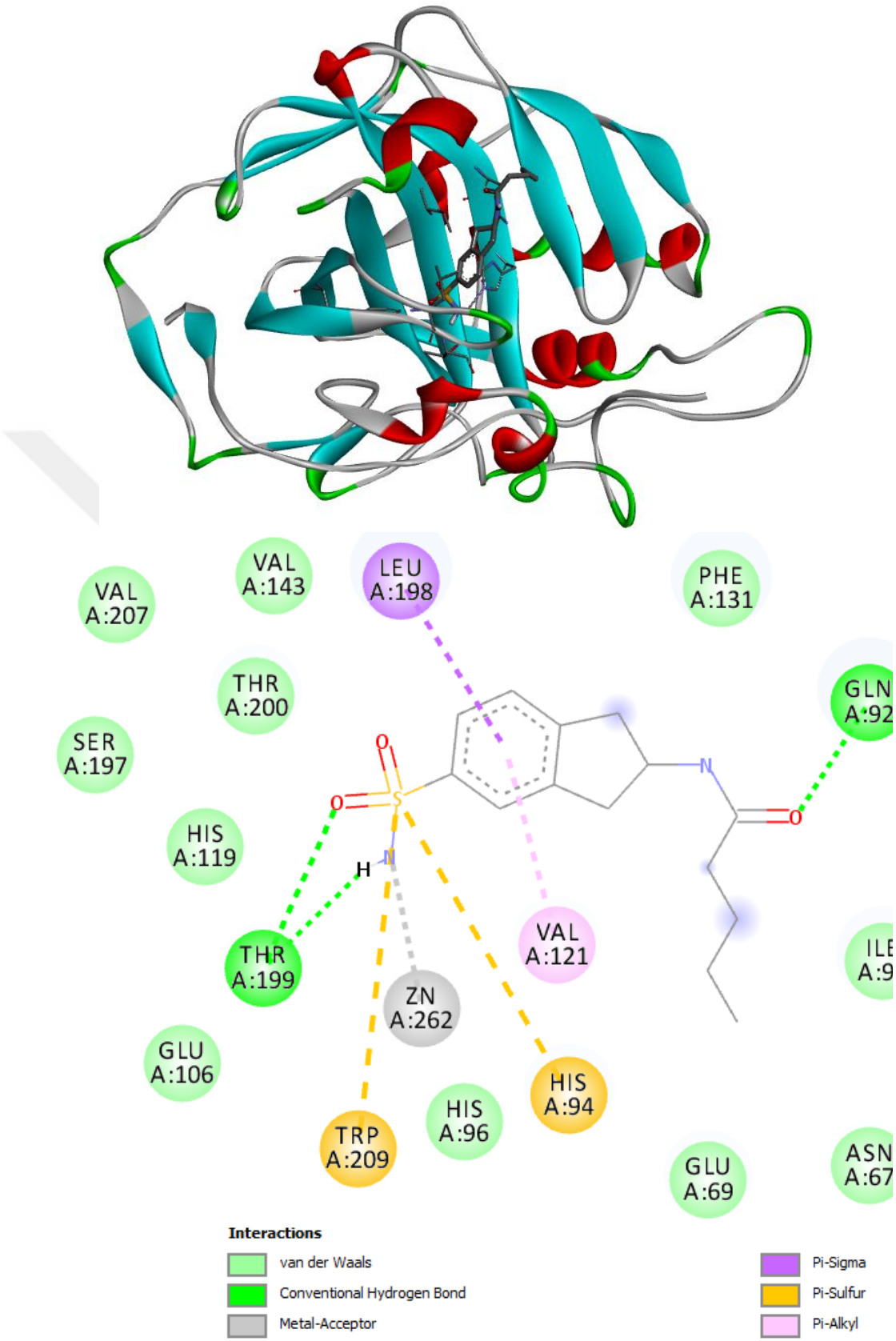

VAL A:207
VAL A:121
LEU A:198
GLN A:92
SER A:197
THR A:200
ZN A:262
HIS A:96
THR A:199
HIS A:119
GLU A:106
TRP A:209
VAL A:143
HIS A:94
ILE A:91
PHE A:131
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Pi-Pi T-shaped
Pi-Alkyl

