

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**THEILERIOSIS'İN TEDAVİSİNDE KULLANILABİLECEK YENİ BİR İLAÇ ADAYI
TESPİT ETMEK İÇİN KUMARİN TÜREVLERİNİN *THEILERIA ANNULATA*
ENOLAZINI İNHİBİSYON POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

SİNEM YAKARSÖNMEZ

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK TURGUT-BALIK**

**EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÖZKAN DANIŞ**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**THEILERIOSIS'İN TEDAVİSİNDE KULLANILABİLECEK YENİ BİR İLAÇ ADAYI
TESPİT ETMEK İÇİN KUMARİN TÜREVLERİNİN *THEILERIA ANNULATA*
ENOLAZINI İNHİBİSYON POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem YAKARSÖNMEZ tarafından hazırlanan tez çalışması tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Özkan DANIŞ

Marmara Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşe OGAN

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

İstanbul Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün TAGEM-14/AR-GE/17 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik çalışma hayatıma başlayabilmem ve ilerlemem için her zaman destek olan, tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, karşılaştığım her türlü sorunu ilgi ve sabırla dinleyip çözümlerini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Prof. Dr. Dilek Turgut-Balık'a,

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana her türlü desteği sağlayan, kendisine danıştığım tüm zamanlarda ilgiyle ve sabırla çözümler üreten eş danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Özkan Danış'a,

Tez izleme komitesi üyeleri saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Adil Allahverdiyev, Prof. Dr. Ayşe Ogan ve Prof. Dr. Refiye Yanardağ'a,

Sağlamış oldukları proje desteğinden dolayı T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne,

Sağlamış oldukları destekten dolayı TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na,

Tez çalışmasının yürütülmesine destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalürji Fakültesi Dekanlığı'na, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanlığı'na ve bölümdeki tüm hocalarıma, Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dekanlığı'na, Marmara Üniversitesi Kimya Bölümü Başkanlığı'na ve bölümdeki tüm hocalarıma,

Tez çalışmamın çeşitli aşamalarında yaptıkları engin katkılardan dolayı Yrd. Doç. Dr. Özal Mutlu'ya, Yrd. Doç. Dr. Murat Topuzoğulları'na, Yrd. Doç. Dr. Başak Yüce Dursun'a, Arş. Gör. Emrah Sarıyer'e,

Tez çalışmasının yürütülmesi ve tamamlanmasında her türlü desteklerini esirgemeyen, Erennur Uğurel, Osman Mutluhan Uğurel, Ayberk Akat, Burcu Ata, Sezen Spahi, Sena Karaosmanoğlu, Tuğba Gül İnci, Merve Girgin başta olmak üzere tüm laboratuvar grup arkadaşlarıma ve Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan diğer yüksek lisans, doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca aldığım kararlarda her zaman yanımda olan ve doktora eğitimim boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Aralık, 2017

Sinem YAKARSÖNMEZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Theileriosis	3
1.1.1.1 <i>Theileria annulata</i> Enfeksiyonu (Tropikal Theileriosis)	4
1.1.1.2 Tropikal Theileriosis'in Tüm Dünyada ve Türkiye'de Görülme Sıklığı	5
1.1.2 <i>T. annulata</i> 'nın İlaç Direnci	7
1.1.3 Potansiyel İlaç Hedefi Olarak <i>T. annulata</i> Enolaz	10
1.1.3.1 Enolazın Protein Yapısı ve Katalitik Mekanizması	12
1.1.4 Enzim Kinetiği.....	14
1.1.4.1 Michaelis-Menten Kinetiği	14
1.1.4.2 Enzim-İnhibisyon Mekanizmaları	17
1.1.5 Kumarin ve İnhibisyon Özelliği.....	20
1.1.6 Bilgisayar Tabanlı Protein Yapı Analizleri.....	22
1.1.6.1 Homoloji Modelleme	22
1.1.6.2 Moleküler Yanaştırma (Docking).....	24
1.2 Tezin Amacı	27
1.3 Hipotez	27
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE METOD	28

2.1	Materyaller	28
2.1.1	Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	28
2.1.2	Mikrobiyal Büyüme Besiyeri, Tamponlar ve Çözeltiler.....	28
2.1.3	Enzim İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Kumarin Türevleri.....	31
2.2	Metod	37
2.2.1	<i>Ta</i> ENO'nun Ekspresyonu ve Nikel-Nitrilotriasetik Asit Agaroz Kolon Dolgu Maddesi Kullanılarak Yapılan Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	37
2.2.2	Saflaştırılan <i>Ta</i> ENO'nun Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi Analizinin Yapılması.....	39
2.2.3	<i>T. annulata</i> Enolazının Aktivite Tayini.....	39
2.2.4	<i>T. annulata</i> Enolazının Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi.....	40
2.2.5	<i>T. annulata</i> Enolazının Saflaştırma Optimizasyonları	41
2.2.5.1	Nikel-Nitrilotriasetik Asit Agaroz Kolon Dolgu Maddesi Kullanılarak Yapılan Afinite Kromatografisi Protokolünün Optimizasyon Çalışmaları.....	41
2.2.5.2	Kobalt Yüklü TALON® Kolonu ile Yapılan Afinite Kromatografisi Yöntemiyle <i>Ta</i> ENO'nun Saflaştırılması	42
2.2.6	Kumarin Türevlerinin İnhibitör Etkinliğinin <i>T. annulata</i> Enolazı Kullanılarak Taranması.....	45
2.2.7	Belirlenen Kumarin Türevlerinin IC ₅₀ Değerlerinin <i>T. annulata</i> Enolazı Kullanılarak Hesaplanması	46
2.2.8	<i>T. annulata</i> Enolazının Kumarin Türevleri Kullanılarak Enzim İnhibisyon Mekanizmasının Belirlenmesi	47
2.2.8.1	<i>T. annulata</i> Enolazının Konsantrasyon Tayini ve Kinetik Analizi	47
2.2.8.2	Belirlenen Kumarin Türevleri ile Enzim İnhibisyon Mekanizmasının Tayin Çalışmaları	48
2.2.9	Ticari Bir İnhibitör Olan ENOblock®'un <i>T. annulata</i> Enolazını İnhibisyon Potansiyelinin Analizi	49
2.2.10	En İyi İnhibisyonu Sağlayan Kumarin Türevinin Enzim İle Etkileşiminin Kütle Spektroskopisi İle Gösterilmesi	50
2.2.11	<i>T. annulata</i> Enolazının Açık ve Kapalı Konformasyonunun Homoloji Modellemesi	50
2.2.11.1	<i>T. annulata</i> Enolazının Protein Dizisinin Eşleştirilmesi.....	50
2.2.11.2	<i>T. annulata</i> Enolazının Homoloji Modellerinin Yapılması	51
2.2.11.3	<i>T. annulata</i> Enolazının İkincil Yapı ve Domain Analizi	52
2.2.12	<i>T. annulata</i> Enolazının Homoloji Modeli ile Yapılan Moleküler Yanaştırma Analizleri	52
2.2.12.1	<i>T. annulata</i> Enolaz Modelinin Substratı olan 2-Fosfoglisarik Asit ile Moleküler Yanaştırmasının Yapılması.....	52
2.2.12.2	<i>T. annulata</i> Enolaz Modelinin Belirlenen Kumarin Türevleri ile Schrödinger Glide Programı Kullanılarak Moleküler Yanaştırmasının Yapılması	53

BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMA.....	55
---------------------------	----

3.1	<i>T. annulata</i> Enolazının Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	55
3.2	<i>T. annulata</i> Enolazının Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi	56
3.2.1	Gliserol ve BSA Kullanılarak Yapılan Stabilizasyon Çalışması ile <i>Ta</i> ENO'nun Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi	56
3.2.2	Gliserol ve BSA'dan Farklı Stabilizatörler Kullanılarak Yapılan Stabilizasyon Çalışması ile <i>Ta</i> ENO'nun Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi	58
3.3	<i>T. annulata</i> Enolazının Saflaştırma Optimizasyonunun Yapılması ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi Analizinin Yapılması	63
3.4	Kumarin Türevlerinin İnhibitör Etkinliğinin <i>T. annulata</i> Enolazı Kullanılarak Taranması ve Belirlenen Kumarin Türevlerinin IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması.....	70
3.5	<i>T. annulata</i> Enolazının Kumarin Türevleri Kullanılarak Enzim İnhibisyon Mekanizmasının Belirlenmesi	76
3.5.1	Saflaştırılan <i>T. annulata</i> Enolazının Kinetik Analizi.....	76
3.5.2	Belirlenen Kumarin Türevleri ile Enzim İnhibisyon Mekanizması.....	78
3.6	ENOblock® İnhibitörünün <i>Ta</i> ENO Üzerindeki İnhibisyon Potansiyelinin Belirlenmesi	86
3.7	En İyi İnhibisyonu Sağlayan Kumarin Türevinin <i>Ta</i> ENO İle Etkileşiminin Kütle Spektroskopisi İle Gösterilmesi	88
3.8	<i>Theilaria annulata</i> Enolazının Kapalı ve Açık Konformasyonunun Homoloji Modellemesi	92
3.8.1	<i>Theilaria annulata</i> Enolazının Belirlenen Farklı Enolazlar ile Karşılaştırmalı Protein Dizi Analizinin Yapılması	92
3.8.2	<i>Theilaria annulata</i> Enolazının İki Farklı Konformasyonunun Modellerinin Oluşturulması	95
3.8.3	<i>T. annulata</i> Enolazının Yapısal Özellikleri: İkincil ve Üçüncül Yapısı	98
3.9	<i>T. annulata</i> Enolazının Kapalı Konformasyon Modeli ile Yapılan Moleküler Yanaştırma Analizleri	102
3.9.1	<i>T. annulata</i> Enolaz Modelinin Aktif Bölgesinin Belirlenmesi ve 2-Fosfoglisirik Asit ile Bağlanmasının Gösterimi	102
3.9.2	<i>T. annulata</i> Enolaz Modelinin Belirlenen Dört Farklı Kumarin Türevi ile Moleküler Yanaştırmasının Yapılması.....	105

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER	115
4.1 Sonuçlar ve İleri Çalışmalara Yönelik Öneriler.....	115
KAYNAKLAR.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	133

SİMGE LİSTESİ

[S]	Substrat konsantrasyonu
°C	Derece Celsius
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A ₂₄₀	240 nm'deki absorbans değeri
dk	Dakika
E	Enzim
g	Gram
H ₂ O	Su
HCl	Hidroklorik asit
kcal	Kilokalori
K _i	İnhibisyon sabiti
K _m	Michaelis sabiti
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum 2+ iyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
P	Ürün
rpm	Dakikadaki devir sayısı
v	Başlangıç hızı
V _{max}	Maksimum hız
V _T	Toplam reaksiyon hacmi