8e – 2QO8

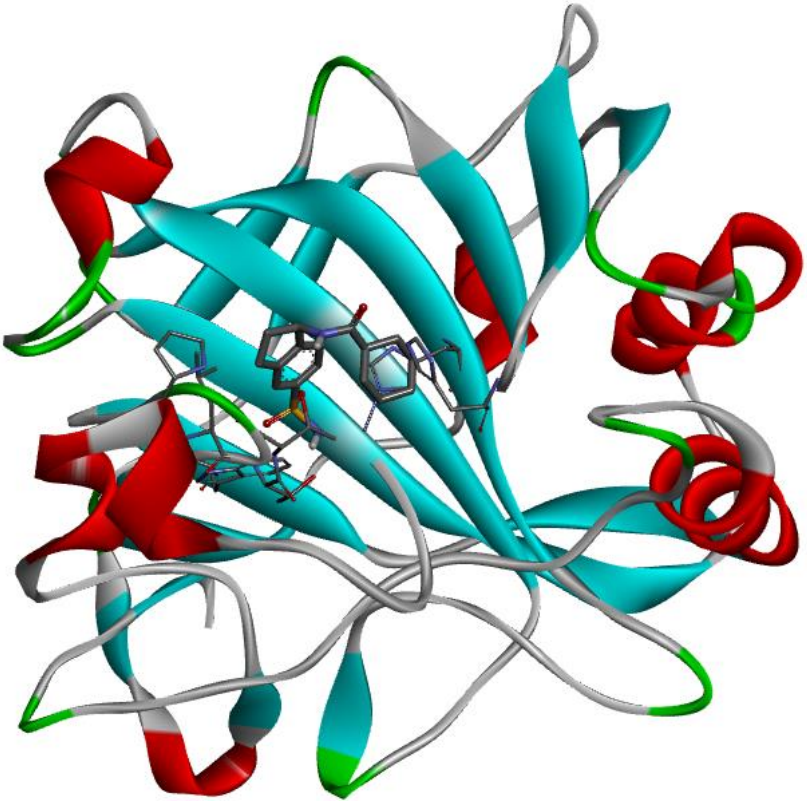


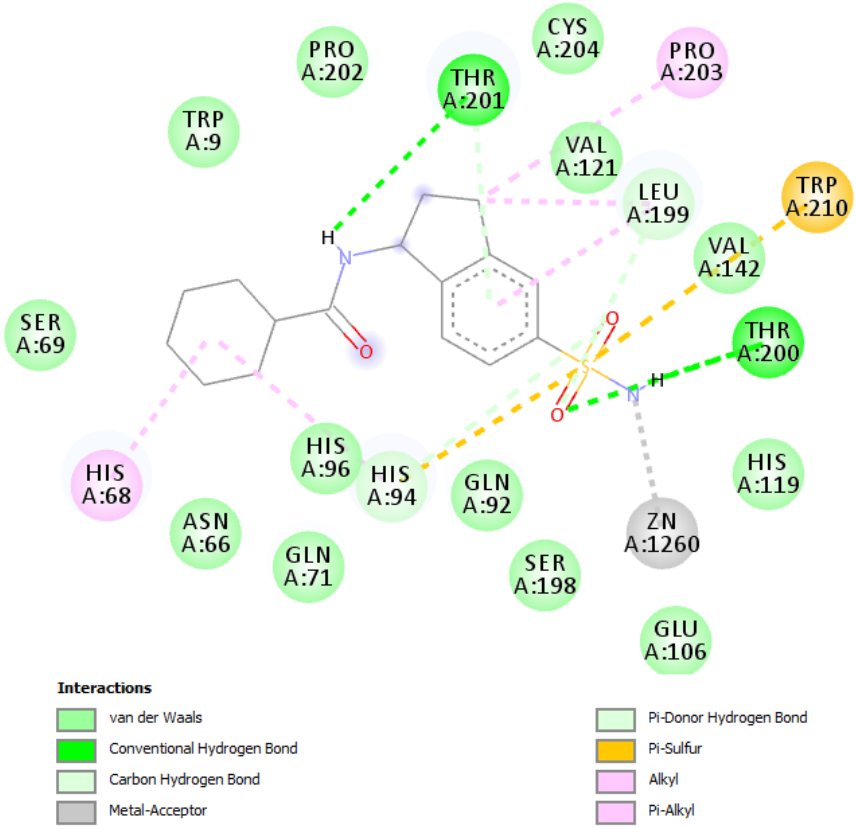

SER A:197
VAL A:207
LEU A:198
PHE A:131
THR A:200
VAL A:143
O
O
S
N
O
N
H
THR A:199
GLN A:92
HIS A:119
VAL A:121
ILE A:91
ZN A:262
GLU A:106
HIS A:96
HIS A:94
TRP A:209
GLU A:69
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Pi-Pi T-shaped
Pi-Alkyl

8f – 2QO8

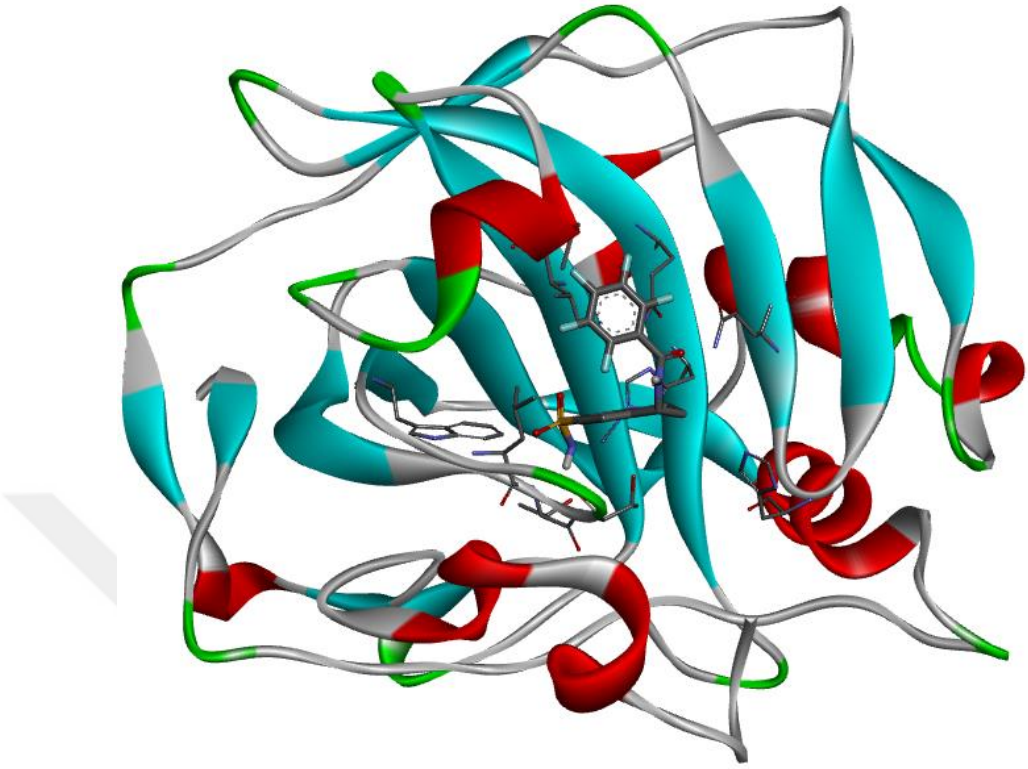

VAL A:207
VAL A:143
LEU A:198
PHE A:131
THR A:200
GLN A:92
SER A:197
HIS A:119
THR A:199
VAL A:121
ZN A:262
GLU A:106
HIS A:94
HIS A:96
TRP A:209
GLU A:69
ASN A:67
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Pi-Alkyl