KISALTMA LİSTESİ

1,3BPG	1,3-bifosfogliserat
2-PG	2-Fosfogliserik asit
3PG	3-fosfogliserik asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ala	Alanin
APBS	Adaptive Poisson-Boltzmann Solver
Arg	Arjinin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
BSA	Siğır serum albumin
Cys	Sistein
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DOPE	Farklı optimize edilmiş protein enerjisi
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ENO	Enolaz
ESI	Elektrosprey iyonlaştırma
F1,6BPA	Fruktoz bifosfat aldolaz
F1,6PB	Fruktoz-1,6-bifosfat
F6P	Fruktoz-6-fosfat
G6P	Glikoz-6-fosfat
GAD-3P	Gliseraldehit-3-fosfat
GAPDH	Gliseraldehit fosfat dehidrogenaz
Gli	Gliserol
Gli-3P	Gliserol-3-fosfat
Gli-3PDH	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz
Gli-K	Gliserol kinaz
Gln	Glutamin
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
GPI	Glikoz-6-fosfat izomeraz

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
His	Histidin
HK	Hekzokinaz
IFAT	İndirekt floresans antikor testi
Ile	İzolösin
IPTG	İzopropil- β -D- tiyogaltopiranosid
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>
LDH	Laktat dehidrogenaz
Leu	Lösin
Lys	Lizin
MALDI- TOF	Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektroskopisi
Met	Metiyonin
Ni-NTA	Nikel-nitrilotriasetik asit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
OD	Optik yoğunluk
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PBP	Fruktoz bifosfotaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDB	Protein data bank
PEP	Fosfoenolpirüvat
PGK	Fosfogliserat kinaz
PGM	Fosfogliserat mutaz
Phe	Fenilalanin
PK	Pirüvat kinaz
PPI	Protein-protein etkileşim
PPI-FPK	Pirofosfat bağlı fosfofruktokinaz
Pro	Prolin
Pyr	Pirüvat
RMSD	Sapmanın ortalama karekökü
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SDS-SAB	SDS-PAGE örnek uygulama tamponu
Ser	Serin
<i>T. annulata</i>	<i>Theileria annulata</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. parva</i>	<i>Theileria parva</i>
TAE	Tris-asetat-EDTA
TaENO	<i>Theileria annulata</i> enolaz
TaPIN1	<i>Theileria annulata</i> peptidil-prolil izomeraz
Thr	Treonin
TIM	Trioz fosfat izomeraz
TPI	Triozfosfat izomeraz

Trp
Tyr
Val
z-DOPE

Triptofan
Tirozin
Valin
Normalize DOPE

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1	<i>T. parva</i> örneği kullanılarak <i>Theileria</i> türlerinin yaşam döngüsünün gösterimi..... 4
Şekil 1. 2	<i>T. annulata</i> 'nın coğrafik dağılımı..... 6
Şekil 1. 3	Halofuginone, parvaquone ve buparvaquone'ın kimyasal yapısı 8
Şekil 1. 4	Glikoliz ve anaerobik yolda bulunan <i>T. annulata</i> proteinlerinin gösterimi 11
Şekil 1. 5	Enolazın katalitik mekanizması. 13
Şekil 1. 6	Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi..... 15
Şekil 1. 7	Lineweaver-Burk grafiği 16
Şekil 1. 8	Yarışmalı inhibisyonda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi..... 18
Şekil 1. 9	Yarışmasız inhibisyonda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi..... 19
Şekil 1. 10	Karışık inhibisyonda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi..... 19
Şekil 1. 11	Yarışmayan inhibisyonda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi..... 20
Şekil 1. 12	Kumarinin kimyasal gösterimi..... 20
Şekil 1. 13	Homoloji modelleme basamaklarının gösterimi..... 23
Şekil 2. 1	TALON metal afiniteli reçine.....43
Şekil 3. 1	<i>Ta</i> ENO'nun saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü..... 56
Şekil 3. 2	2., 3., 6. ve 14. günün sonunda yapılan enzim aktivite ölçüm sonuçları.. . 57
Şekil 3. 3	+4 °C'de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri grafiği 60
Şekil 3. 4	-20 °C'de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri grafiği. 61
Şekil 3. 5	-80 °C'de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri grafiği. 62
Şekil 3. 6	<i>Ta</i> ENO'nun saflaştırma sonucunun değişiminin gösterilmesi. 63
Şekil 3. 7	Çift kurutma kağıdı ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü. 64
Şekil 3. 8	Farklı NaCl konsantrasyonları ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü..... 65
Şekil 3. 9	Farklı Ni-NTA agaroz miktarları ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü. 66

Şekil 3. 10	Liziz tamponuna farklı kimyasal ilaveleri ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.....	67
Şekil 3. 11	Yıkama tamponuna gliserol ilaveleri ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.....	68
Şekil 3. 12	En iyi sonuç veren bileşenlerin kombinasyonu ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.....	69
Şekil 3. 13	<i>Ta</i> ENO'nun TALON® kolonu ile saflaştırılmasının sonucunda elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü.....	70
Şekil 3. 14	K5 (a), K8 (b), K9 (c), K21 (d) ve K23 (e) kumarin türevlerinin logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı reaksiyon sonucunda meydana gelen % inhibisyon grafikleri	74
Şekil 3. 15	Bradford standart eğrisi	76
Şekil 3. 16	<i>Ta</i> ENO'nun belirlenen koşullarda kararlı hal kinetiği grafiği	77
Şekil 3. 17	Üç farklı K8 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği.....	79
Şekil 3. 18	Üç farklı K8 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği	79
Şekil 3. 19	Üç farklı K9 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği.....	81
Şekil 3. 20	Üç farklı K9 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği	81
Şekil 3. 21	Üç farklı K21 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği.....	83
Şekil 3. 22	Üç farklı K21 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği	83
Şekil 3. 23	Üç farklı K23 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği.....	85
Şekil 3. 24	Üç farklı K23 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği	85
Şekil 3. 25	ENOblock®'un kimyasal yapısının gösterimi.....	87
Şekil 3. 26	Farklı ENOblock® konsantrasyonlarına karşı <i>Ta</i> ENO üzerinde elde edilen % inhibisyon değerleri	88
Şekil 3. 27	Afinite kromatografisinden elde edilmiş saf <i>Ta</i> ENO'ya ait kütle spektrumu	89
Şekil 3. 28	50 µM (a), 100 µM (b) ve 200 µM (c) K21 kumarin türevini içeren <i>Ta</i> ENO çözeltilerinin kütle spektrumları.....	91
Şekil 3. 29	<i>T. annulata</i> , <i>T. parva</i> , <i>T. gondii</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>L. esculentum</i> , <i>B. taurus</i> , <i>H. sapiens</i> ve <i>S. cerevisiae</i> enolazının amino asit dizilerinin MUSCLE programı kullanılarak kıyaslanması	94
Şekil 3. 30	<i>Ta</i> ENO modellerinin kalıp proteinler ile süperimpozisyonu.....	96
Şekil 3. 31	<i>Ta</i> ENO'nun açık (a) ve kapalı (b) konformasyon modellerinin Ramachandran plot diyagramları ve <i>Ta</i> ENO'nun açık (c) ve kapalı (d) konformasyon modellerinin siyah nokta ile belirlenmiş Z-skorlarının grafikleri.....	98
Şekil 3. 32	<i>Ta</i> ENO amino asit dizisinin ikincil yapı analizi	99

Şekil 3. 33	<i>Ta</i> ENO'nun N-terminal domaini (a) ve TIM-fıçı ile C-terminal domainin (b) görüntüsü ve bu domainlerin düz katı yüzey görüntüsü (c).....	100
Şekil 3. 34	<i>Ta</i> ENO'nun süperimpozisyonunun, halka bölgelerinin ve elektrostatik potansiyel enerjisinin model üzerinde gösterimi.	102
Şekil 3. 35	<i>Ta</i> ENO'nun potansiyel ilaç bağlanma bölgelerinin ilaç skorları.....	103
Şekil 3. 36	<i>Ta</i> ENO'nun DoGSiteScorer yazılımı ile elde edilen görüntüleri ve moleküler yanaştırma sonuçları	104
Şekil 3. 37	<i>Ta</i> ENO'nun potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri	106
Şekil 3. 38	Kumarin 8 bileşiğinin <i>Ta</i> ENO'nun P0 bölgesi ile etkileşimi.....	108
Şekil 3. 39	Kumarin 21 bileşiğinin <i>Ta</i> ENO'nun P2 bölgesi ile etkileşimi.....	109
Şekil 3. 40	Kumarin 21 bileşiğinin <i>Ta</i> ENO üzerindeki dipeptid insersiyon bölgesi ile etkileşimi.....	111
Şekil 3. 41	Kumarin 21 bileşiğinin <i>Ta</i> ENO üzerindeki pentapeptid insersiyon bölgesi ile etkileşimi.....	112
Şekil 3. 42	<i>Ta</i> ENO üzerinde belirlenen tüm bölgelerin seçilen kumarin türevleri ile gösterimi.....	114

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri 31
Çizelge 2. 2	<i>Ta</i> ENO'nun stabilizasyonunda kullanılan stabilizatörler..... 41
Çizelge 2. 3	Ni-NTA agaroz kolon dolgu maddesi ile yapılan afinite kromatografisi protokolündeki optimizasyon uygulamaları 42
Çizelge 2. 4	Bradford yönteminde hazırlanan protein çözeltilerin içeriğine eklenen miktarlar 47
Çizelge 3. 1	2., 3., 6. ve 14. günün sonunda yapılan enzim aktivite ölçümleri.....57
Çizelge 3. 2	+4 °C'de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri..... 59
Çizelge 3. 3	-20 °C'de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri..... 60
Çizelge 3. 4	-80 °C'de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri..... 61
Çizelge 3. 5	Kumarin türevlerinin 100 µM kumarin konsantrasyonundaki % inhibisyon değerleri..... 71
Çizelge 3. 6	Kumarin türevlerinin IC ₅₀ ve standart sapma değerleri 75
Çizelge 3. 7	Belirli substrat konsantrasyonlarındaki reaksiyonlar sonucu elde edilen hız değerleri..... 77
Çizelge 3. 8	K8 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri 78
Çizelge 3. 9	K9 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri 80
Çizelge 3. 10	K21 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri..... 82
Çizelge 3. 11	K23 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri 84
Çizelge 3. 12	<i>Ta</i> ENO ile yapılan reaksiyonlar sonucunda kullanılan ENOblock® konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri 87
Çizelge 3. 13	<i>Ta</i> ENO'nun oluşturulan modellerinin validasyonu 96
Çizelge 3. 14	Protein dizi analizi ve moleküler yanıştırma analizleri kullanılarak 2-PG ile potansiyel hidrojen bağı etkileşimleri belirlenen <i>Ta</i> ENO'nun aktif bölge amino asit rezidüleri..... 105
Çizelge 3. 15	Belirlenen kumarin türevlerinin P0 bölgesi ile yanıştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi 107

Çizelge 3. 16	Belirlenen kumarin türevlerinin P2 bölgesi ile yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi	109
Çizelge 3. 17	Belirlenen kumarin türevlerinin dipeptid insersiyonun bulunduğu cep bölgesi ile yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi	110
Çizelge 3. 18	Belirlenen kumarin türevlerinin pentapeptid insersiyonun bulunduğu cep bölgesi ile yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi	112
Çizelge 3. 19	Kumarin türevlerinin belirlenen bölgelere yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore skorları	113
Çizelge 3. 20	Kumarin türevlerinin belirlenen bölgelere yanaştırma sonucu elde edilen ΔG bağlanma enerjileri.....	113

**THEILERIOSIS'İN TEDAVİSİNDE KULLANILABİLECEK YENİ BİR İLAÇ ADAYI
TESPİT ETMEK İÇİN KUMARİN TÜREVLERİNİN *THEILERIA ANNULATA*
ENOLAZINI İNHİBİSYON POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem YAKARSÖNMEZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Eş Danışman: Doç. Dr. Özkan DANIŞ

Tropikal theileriosis, bir apikompleksan parazit olan *Theileria annulata*'nın neden olduğu kene kaynaklı bir hastalıktır. Türkiye'de tüm bölgelerde bu parazitin görülmesi ile birlikte sığırlarda yüksek hastalık ve ölüm oranına sebep olduğu için ekonomik bir öneme sahiptir. Son zamanlarda *T. annulata*, yaygın olarak kullanılmakta olan antitheilerial ilaç buparvaquone'a karşı direnç geliştirmektedir ve bu nedenle alternatif ilaç adaylarının belirlenmesi gerekmektedir. Enolazın glikolizde 2-fosfoglisarik asidin fosfoenolpirüvata dönüşümünü katalizlemesi, çeşitli hücresel fonksiyonlarla ilişkili olabilmesi ve hücre yüzeyinde bir plazminojen reseptörü şeklinde bulunarak parazitik virülansa aracılık edebilmesi, bu enzimin ilaç bağlanabilen potansiyel bir protein hedefi olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada *T. annulata* enolazının inhibisyonu için enzim inhibitörü adayı olarak kumarin türevleri seçilmiştir. Bu bileşikler bitkilerde doğal olarak bulunur ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Ayrıca, kumarin türevleri genellikle düşük toksisite ile ilişkilendirilmiş olduğundan potansiyel terapötik ilaç adayları olarak kullanılabilir.

Bu çalışmanın amacı, henüz bilinen bir inhibitörü olmayan *T. annulata* enolazının (TaENO) aktivitesi üzerine kumarin türevlerinin inhibisyon potansiyelinin literatürde ilk defa değerlendirilmesidir. Deneysel çalışmalar kapsamında ilk olarak ekspresyon gerçekleştirilerek protein afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve enzim stabilizasyon

çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kumarin türevlerinin inhibitör tarama analizleri, IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi, inhibisyon mekanizmasının tespit edilmesi çalışmaları yapılarak, son aşamada protein homoloji modelleme ve inhibitör varlığında ve yokluğunda moleküler yavaşıtma ile yapısal olarak analiz edilmiştir.

İnhibisyon çalışmaları öncesinde ilk olarak, saflaştırılan *Ta*ENO'nun protein stabilizasyon analizleri yapılmış ve enzim çözeltisine 6 M etilen glikol eklendiğinde +4 °C'de *Ta*ENO'nun stabil kaldığı belirlenmiştir. İnhibitör tarama analizleri yüksek saflıktaki (>% 95) *Ta*ENO ile 38 adet kumarin türevi kullanılarak yapılmıştır. Beş kumarin türevinin [3-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on (K5); 4-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on (K8); 4-(3,4-dihidroksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on (K9); 4-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on (K21) ve 3-(3,4-dihidroksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on (K23)] bu enzim üzerinde en yüksek (>% 90) inhibitör etkisine sahip olduğu tespit edilmiş ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Bu kumarin türevleri içinde en düşük IC₅₀ değeri K21 kumarin türevi için 8,871 µM olarak bulunmuştur. K5, K8, K9 ve K23 için IC₅₀ değerleri sırasıyla 27,910 µM, 10,450 µM, 13,170 µM ve 10,863 µM olarak belirlenmiştir. Belirlenen en düşük (<15 µM) IC₅₀ değerlerine sahip dört kumarin türevinin (K8, K9, K21 ve K23) inhibisyon mekanizmasını tespit etmek için kinetik analizler gerçekleştirilmiş ve bu bileşiklerin *Ta*ENO aktivitesini yarışmasız inhibisyon mekanizması ile inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca literatürde tavşan kas enolazı üzerinde çalışmış olan ticari inhibitör ENOblock®'un, *Ta*ENO'yu inhibisyon potansiyeli de değerlendirilmiş ve *Ta*ENO üzerinde çok düşük bir inhibitor etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (100 µM'da % 15,04 inhibisyon). Tüm bu çalışmalarda en yüksek inhibisyon potansiyeline sahip olduğu belirlenen K21 kumarin türevinin *Ta*ENO'ya bağlandığı MALDI-TOF kütle spektroskopisi kullanılarak doğrulanmıştır.

T. annulata enolazının açık ve kapalı konformasyonları homoloji modelleme metodları kullanılarak modellenmiştir. Bu modeller, korunmuş katalitik halka bölgeleri ve aktif bölge rezidüleri ile enolaz süperailisi içerisinde benzer katlanma modelleri göstermiştir. *Ta*ENO modelinin aktif bölge ve potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri protein dizi analizleri ile karşılaştırılarak öngörülmüştür. Substratın (2-Fosfoglisirik asit, 2-PG) ve belirlenen dört kumarin türevinin *Ta*ENO üzerinde muhtemel bağlanma pozisyonlarının öngörülmesi için moleküler yavaşıtma analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevlerinin, *Ta*ENO'nun güçlü, substrat analogu olmayan ve yarışmasız inhibitörleri olduğunu ortaya koymaktadır. *In silico* analizler de en yüksek inhibisyon gösteren K8 ve K21 kumarin türevlerinin inhibisyon mekanizmasına paralel olarak, aktif bölge dışında belirlenen bölgelere iyi bir afinite ile bağlandığı göstermiştir. Bu tez çalışması ile yapıya dayalı ilaç geliştirme yaklaşımı kullanılarak literatürde ilk defa *Ta*ENO inhibitörleri tanımlanmış ve bu inhibitörler kullanılarak var olan ilaçlara direnç geliştirmiş olan *T. annulata* enfeksiyonlarının tedavisine yönelik yeni ilaç adayı geliştirme yönünde ileri *in vitro* ve *in vivo* analizlerin önü açılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Theileriosis, ilaç direnci, yapıya dayalı ilaç tasarımı, enolaz, kumarin, enzim inhibisyonu.

ABSTRACT

INVESTIGATION ON *THEILERIA ANNULATA* ENOLASE INHIBITION POTENTIAL OF COUMARIN DERIVATIVES TO IDENTIFY NEW DRUG CANDIDATES TO BE USED IN THE TREATMENT OF THEILERIOSIS

Sinem YAKARSÖNMEZ

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Özkan DANIŞ

Tropical theileriosis is a tick-borne disease caused by an apicomplexan parasite *Theileria annulata*. The disease has an economic importance due to the high rate of morbidity and mortality accompanied by the appearance of this parasite in all geographical regions of Turkey. Resistance against commonly used antitheilerial drug, buparvaquone, has already been reported and therefore, alternative drug candidates should be identified. In this way, enolase might be a druggable protein target because the enzyme is a multifunctional protein that catalyzes the conversion of 2-phosphoglyceric acid to phosphoenolpyruvate in glycolysis and was observed as a plasminogen receptor could interfere with the virulence of parasites. In this study, coumarin derivatives were selected as potential enzyme inhibitors for inhibition of *T. annulata* enolase. These compounds are naturally found in plants and have diverse biological activities. In addition, coumarins could be used as potential therapeutic drug candidates due to their low toxicity.

The aim of this study was to assess inhibition potential of coumarin derivatives on *T. annulata* enolase (*Ta*ENO) activity, for the first time in literature. Firstly, the protein was expressed, and purified by affinity chromatography and then, enzyme stabilization

studies were performed. Inhibitor screening analyses, determination of IC₅₀ values and identification of inhibition mechanism were conducted for coumarin derivatives. Finally, protein was structurally analyzed by homology modelling and molecular docking in the presence and absence of inhibitor.

Prior to inhibition studies, protein stabilization analyses of *Ta*ENO were performed and it was found that the enzyme remained stable with adding 6 M ethylene glycol at +4 °C. Inhibitor screening analyses were carried out using 38 coumarin derivatives on highly purified *Ta*ENO (>95%). Five coumarin derivatives [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one (K5); 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one (K8); 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one (K9); 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one (K21) and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one (K23)] showed high inhibitory effects (>90%) among 38 coumarin derivatives and IC₅₀ values of these compounds were calculated. The lowest IC₅₀ value were determined as 8,871 µM for K21 coumarin derivative. IC₅₀ values for K5, K8, K9 and K23 were also found as 27,910 µM, 10,450 µM, 13,170 µM and 10,863 µM, respectively. Kinetic analyses were performed to determine inhibition mechanisms of four coumarin derivatives (K8, K9, K21 and K23) that had IC₅₀ values of <15 µM. Our results indicated that these compounds inhibited the enzyme activity by uncompetitive inhibition. Inhibition potential of a commercial enolase inhibitor, ENOblock®, has been studied on rabbit muscle enolase in the literature was also evaluated, and it was found that the inhibitor possesses very low inhibitory effect on *Ta*ENO (15,04% inhibition at 100 µM). In addition, the binding of K21 coumarin derivative which showed the highest inhibition potential on *Ta*ENO was confirmed by using MALDI-TOF mass spectrophotometry.

Open and closed conformations of *T. annulata* enolase were modelled by homology modelling. These models showed the similar folding patterns within enolase superfamily with conserved catalytic loops and active site residues. Active site and potential drug binding regions of *Ta*ENO model were predicted by comparison with protein sequence analysis. Molecular docking analyses of the substrate (2-phosphoglyceric acid, 2-PG) and the four coumarin derivatives were also performed to predict possible binding poses on *Ta*ENO.

Taken together, our results revealed that these coumarin derivatives (K8, K9, K21 and K23) are potent, non-substrate, uncompetitive inhibitors of *Ta*ENO. *In silico* analyses have also predicted that K8 and K21 coumarin derivatives which had high inhibitory effects on *Ta*ENO according to the results of inhibition analyses, were interacted with high affinity to the potential regions out of the active site. In this study, potential *Ta*ENO inhibitors were described for the first time in the literature by structure-based drug design approach. These inhibitors may be used to facilitate further *in vitro* and *in vivo* analysis towards developing new drug candidates for the treatment of drug resistant *T. annulata* infections.