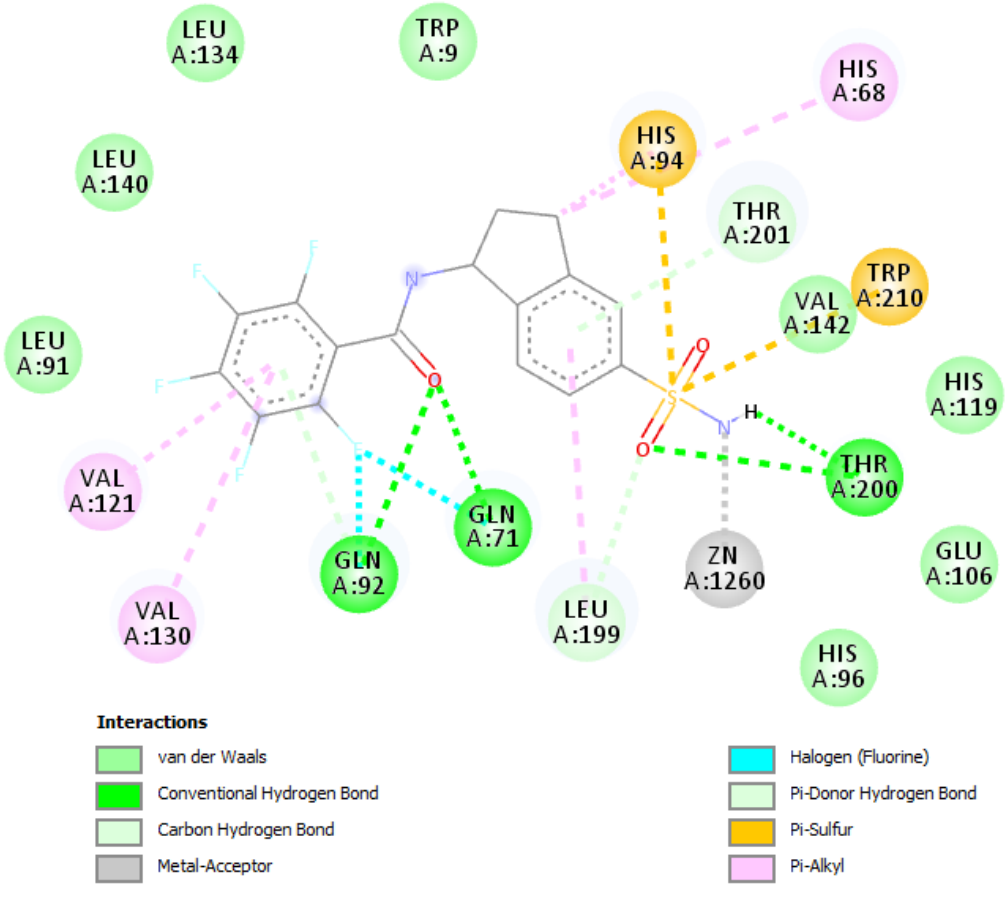
7b – 5FL6



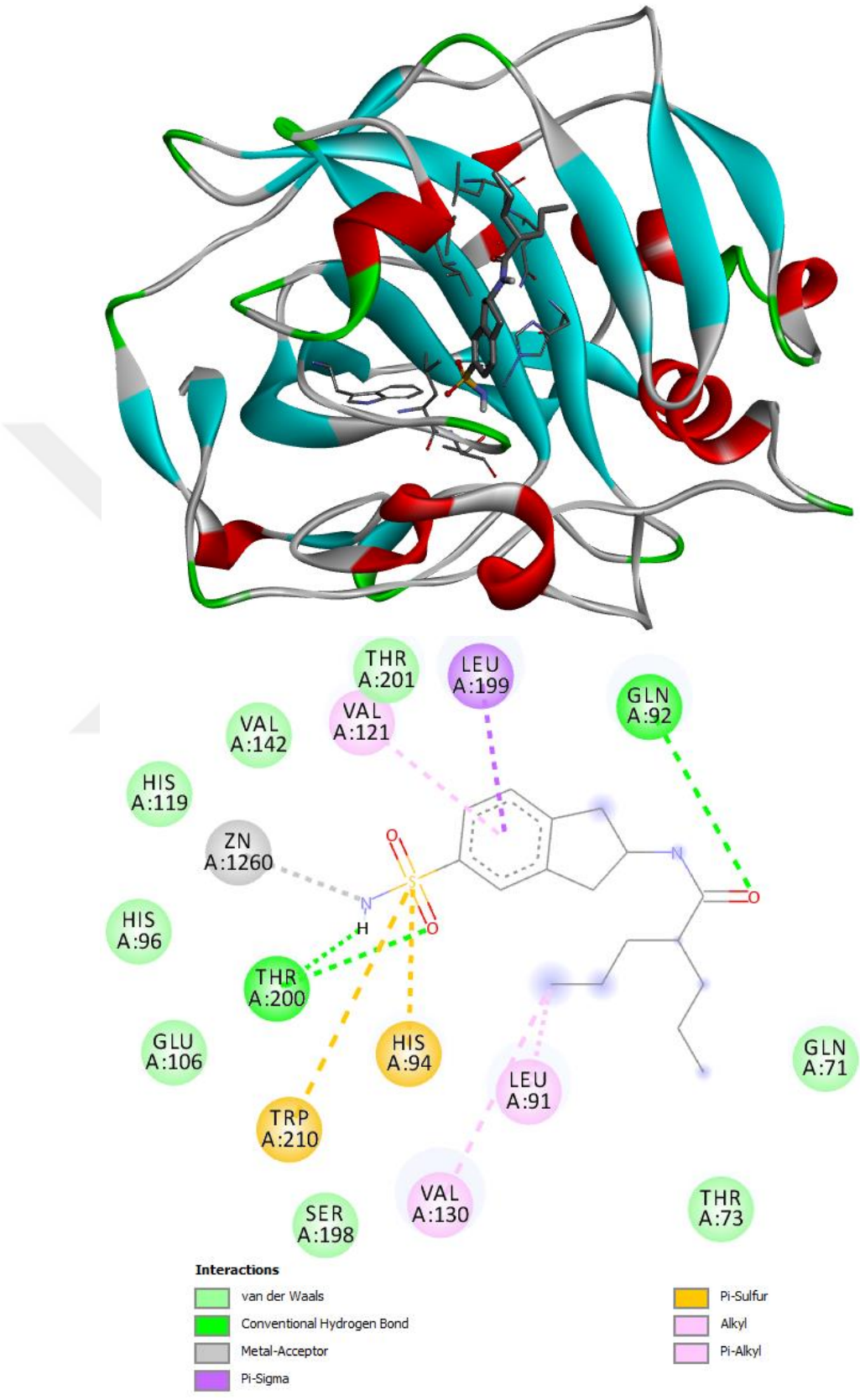

PRO A:202
CYS A:204
PRO A:203
THR A:201
TRP A:9
VAL A:121
LEU A:199
TRP A:210
VAL A:142
SER A:69
THR A:200
HIS A:68
HIS A:96
HIS A:94
GLN A:92
HIS A:119
ASN A:66
ZN A:1260
GLN A:71
SER A:198
GLU A:106
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sulfur
Alkyl
Pi-Alkyl