Keywords: Theileriosis, drug resistance, structure-based drug design, enolase, coumarin, enzyme inhibition.

1.1 Literatür Özeti

Theileria annulata sığırlarda tropikal theileriosis'e neden olan, vektör keneler tarafından aktarılan bir apikompleksan parazittir ve dünya genelinde bu hastalığın riskinin yüksek olması büyük önem taşımaktadır [1], [2], [3]. Yüksek sayıda ölüm ile sonuçlanan *T. annulata* enfeksiyonu Türkiye'de yedi coğrafik bölge de görülmekte olup ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır [1], [4], [5]. Bu nedenle tropikal theileriosis'in tedavisi ülkemizde de hayvancılık açısından çok önemlidir. Bu hastalığın tedavisinde özellikle buparvaquone ilacı uzun yıllar etkin olarak kullanılmıştır [6]. Ancak, *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı direnç geliştirdiği son yıllarında yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir [7], [8], [9]. Önümüzdeki yıllarda bu ilacın yüksek etkinlikte kullanılamayacağı öngörülmektedir. Bu nedenle direnç raporları ile beraber var olanlardan farklı etki mekanizmasına sahip yeni ve daha etkin ilaçların hızla geliştirilmesinin gerekliliği ve ilaç tasarımının uzun bir süreç olması nedeniyle direnç yaygınlaşmadan tedbir alınması gerekliliği bilinen bir gerçektir.

Yapıya dayalı ilaç tasarımı bir hedef seçimini, hedefin yapısal olarak değerlendirilmesini, ilaç tasarımının yönlendirilmesi için gerekli bileşiklerin ve yöntemlerin seçilmesini ve belirlenen ilacın değerlendirilmesini temel almaktadır. Bu yaklaşım içerisinde hedef seçimi en önemli basamaklardan birisidir. Belirlenen hedef protein hücrede kritik bir yolak içerisinde yer almalı ve patojenin ölümüne yol açacak derecede eleme özelliğine sahip olmalıdır [10]. Enolaz, hücresel olarak birçok fonksiyonunun yanı sıra hayati öneme sahip olan glikolizis yolağında 2-fosfoglisarik

asidin fosfoenolpirüvata dönüşümü basamağını katalizlemektedir [11], [12], [13]. Ayrıca, hücre yüzeyinde bulunan enolazlar patojenlerin yayılmasını kolaylaştıran plazminojen-bağlama proteini olarak da görev yapmaktadırlar [12], [14]. Literatürde farklı parazitlerle yapılan çalışmalar enolazın fonksiyonel önemini göstermektedir [12]. *T. annulata*'nın şizont aşamasında ağırlıklı olarak anaerobik solunum yaptığı bilinmektedir [15], [16]. Enolazın, hem aerobik hem de anaerobik solunum metabolizmasında da ortak olarak bulunan glikoliz basamağında görev alması ve parazitin patojenik özelliğinin oluşmasında rol alması nedeniyle, yapılan bu tez çalışmasında *TaENO*'nun seçici inhibisyonunun gerçekleştirilmesi ile parazitin yaşamsal fonksiyonlarının ortadan kaldırılması yönünde önemli bir ilaç hedefi olacağı öngörülmüştür.

Enzim inhibitörleri, enzimatik reaksiyonun yavaşlatılmasını veya durdurulmasını sağlayan en önemli farmasötik maddelerden biridir [17]. İnhibitör olarak da kullanılan kumarinler çeşitli bitkilerin içerisinde bulunan doğal bileşiklerdir ve bu bileşikler düşük toksisite ile farmakolojik özelliklere sahip analogların geliştirilmesinde önemli olmaktadır. Ayrıca, kumarin türevlerinin enzim inhibisyonunun dışında birçok tedavi edici etkileri de bulunmaktadır [18], [19], [20], [21]. Literatürde kumarin türevlerinin enzim inhibitörü olarak tanımlanmış olması nedeniyle yapılan tez çalışmasında bu bileşikler *TaENO*'nun seçici inhibisyonunun gerçekleştirilmesi için tercih edilmiştir.

T. annulata'nın metabolizmasında hayati role sahip olan enolazın saflaştırılarak, yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımı kapsamında kumarin türevleri ile seçici inhibisyonunun gerçekleştirilmesi bu tez çalışmasının temel amacıdır. Bu amaç doğrultusunda literatürde ilk defa kumarin türevlerinden oluşan bir kütüphanenin *TaENO* üzerindeki inhibitör etkisi *in vitro* ve *in silico* analizler ile test edilmiştir. Bu tez çalışmasının sonucunda literatürde ilk defa var olan ilaçlardan farklı etki mekanizmasında sahip alternatif bir yaklaşımın geliştirilmesi ile tropikal theileriosisin tedavisinde kullanılma potansiyeli olan yeni ilaç adayları belirlenmiştir.

1.1.1 Theileriosis

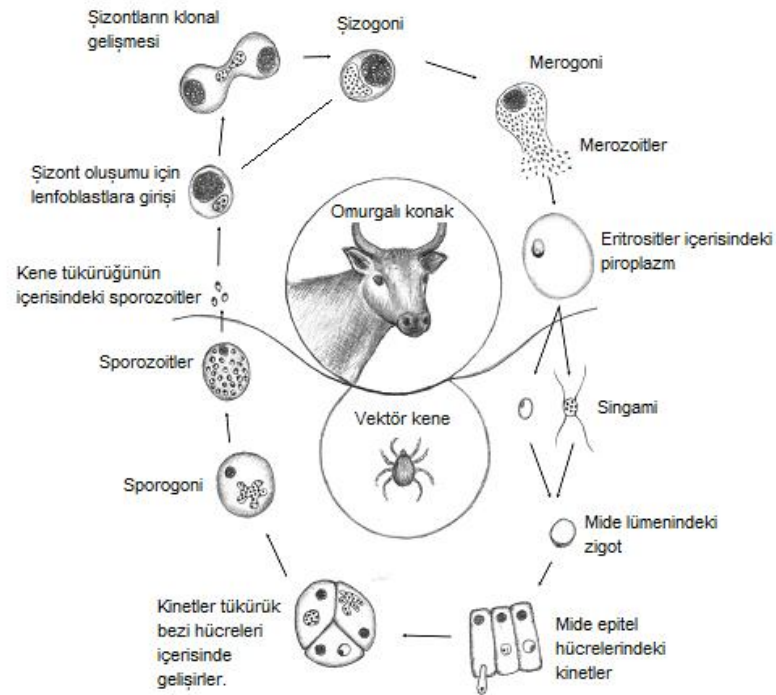
Theileriosis, *Theileria* cinsine ait olan hemoprotozoan parazitlerin ruminantlarda oluşturduğu kene kaynaklı protozoal bir hastalıktır. Hemoprotozoan hastalıklar hayvancılık sektöründe yıkıcı kayıplara neden olmalarının yanı sıra dünya çapında süt endüstrisinde önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. Theileriosis kaynaklı ölüm oranları, azalan süt verimi, kilo kayıpları, hastalık kontrolü ve önleme maliyetleri nedeniyle hastalığın küresel açıdan ciddi ekonomik etkisi bulunmaktadır [1].

Theileriosis'in oluşmasına neden olan *Theileria*, dünyanın büyük bir bölümünde vahşi ve evcil *Bovidae* türlerini enfekte eden zorunlu hücre içi protozoan parazitleridir. Sığırları enfekte eden *Theileria* türlerinin arasında en patojenik iki tür *Theileria parva* ve *Theileria annulata*'dır [1]. *Theileria* türleri, sporozoitler tarafından lökositlerin enfeksiyonu, şizontların merozoitlere olgunlaşması ve sonrasında prioplazmaları oluşturan eritrositlerin enfeksiyonu ile diğer parazitlerden ayırt edilmektedir [22].

Theileria cinsi için genelleştirilmiş yaşam döngüsü, besleme bölgesi içerisinde kenenin beslenmesi sırasında enfektif sporozoitlerin salgılanmasını içermektedir. Daha sonra sporozoitler lökositleri enfekte ederler ve merogoni tarafından çoğalırlar. Oluşan merozoitler salınır ve piroplazm basamağını oluşturmak üzere eritrositlere akın ederler. Bir sonraki beslenme döngüsü sırasında, vektör keneler piroplazmaları içlerine çeker ve salınan parazitler kene midesi içerisinde singamiye uğrayarak zigotu oluştururlar. Zigot kene midesinin epitel hücrelerini enfekte eden hareketli kinetlere bölünür ve vücut sıvısında hareket ederek tükürük bezlerine ulaşırlar. Kene tarafından beslenmenin başlamasından sonra tükürük bezi içerisindeki sporogoni, sporozoitlerin çoğalmasıyla sonuçlanır. Erişkin kenelerin beslenme bölgesine sporozoitleri enjekte etmesi ile döngü devam eder (Şekil 1. 1) [22]. Ekonomik açıdan sığır ve küçükbaş hayvanları enfekte eden önemli *Theileria* türleri *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Hyalomma* ve *Haemaphysalis* cinsi keneler tarafından transfer edilirler. Bu kene kaynaklı salgınlar sonucunda tarım ve hayvancılıkta yüksek ekonomik kayıplar oluşmaktadır [22], [23].

Theileriosis, hayvancılığın gelişiminde önemli kısıtlamalara neden olur. Bu hastalık sığırlarda yüksek oranda hastalığın yayılmasına ve ölüme yol açmaktadır. Böylece endemik bölgelere gelişmiş sığırların girişi azalmaktadır. Endemik bölgelerde sığır

kalitesinin düşük olması sığır sanayisinin gelişmesini, üreticilerin ve ailelerinin gelirlerinin artmasını engellemektedir. Bu nedenlerden dolayı hastalığın önlenmesi ve kontrol edilmesi için çeşitli stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir [1]. İlaç direncinin literatürde rapor edilmesini takiben gerçekleştirilen bu tez, tropikal theileriosisin tedavisine yönelik ilk yapıya dayalı ilaç tasarım çalışması olma niteliğine sahiptir.



Şekil 1. 1 *T. parva* örneği kullanılarak *Theileria* türlerinin yaşam döngüsünün gösterimi [22].

1.1.1.1 *Theileria annulata* Enfeksiyonu (Tropikal Theileriosis)

Sığırlarda tropikal theileriosis'e neden olan *Theileria annulata*, *Hyalomma* cinsi *Ixodid* keneleri tarafında transfer edilen bir apikompleksan parazittir [1], [2], [3]. *T. annulata*'nın yaşam döngüsü diğer *Theileria* türlerine benzer şekilde gerçekleşmektedir [3]. Klinik theileriosis tanısı genellikle, Giemsa boyalı lenf nodu biyopsi sürüntülerinde makroşizont ile enfekte olan lökositlerin veya periferik kan sürüntülerinde piroplazmaların varlığının mikroskopik incelemeler ile saptanmasına dayanmaktadır [8]. Serolojik yöntemlerle tanı ise indirekt floresans antikor testi (IFAT) ile yapılmaktadır. Bu testte antijen, enfekte hayvanlardan ya da hücre kültüründen türetilen şizont veya piroplazm antijenlerinden hazırlanabilmektedir. Bu yöntem IFAT antijenlerinin geliştirilmesi, monoklonal antikorlar kullanılarak farklı türlerin ayırt edilmesi ve farklı

parazit popölasyonlarının araştırılması ile yapılmaktadır [22]. Ayrıca, spesifik genler ve türler hedef alınarak geleneksel veya gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemlerine dayalı moleküler analizlerle de bu hastalığın tanısı yapılabilmektedir. Moleküler tekniklerin diğer tanı tekniklerine kıyasla daha spesifik ve daha hassas olduğu görülmektedir, bu nedenle hastalığa ait gizli enfeksiyonların kolay belirlenmesi de sağlanabilmektedir [8], [22].

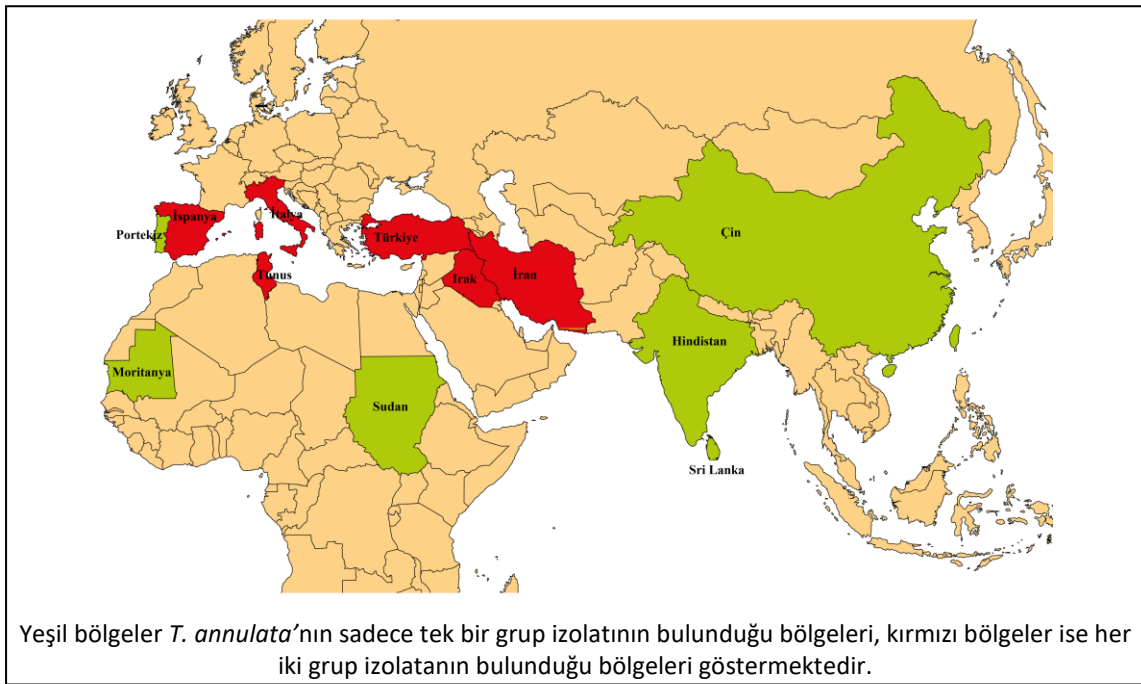
Tropikal theileriosis sığırlarda yüksek ateş, halsizlik, kilo kaybı, uygunsuz iştah, genişlemiş lenf düğümleri ve anemi görülmesi ile tespit edilebilmektedir. Ayrıca, ishal ve dizanteri bu enfeksiyonun daha sonraki aşamalarında görülebilmektedir. Dünya genelinde yaklaşık 250 milyon sığır bu hastalığın riski altında bulunmaktadır [1], [23]. Endemik bölgelerde mevcut kontrol stratejileri, vektörün belirli maddelerle öldürülmesini, parazitin canlı zayıflatılmış hücre hattı ile bağışıklık kazandırılmasını ve ilaç tedavilerini içermektedir. Hastalık etkin tedavi eksikliğinden dolayı 1970'li yıllara kadar yüksek ölümlerle sonuçlanmıştır [7], [24], [25].

T. annulata nedeniyle oluşan en önemli kayıp, hastalık taşıyıcılarının süt veriminde % 22 ile % 38 arasında görülen kayıptır [1]. Ayrıca, vektör kenelere karşı kullanılan kimyasal maddelerin pahalı olması, ilaçların çevreye karşı zararlı olmasının yanı sıra hayvanlarda ete ve süte geçmesi, uzun süre ilaç kullanımı sonucunda ilaca karşı direnç oluşumu bu hastalığın önlenmesinde görülen bazı problemlerdir [4]. Belirtilen tüm bu durumlar, hastalık ile mücadele için alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

1.1.1.2 Tropikal Theileriosis'in Tüm Dünyada ve Türkiye'de Görölme Sıklığı

T. annulata enfeksiyonunun Güney Doğu Avrupa, Güney Avrupa (Portekiz, İspanya, İtalya, Bulgaristan, Yunanistan ve Türkiye), Yakın ve Orta Doğu, Hindistan, Çin ve Orta Asya'da yaygın olduğu bilinmektedir [1]. 2014 yılında yayınlanan üç kıta üzerinde yapılan bir çalışmada *T. annulata*'nın genetik çeşitliliği ve filogenetik analizi için immünodominant major merozoit piroplazm yüzey antijeni olan Tams1 polipeptidi marker olarak kullanılmış ve yüksek sayıdaki Tams1 dizisi filogenetik analiz ile araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda bu protein dizilerinin iki ana gruba ayrıldığı ve bazı izolatların coğrafik özgülük gösterdiği belirlenmiştir [26]. Şekil 1. 2'de bu iki ana

grup *T. annulata* izolatlarının bulunduğu bölgelerin coğrafik dağılımı yer almaktadır ve özellikle Türkiye'nin de içerisinde bulunduğu birkaç ülkede her iki grup *T. annulata* izolatlarının varlığı gösterilmiştir [26]. Ayrıca, *T. annulata*'yı transfer ederek hastalığın oluşumunda etkili olan *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Hyalomma marginatum marginatum* ve *Hyalomma anatolicum excavatum* gibi belirli *Ixodid* kenelerinin de özellikle yarı kurak alanlar olmak üzere Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir [27].



Şekil 1. 2 *T. annulata*'nın coğrafik dağılımı [26].

Tropikal theileriosis Türkiye'nin en önemli sığır hastalıklarından biridir ve yapılan mikroskopik, serolojik, moleküler tanı analizleri ile *T. annulata*'nın yedi coğrafik bölgede de bulunduğu rapor edilmiştir [4], [28], [29]. Türkiye'deki sığır mevcudunun yaklaşık % 60'ını oluşturan saf ve melez hayvanlar hastalık riski altında bulunmaktadır. Tropikal theileriosis'e maruz kalan bağışıklığı olmayan sığırlar için, saf ırklarda % 70 ölüm oranı ve melez ırklarda % 45'ten daha az bir ölüm oranı rapor edilmiştir. Ancak, iyileşme sonrası ön bağışıklığın elde edildiği erken evrede parazitin bulunduğu sığırlarda yaklaşık % 15-20 arasında ölüm oranları görülmektedir [29].

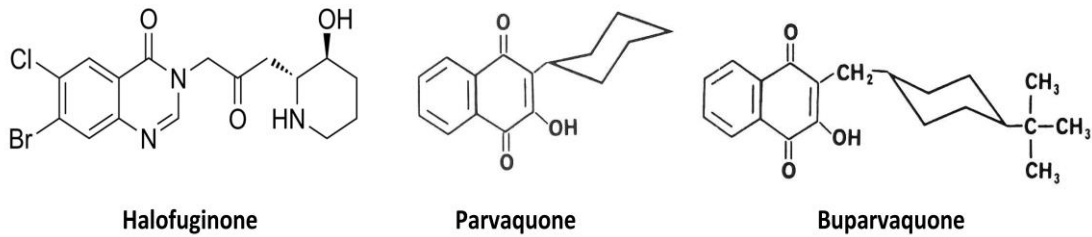
T.annulata'nın Türkiye'deki farklı bölgelerde mikroskopik görülme sıklığının % 0 ve % 60,5, serolojik görülme sıklığının % 1,8 ve % 91,4 arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca, moleküler tekniklerle yapılan çalışmalarda da bu parazitin görülme sıklığının % 15,4 ve

% 61,2 arasında olduğu tespit edilmiştir [5]. Yapılan bir çalışmada, Türkiye'nin doğu bölgesinde hayvanların % 45'inden fazlasında *Theileria* türlerinden en az birinin görüldüğü, bunlardan % 39,28'inin *T. annulata* için pozitif olduğu ve % 7,14'ünün diğer *Theileria* türleri için pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *T. annulata*'nın görülme sıklığının bu bölgede çok yüksek olduğunu ve aynı zamanda diğer *Theileria* türlerinin de bu bölgede mevcut olduğunu göstermektedir [27]. Ayrıca, Aydın ilinde mikroskopik olarak yapılan analizlerde *T. annulata*'nın prevalansı % 1,9 ile % 14,3 arasında görülmüştür. Ege bölgesinde daha önceden de yapılan mikroskopik ve serolojik taramalarda değişik yüzdelerde (mikroskopik yöntem ile % 43,2 ve % 9,0; serolojik yöntem ile % 40,0 ve % 31,0) *T. annulata* görülme sıklığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar parazitin bu bölgede de yaygın olduğunu göstermektedir [4]. Türkiye'nin İç Anadolu bölgesinde, Ankara ve çevresinde *T. annulata* enfeksiyonu için yapılan epidemiyolojik bir çalışmada da yüksek oranlarda bu enfeksiyonun görüldüğü tespit edilmiştir [28]. Kapadokya bölgesindeki ayrı bir araştırmada ise *T. annulata*'nın ortalama görülme sıklığı mikroskopik analizlerde % 60,5 serolojik analizlerde % 67,5 olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma, Kapadokya bölgesinin tropikal theileriosis için endemik bir alan olduğunu göstermektedir [29]. Ekonomik açıdan bakıldığında ise; Türkiye'de Kapadokya ve Kayseri gibi sabit endemik bölgelerde tropikal theileriosis'in neden olduğu ekonomik kayıp tahmini olarak 598.000, 133.000 ve 130.000 Amerikan dolarıdır. Bu nedenlerden dolayı *T. annulata* enfeksiyonu, Türkiye'de hayvancılık sektöründe önemli sağlık ve yetiştiricilik sorunlarına neden olmaktadır [5].