7c – 5FL6

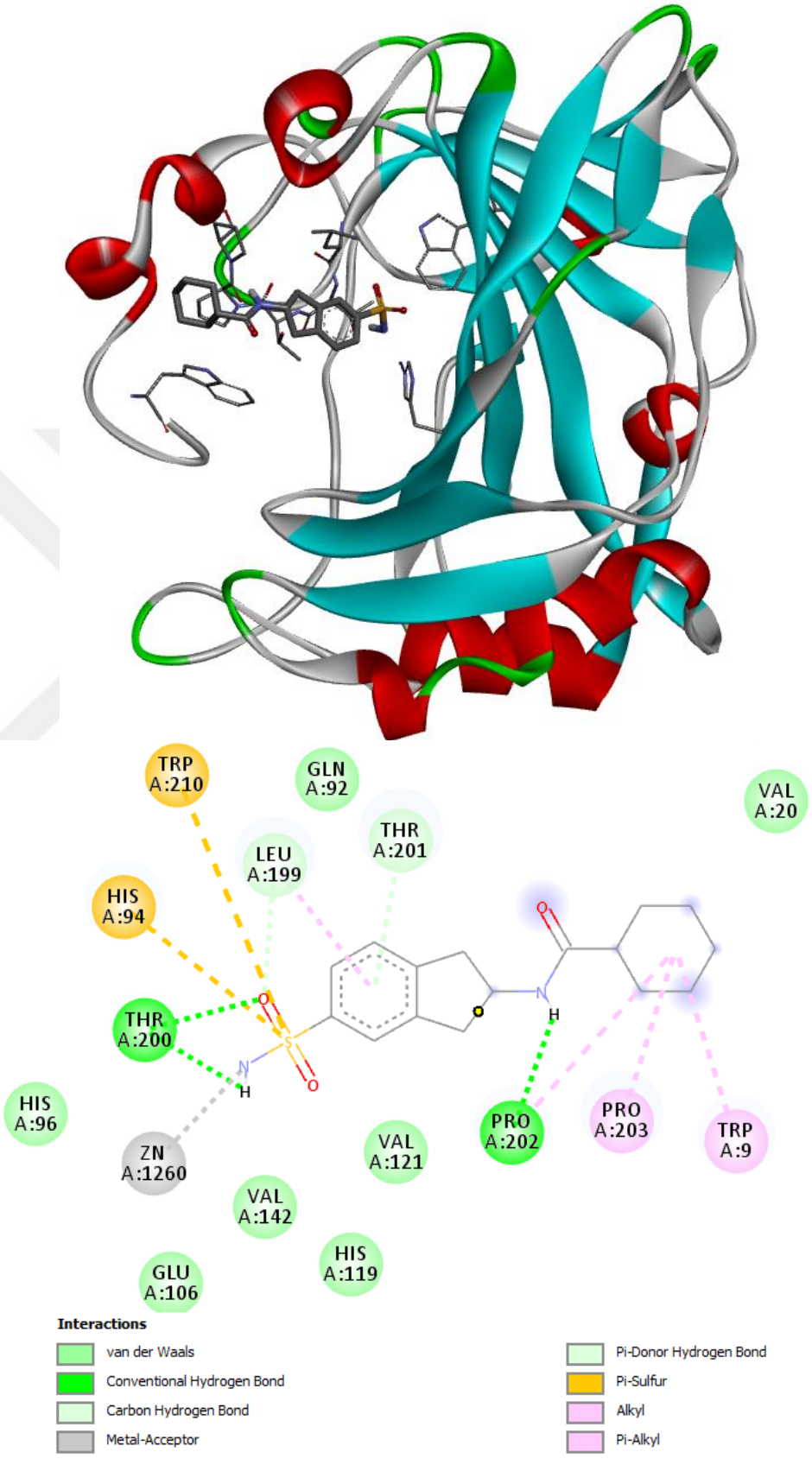



LEU A:134
TRP A:9
HIS A:68
HIS A:94
LEU A:140
THR A:201
TRP A:210
VAL A:142
LEU A:91
HIS A:119
THR A:200
VAL A:121
GLN A:71
GLN A:92
ZN A:1260
GLU A:106
VAL A:130
LEU A:199
HIS A:96
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Halogen (Fluorine)
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sulfur
Pi-Alkyl

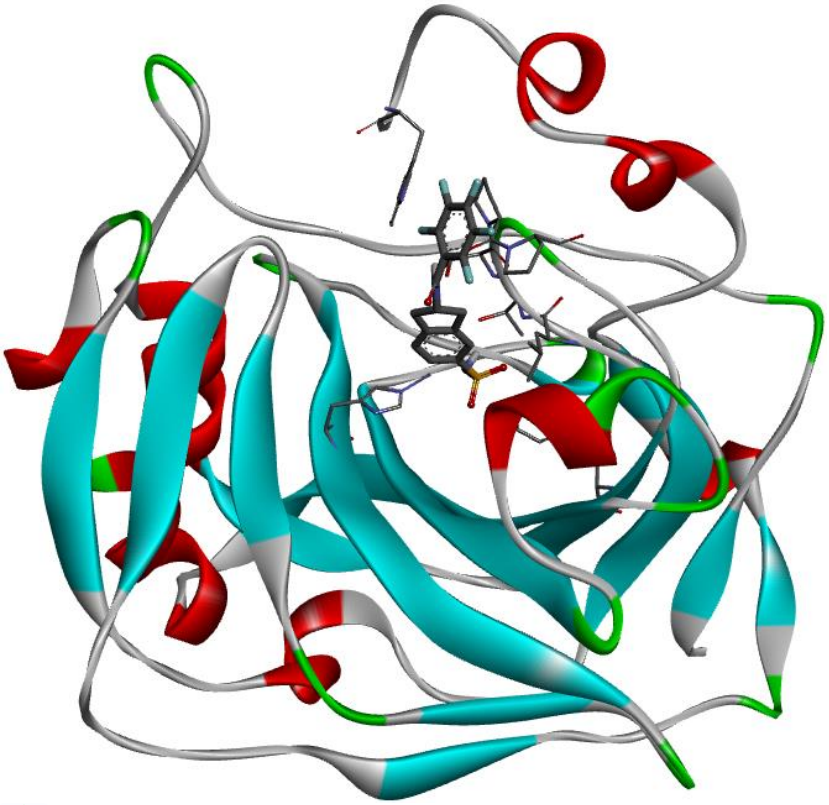
8a – 5FL6

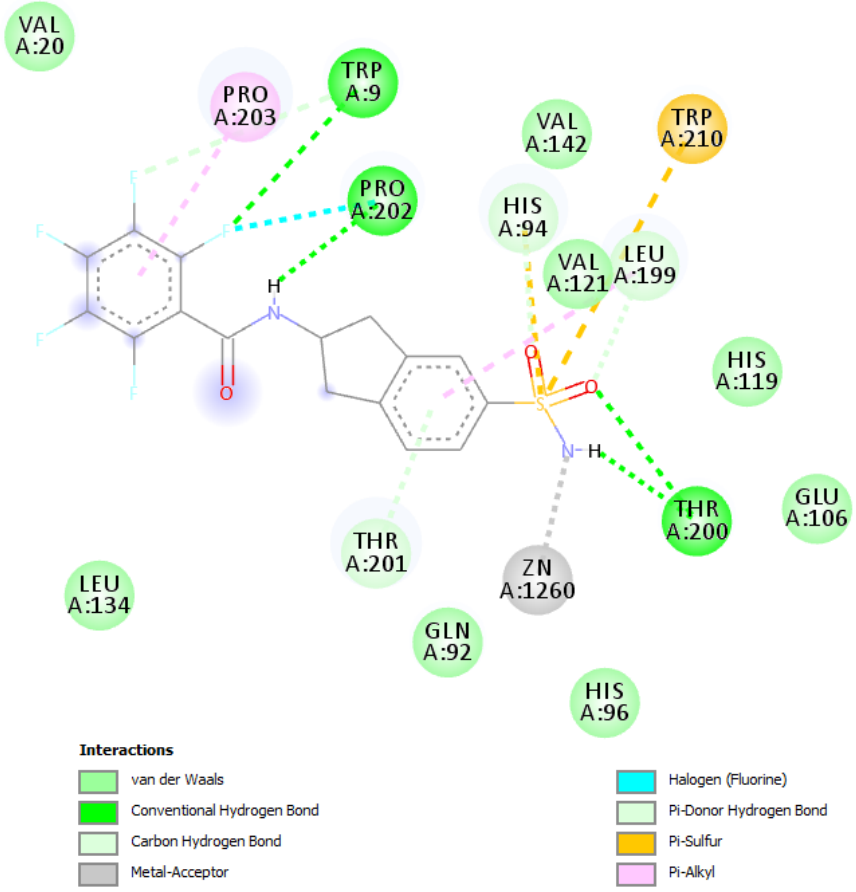

THR A:201
LEU A:199
GLN A:92
VAL A:121
VAL A:142
HIS A:119
ZN A:1260
HIS A:96
THR A:200
GLU A:106
HIS A:94
GLN A:71
LEU A:91
TRP A:210
VAL A:130
THR A:73
SER A:198
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Sigma
Pi-Sulfur
Alkyl
Pi-Alkyl