1.1.2 *T. annulata*'nın ilaç Direnci

Sığırlarda tropikal theileriosis'in tedavisinde halofuginone, parvaquone ve buparvaquone gibi ilaçlar kullanılmaktadır (Şekil 1. 3) [6]. 1979 yılında yapılan bir çalışmada antikoksidiyal halofuginone hidrobromürün *in vivo* olarak *T.annulata* ve *T. parva*'ya karşı etkili olduğu gösterilmiştir [30]. Daha sonra menoctone'un iki analogu olarak parvaquone ve buparvaquone geliştirilmiştir ve laktat tuzu olarak halofuginone ile birlikte bu iki bileşik daha etkin antitheilerial maddeler olarak kullanılmaya başlamıştır [31]. Bu bileşiklerden biri olan parvaquone daha çok *T. parva* enfeksiyonu olan doğu sahili ateşinin tedavisinde kullanılmaktadır ve bu bileşiğin 1980'lerde yapılan çalışmalarda % 80-90 arası iyileşmeye neden olduğu görülmüştür [32], [33], [34].

Buparvaquone ise, sığırlar için son zamanlarda kullanılan en etkili antittheilerial ilaç olup *in vitro* ve *in vivo* olarak birçok çalışmada test edilmiştir [8]. Uygulanan buparvaquone'un *T. annulata*'nın piroplazm ve şizont formlarını değişik zamanlarda dejenerasyona uğrattığı belirlenmiştir [6]. Ayrıca *T. parva* kültürü üzerinde buparvaquone'ın etkisini belirlemek için yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında konak hücre mitokondrileri haricinde şizontlara özgü bir etki olduğu belirlenmiştir. Bu durum buparvaquone'ın parazitin mitokondriyal elektron taşıma sisteminin spesifik bir inhibitörü olduğunu desteklemektedir [35], [36]. Özellikle *T. annulata* tarafından enfekte edilmiş sığırların tedavisi için 2,5 mg/kg buparvaquone önerilmektedir, ancak ikinci bir doz gerekli olabilmektedir [8], [31]. Ayrıca, Türkiye'deki analizlerde hastalığın erken dönemlerinde uygulanan bu ilacın iyileşmede çok etkili olduğu fakat geç dönemde uygulandığında ise daha az etkili olduğu görülmüştür. 2008 yılında yapılan bir çalışmada *T. annulata* ile doğal enfekte olan 10 sığira tek doz buparvaquone uygulaması yapılmasının, iyileşmede klinik ve laboratuvar bulguları bakımından etkili olduğu tespit edilmiştir. Fakat buparvaquone'un tam olarak etkinliğinin belirlenmesinde daha fazla sığırın kullanıldığı, kontrol grubunu da içeren ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir [6].



Şekil 1. 3 Halofuginone [37], parvaquone ve buparvaquone'ın kimyasal yapısı [34].

Buparvaquone sığırlarda tropikal theileriosis tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Ancak bu ilacın fiyatı çok yüksektir ve bu durum ekonomik açıdan kullanımını sınırlamaktadır [6]. Buparvaquone'ın teminindeki ekonomik sıkıntıların yanı sıra son yıllarda *T. annulata*'nın bu ilaca karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir [7], [8], [9]. 2010 yılında yapılan bir çalışmada, tekrarlı buparvaquone enjeksiyonu yapılmasına rağmen tedavi edilen yedi inekten, dördü ölmüş ve inekler izlendiğinde tedavi sonrası hematokritte sürekli azalma, ateşin devamlılığı gibi etkenler ile hastalığın iyileşme

seyrinde hiçbir gelişme olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, deneysel olarak enfekte edilen hayvanlar, klinik gözlemler ve post-buparvaquone tedavisi *T. annulata* parazitine karşı bu ilacın genel tedavi etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlara göre yapılan bu çalışma ile ilk defa *in vivo* olarak *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir [7]. 2012 yılında yapılan bir çalışmada ise, sekiz enfekte olmuş hayvandan yedisinde buparvaquone tedavisine rağmen ölüm meydana gelmiştir. Moleküler analizler ile inceleme yapıldığında *T. annulata*'nın sitokrom b geninde iki farklı tek baz mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar, parazitin sitokrom b proteininin ilaç bağlanma bölgelerinde önemli aminosit değişimlerine (109. serin aminosidinin glisine, 233. prolin aminosidinin serine dönüşümü) neden olmaktadır ve bu ilaca karşı direnç gelişimi ile ilişkilendirilmektedir [8]. Son yıllarda yayınlanan başka bir çalışmada ise, buparvaquone'a karşı dirençli olan *T. annulata* suşunun peptidil-prolil izomeraz (*TaPIN1*) geninde bir mutasyon tespit edilmiştir. Bu ilaca dirençli izolattan alınan genomik DNA ile yapılan analizde *TaPIN1* geni dizilenmiş ve katalitik halkasında belirlenen mutasyon ile 53. alanin amino asidinin proline dönüştüğü görülmüştür [9]. Başka bir kanıt olan bu mutasyon parazitin direnç gelişiminin devamlılığını göstermektedir.

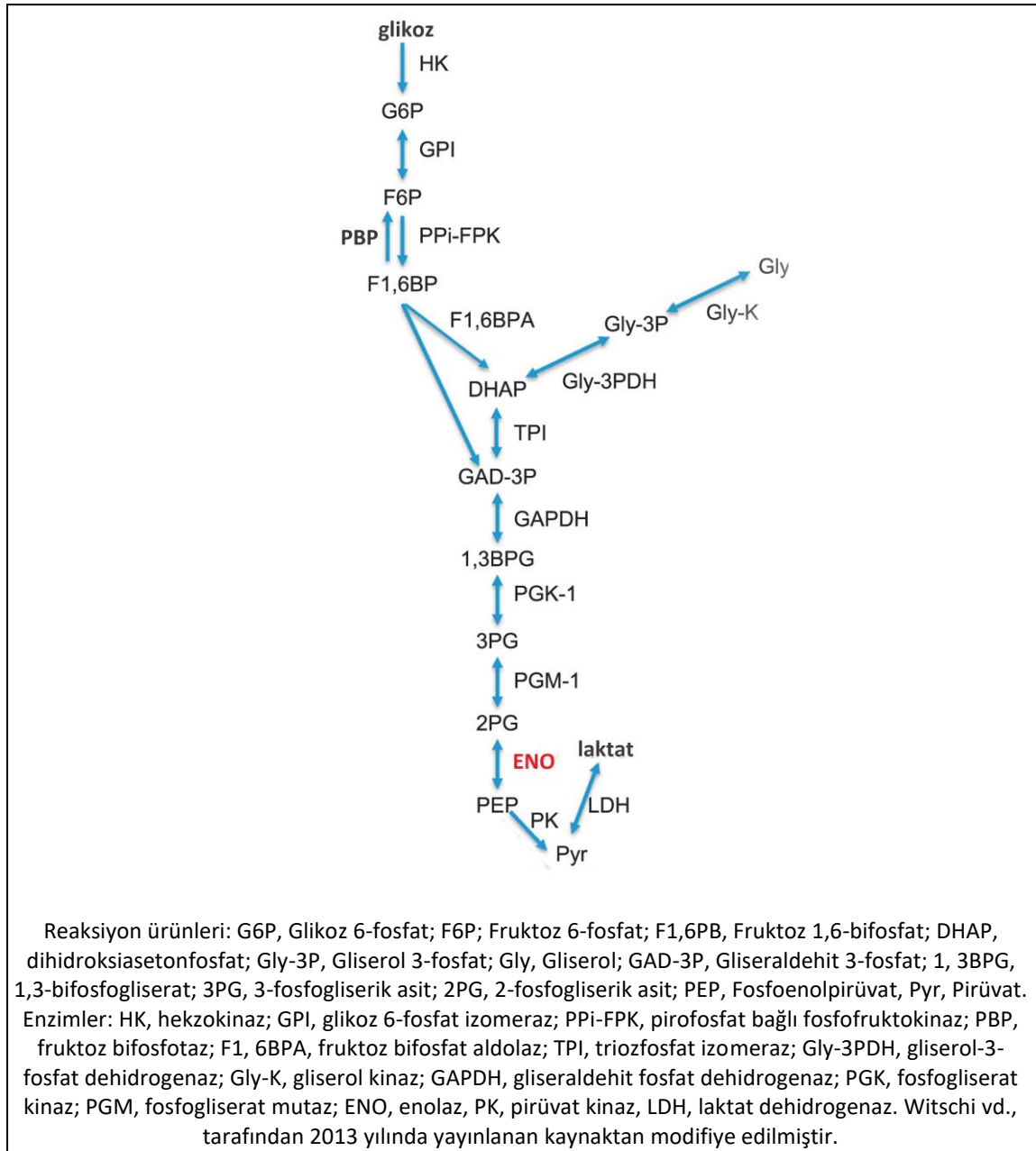
Çeşitli gözlemler, *T. annulata*'nın birçok endemik bölge içerisinde buparvaquone'a karşı dirençli hale geldiğini ve bu alanlarda sığır hayvancılık gelişimini engelleyebileceğini göstermektedir. İlaç direncinin görüldüğü klinik vakalardan toplanan izolatların DNA ekstraksiyonu yapılarak sitokrom b geninin dizi analizleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Tunus'ta yapılan *T. annulata* buparvaquone direnci ile ilişkili mutasyon analizlerinde sitokrom b geninde farklı mutasyonlar (Ile114 Met, Ser129Gly, Pro253Ser, Ser347Leu ve Leu262Ser) belirlenmiştir. Ancak, en sık görülen Leu262Ser mutasyonu dirençli klonların % 58'inde ve ayrıca üçüncü ilaç tedavisinden 48 saat sonra izole edilen klonların % 83'ünde tespit edilmiştir [38]. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise, *T. annulata* sitokrom b geninde 135. valin amino asidinin alanine ve 253. prolin amino asidinin de serine dönüştüğünü gösteren iki farklı mutasyon tespit edilmiştir [39]. Bu çalışmalar, parazitin ilaca karşı direnç gelişiminin birer göstergesi olmaktadır.