8b – 5FL6

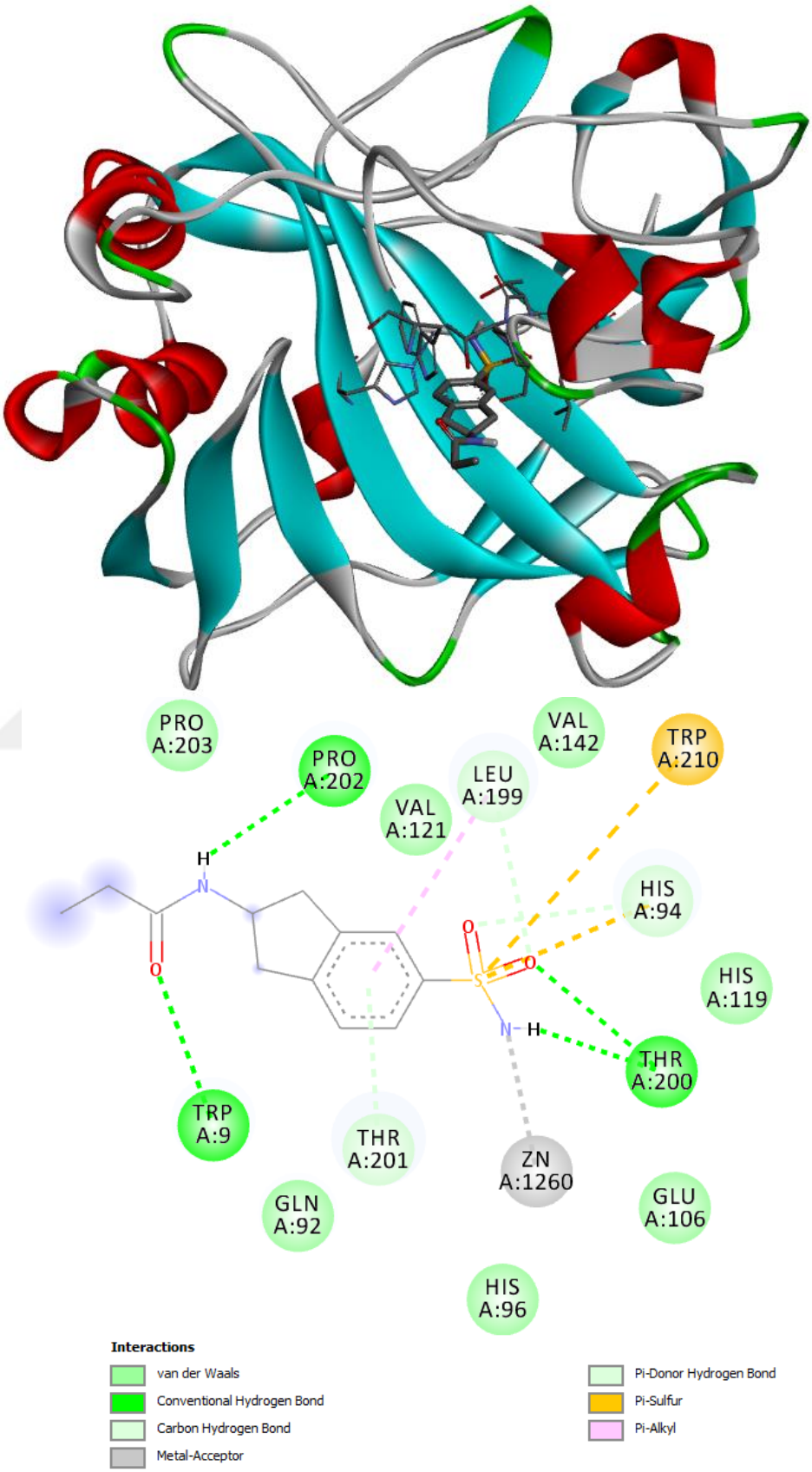

TRP A:210
GLN A:92
VAL A:20
THR A:201
LEU A:199
HIS A:94
THR A:200
HIS A:96
ZN A:1260
VAL A:142
GLU A:106
HIS A:119
VAL A:121
PRO A:202
PRO A:203
TRP A:9
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sulfur
Alkyl
Pi-Alkyl

8c – 5FL6



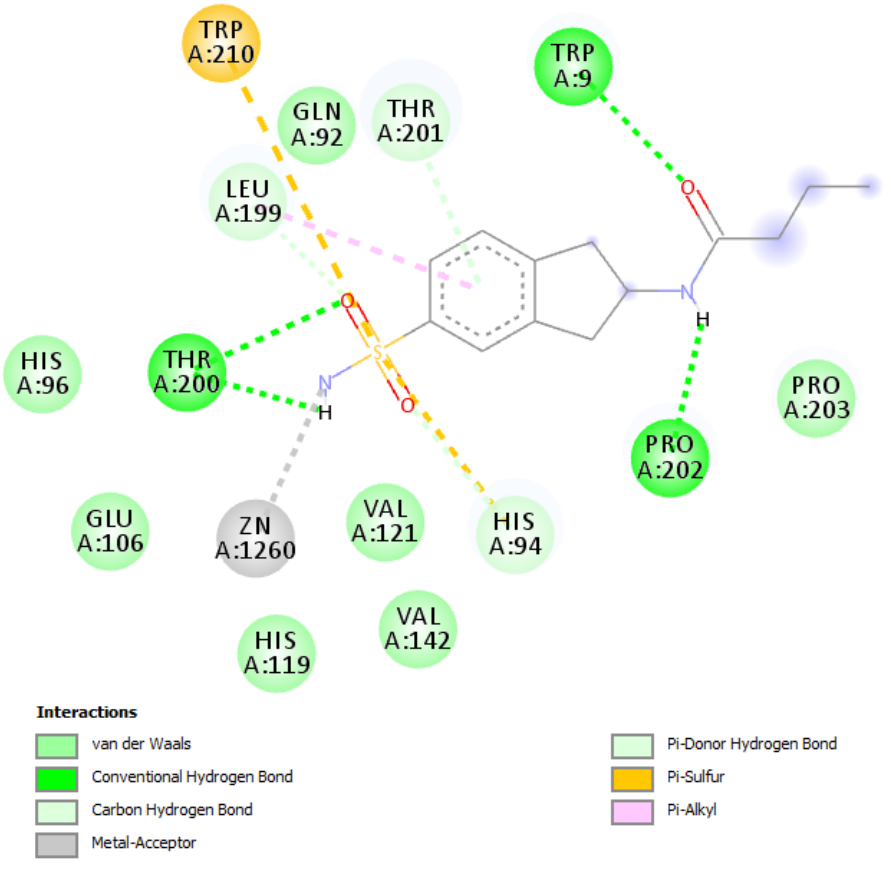

VAL A:20
TRP A:9
PRO A:203
PRO A:202
VAL A:142
TRP A:210
HIS A:94
VAL A:121
LEU A:199
HIS A:119
GLU A:106
THR A:200
THR A:201
ZN A:1260
LEU A:134
GLN A:92
HIS A:96
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Halogen (Fluorine)
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sulfur
Pi-Alkyl

8d – 5FL6


PRO A:203
PRO A:202
VAL A:142
TRP A:210
LEU A:199
VAL A:121
HIS A:94
HIS A:119
THR A:200
TRP A:9
THR A:201
ZN A:1260
GLU A:106
GLN A:92
HIS A:96
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sulfur
Pi-Alkyl

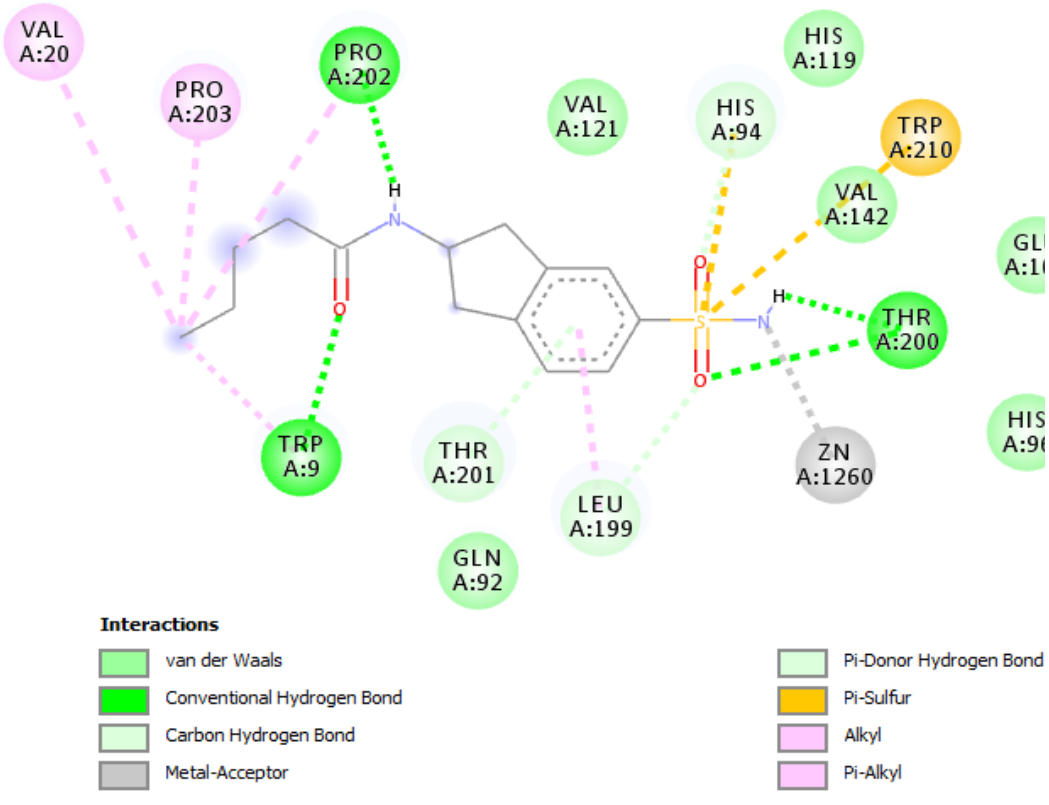
8e – 5FL6




TRP A:210
GLN A:92
THR A:201
TRP A:9
LEU A:199
HIS A:96
THR A:200
PRO A:203
PRO A:202
GLU A:106
ZN A:1260
VAL A:121
HIS A:94
VAL A:142
HIS A:119
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sulfur
Pi-Alkyl

8f – 5FL6




VAL A:20
PRO A:203
PRO A:202
VAL A:121
HIS A:94
HIS A:119
TRP A:210
VAL A:142
THR A:200
TRP A:9
THR A:201
LEU A:199
GLN A:92
ZN A:1260
Interactions
van der Waals
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond
Metal-Acceptor
Pi-Donor Hydrogen Bond
Pi-Sulfur
Alkyl
Pi-Alkyl