1.1.3 Potansiyel İlaç Hedefi Olarak *T. annulata* Enolaz

Enolaz; glikolitik yolağın son basamağında, 2-fosfoglisarik asidin (2-PG) fosfoenolpiruvata (PEP) dönüşümünü çift yönlü katalize eden önemli bir glikolitik enzimdir. Genellikle hücresel fonksiyon için hayati önemi olan glikoliz ve glikoneogenezis yolaklarında rol almaktadır [11], [12]. Bu enzim farklı organizmalar arasında benzer katalitik özelliklere sahiptir. Arkea, bakteri ve ökaryotlarda bulunan yüksek oranda korunmuş bir proteindir [12]. Ayrıca, katalitik olarak aktif olması için magnezyum (Mg^{+2}) metal iyonu gerektiren bir metaloenzimdir [11].

Theileria makroşizontlarındaki glikoz metabolizması incelendiğinde glikoliz yolağından sonraki ana hattın anaerobik yolak olduğu görülmüştür (Şekil 1. 4). *Theileria* makroşizontlarında glikoneogenezis oluşmamaktadır, gliserol katabolizması düşük seviyelerde gerçekleşmektedir ve sitrik asit döngüsünün sadece bir dalının, şizont içerisinde enerji üretimine katılmayan bir süreçte aktif olduğu görülmüştür [15], [16]. Glikoliz, yaklaşık olarak tüm ökaryotik hücrelerde bulunan korunmuş proteinlerden oluşmaktadır ve bu yolda bulunan enolazın da içerisinde olduğu 10 enzimi kodlayan genler *Theileria*'da olduğu gibi *Toxoplasma*, *Plasmodium*, ve *Babesia* gibi apikompleksanların genomlarında da yer almaktadır [16].

Çeşitli bakteri ve ökaryotik organizmalarda, enolazı da içeren glikolitik enzimlerin önemli bir kısmı glikolitik olmayan fonksiyonlar da sergilemektedir. Enolaz esas olarak tüm ökaryotik hücre sitozolünde bulunmaktadır ve ayrıca hücre iskelet sistemi ile etkileşerek malzeme trafiğinin ve hücre morfolojisinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [12]. Yapılan bir çalışmada protein-protein etkileşim (PPI) veri tabanlarından alınan bilgiler, dört ökaryotik organizma için enolaz, PPI ağlarının tasarlanması için kullanılmıştır. Bu analizler enolazın, enerji metabolizması ile ilişkili proteinlerle karşılıklı etkileşimine ek olarak, transkripsiyon, gelişim, apoptoz gibi farklı biyolojik proseslerle ilişkili protein kümelerinin de bir parçası olduğunu göstermiştir. Enolazın multifonksiyonel olduğunun kanıtları zamanla artmasına rağmen, bu proteinin kaç farklı proseste rol oynadığı henüz belli değildir [13].



Şekil 1. 4 Glikoliz ve anaerobik yolda bulunan *T. annulata* proteinlerinin gösterimi [16].

Çeşitli ökaryot ve prokaryot patojenik organizmaların hücre yüzeyinde enolaz bulunmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan enolazlar, plazminojene bağlanarak normal hücre göçünü kolaylaştıran bir plazminojen-bağlama proteini olarak görev yapmaktadırlar [12], [14]. Plazminojen/plazmin sistemi, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin bozunmasını sağlayarak matriksi yeniden düzenleyen ana düzenleyicidir. Enolaz, hücre yüzeyi üzerinde plazminojen aktivasyonunu artırarak hücrenin etrafında oluşan plazminin proteolitik aktivitesini yoğunlaştırmaktadır.

Böylece hücre göçü ve doku invazyonu kolayca gerçekleşebilmektedir [11]. Bu durum, konak dokunun bozunması ile birlikte patojen istilasını tetikleyen plazmin yolağının oluşmasını sağlamaktadır [14], [40], [41]. Yapılan çalışmalarda, *Plasmodium* spp. gibi apikompleksan parazitlerin hücre yüzeyi enolazının doku invazyon prosesine katıldığı desteklenmiştir [12], [42].

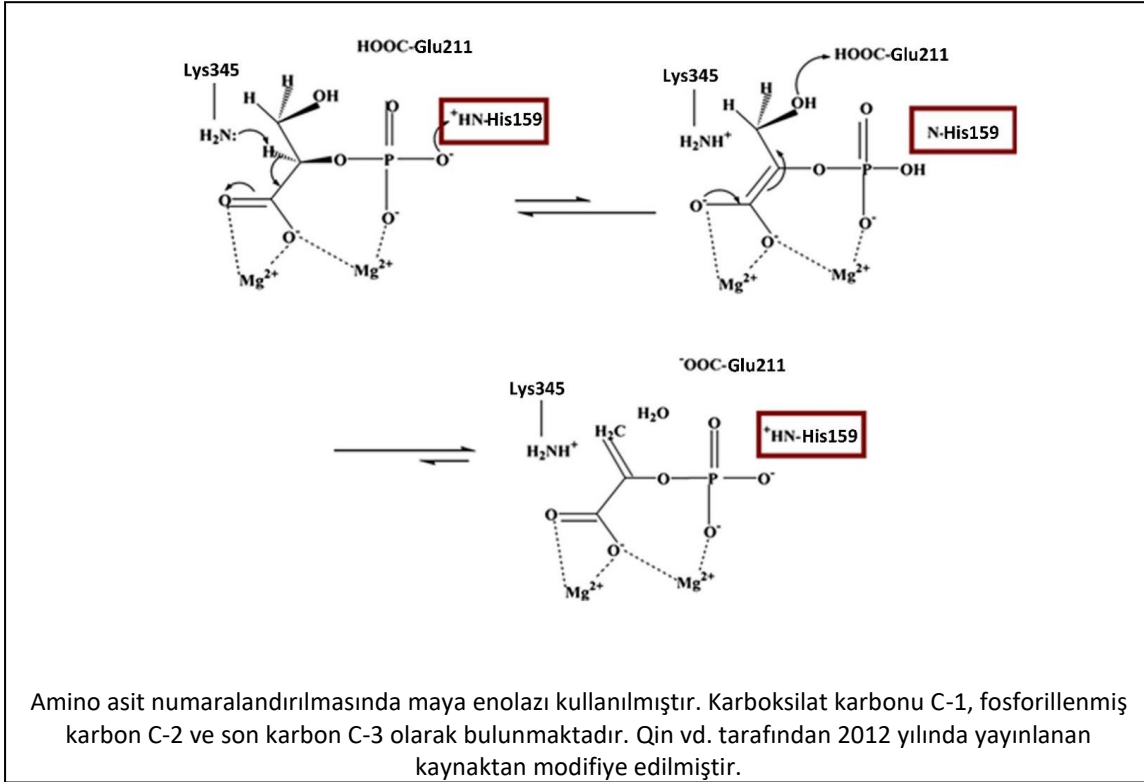
Yapılan çalışmalar enolaz gibi belirli glikolitik enzimlerin, apikompleksan parazitlerin neden olduğu hastalıklarda hedef olarak görev alabileceklerini göstermektedir [43], [44]. Enolazın belirtildiği gibi glikolizde görev alması, plazminojen reseptörü olması gibi birçok önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Bu enzimin çalışmasını engelleyen ilaçların tasarlanması, parazitin virülans özelliklerine müdahale edilmesi için önemli olacaktır. Parazit enzimini seçici olarak inhibe eden inhibitörlerin geliştirilmesi bu parazitin enerji metabolizması gibi birçok önemli hücre yolağını önleyebilecektir. Ayrıca, plazminojen-reseptör ilişkisini engelleyen ilaçlar parazitin dokuya istila etmesini engelleyerek vücuda yayılmasını önleyebilecektir [12], [13].

1.1.3.1 Enolazın Protein Yapısı ve Katalitik Mekanizması

Enolazın protein yapısı incelendiğinde dimer olarak bulunan molekülün alt ünitesinin iki domain içerdiği görülmektedir. Küçük N-terminal domain üç anti paralel kıvrım ve dört heliksten oluşan $\alpha+\beta$ yapısına sahiptir. Ana domain ise sekiz kıvrımlı $\beta+\alpha$ fıçı topolojisinden oluşmaktadır. Bu enolaz fıçı yapısı, $(\beta\alpha)_8$ topolojisine sahip olan trioz fosfat izomeraz (TIM) fıçı yapısından farklıdır ve $\beta\beta\alpha\alpha$ $(\beta\alpha)_6$ topolojisine sahiptir. Bu yapı ilk olarak Lebioda vd. tarafından maya enolazında tespit edilmiştir [45]. Maya enolazı X-ışını kristalografisi yapılarak 3 boyutlu yapısı çözümlenen ilk enolazdır [45] [46], [47] ve bu aşamada amino asit rezidülerinin numaralandırılmasında maya enolazı kullanılmıştır.

Enolazın mekanizmasında, asit/baz sisteminin tüm fonksiyonunda üç kritik amino asit rezidüsü bulunmaktadır (Şekil 1. 5). İleri reaksiyonda (glikoliz yönünde) Lys345'in ϵ -amino grubu 2-PG'nin C-2 atomundan protonun uzaklaştırılmasında baz gibi işlev görmektedir. His373'ün yan zinciri ve Glu168'in karboksili Glu211'in yanında yer almaktadır ve bu pozisyonda Glu211 ya da His373, ileri reaksiyonun ikinci adımında asit/baz katalizi gibi görev alarak C-3'deki hidroksili protonlamaktadır [46], [48].

His159'un imidazol yan zinciri de substrat/ürün molekülünün fosfat grubu ile etkileşim halindedir. Burada His159 fosfat grubunu protonlayarak C-2'den elektron çekilmesini sağlamaktadır. Geri reaksiyonda (glükoneogenezis yönünde) His159'un fosfattan ayrılmasıyla birlikte Lys345 ve Glu211 ileri reaksiyondakinin tersi fonksiyonları gerçekleştirirler [47], [48].



Şekil 1. 5 Enolazın katalitik mekanizması [46], [47], [48].

Enzimin aktif bölgesi TIM fiçı yapısının karboksilik ucunda yer almaktadır. N-terminal domainin bir fragmenti ve fiçı domaininden çıkan iki uzun halka bölgesi aktif bölgeye giden geniş bir yarık oluşturmaktadır [45]. Proteinin aktif bölge analizleri sonucunda His159, Gln167, Lys345, His373, Arg374, Ser375, Lys396 amino asitlerinin 2-PG bağlama rezidüleri olduğu gösterilmiştir [46], [47]. Ek olarak, Ala38 rezidüsünün de 2-PG ile etkileşimde olduğu belirtilmiştir [47]. Asp246, Glu295 ve Asp320 rezidülerinin Mg^{2+} iyonu ile etkileştiği, Ser39'un ise ikinci Mg^{2+} iyonu ile bağlandığı belirlenmiştir [46]. Yapılan çalışmalar, enolazın aktif bölgesi çevresinde bulunan üç katalitik halka bölgesinin hareketinin yerel konformasyonel değişiklikler ile ilişkili olduğunu ve bu nedenle birinci metal iyonu, substrat ve ikinci metal iyonu bağlanma sırasının önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu durum enzimin açık, kapalı ve yarı-kapalı olmak üzere

üç farklı aktif bölge yapısının olduğunu göstermektedir [47]. Apo-enzim olarak “açık” konformasyon halinde bulunan enzimin aktif bölgesi tamamen çözücüye maruz kalmaktadır. Substrat (ya da ürün) ve metal iyonlar bağlandığı zaman, üç halka bölgesi aktif bölge üzerine doğru yönelmekte ve önemli konformasyonel değişiklikler meydana getirerek enzimin “kapalı” konformasyonunu oluşturmaktadır [12], [47]. Gerçekleştirilen tez çalışmasında; *T. annulata* enolazının ikincil ve üçüncül yapısı, aktif bölge rezidüleri, substrat ve kofaktör bağlanma bölgeleri yapılan *in silico* analizler ile ileriiki bölümlerde detaylandırılmıştır.

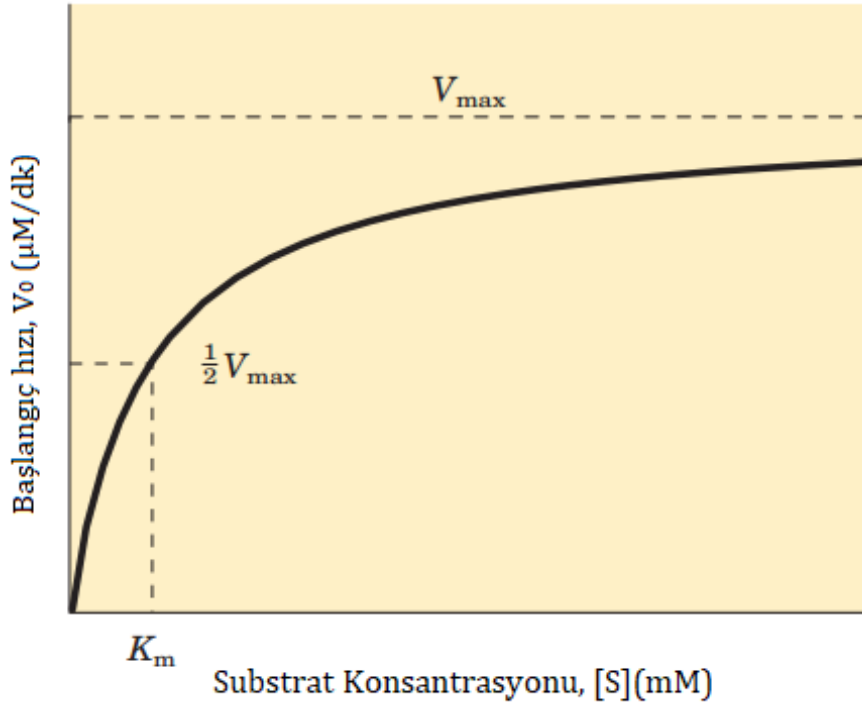
1.1.4 Enzim Kinetiği

Enzimlerin çalışma mekanizmalarını anlamak için bilinen en eski yaklaşım olan enzim kinetiği, bir reaksiyonun hızını hesaplamak ve deneysel parametrelerle bu reaksiyonun cevabının nasıl değiştiğini belirlemek için kullanılan bir disiplindir [17]. Enzim kinetiği, denge durumunun dışında zamana bağlı devam eden enzim reaksiyonları ile ilişkilidir. Enzim reaksiyonu çalışmaları, enzim kataliz ve düzenleme mekanizmalarını aydınlatmak için yapılmaktadır. Bu çalışmalar genellikle enzimin substratı ile olan ilişkilerinin ve substrat-ürün dönüşümünün araştırılması ile başlamaktadır. Sonraki adım kofaktörler, inhibitörler ya da aktivatörlerin rollerinin incelenmesidir. Ayrıca, enzim kinetik çalışmaları için kimyasal reaksiyon sıralamasının bilinmesi de çok önemlidir [49].

1.1.4.1 Michaelis-Menten Kinetiği

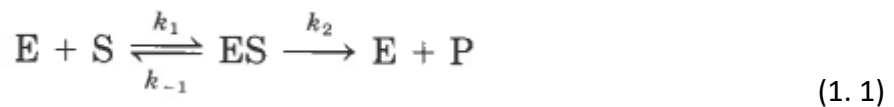
Bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızını etkileyen önemli bir faktör substrat konsantrasyonudur. Substrat konsantrasyonunun $[S]$ etkilerini araştırmak, substratın ürüne dönüştürüldüğü bir *in vitro* reaksiyon sırasında meydana gelen substrat değişiklikleri ile karmaşık hale gelmektedir. Kinetik deneylerini basitleştirmek için kullanılan en genel yaklaşım, başlangıç hızını (v) ölçmektir. Yüksek substrat konsantrasyonlarında başlangıç hızı değişimleri çok azalmaktadır ve enzim substrat ile doygunluğa ulaşmaktadır. Bu noktada enzim reaksiyon hızı maksimum olmaktadır (V_{max}) [17]. Reaksiyonun başlangıcından sonraki periyot, alt ara maddelerinin artışı ile karakterize olan ön-kararlı hal periyodu olarak adlandırılmaktadır. Ön-kararlı hal periyodu, bu ara maddelerin nispeten sabit bir konsantrasyona ulaşmasına kadar devam etmektedir. Daha ileri aşamada kararlı hal kinetiği için gerekli reaksiyon ortamı

oluşmakta ve ürünün oluşum hızının neredeyse sabit olduğu bu dönem kararlı hal periyodu olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.6) [50]. Enzimatik reaksiyonlarda kararlı hal kinetik analizi, sabit bir enzim konsantrasyonunda substratın farklı konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak başlangıç hızının ölçümünü gerektirmektedir [51].



Şekil 1. 6 Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi [17].

Michaelis-Menten denklemi, enzim kinetiğinin temel denklemidir ve substrat konsantrasyonu $[S]$ ile başlangıç hızı (v) arasındaki ilişkiyi gösteren eğriyi ifade etmektedir [17], [49]. Michaelis-Menten kinetiği, denklem 1. 1'de gösterildiği gibi enzimatik reaksiyonların hız limitleyici basamağı olan enzim-substrat $[ES]$ kompleksinin ürün (P) ve serbest enzime (E) dönüşümünden başlayarak elde edilmektedir [17].



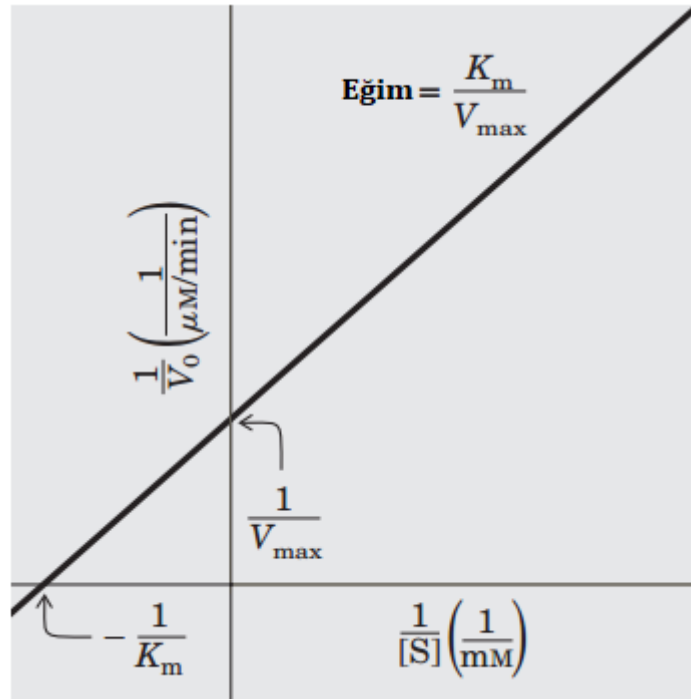
Denklem 1. 2'deki Michaelis-Menten denklemine göre; v başlangıç hızını, V_{max} substrat konsantrasyonunun doyumluğundaki maksimum hızı ve Michaelis sabiti (K_m), V_{max} değerinin yarısındaki substrat konsantrasyonunu temsil etmektedir [51].

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.2)$$

Deneyisel verilerin grafiğinin daha kullanışlı hale gelmesi için Michaelis-Menten denklemi cebirsel olarak farklı forma dönüştürülebilmektedir. Bu dönüşüm denklemin her iki tarafının devrik olarak ters çevrilmesiyle elde edilmektedir. Elde edilen bu denklem Lineweaver-Burk denklemi olarak adlandırılmaktadır (Denklem 1.3) [17].

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1.3)$$

Lineweaver-Burk denklemine göre $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiğinin oluşturulmasıyla kesişim noktasının $(1/V_{\max})$ ve eğimin $(K_m/V_{\max})$ belirlenmesi kinetik parametrelerin hesaplanmasını sağlamaktadır. Lineweaver-Burk grafiği ile doğrusal bir grafik oluşturulup K_m ve $V_{\max}$ değerlerinin daha doğru belirlenmesinde büyük bir avantaj elde edilmektedir (Şekil 1.7) [17], [51].



Şekil 1.7 Lineweaver-Burk grafiği [17].

1.1.4.2 Enzim-İnhibisyon Mekanizmaları

Geri Dönüşümsüz İnhibisyon

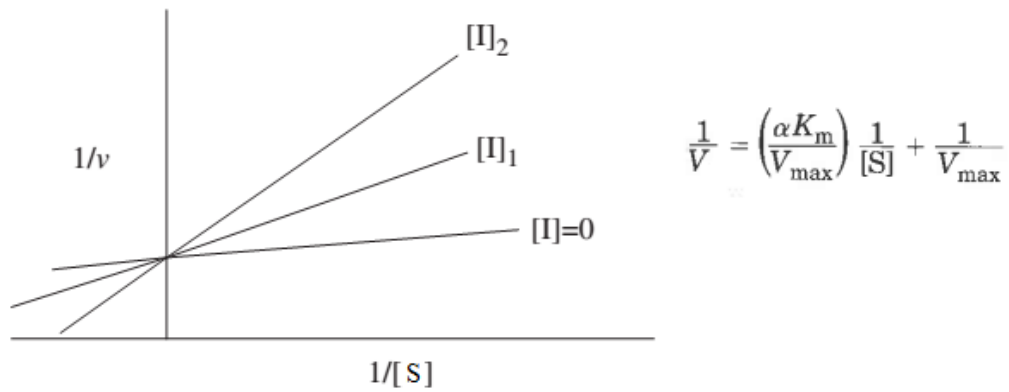
Enzim inhibitörleri, reaksiyon katalizine müdahale ederek enzimatik reaksiyonun yavaşlatılmasını veya durdurulmasını sağlayan moleküllerdir. Enzimler hemen hemen tüm hücresel süreçleri katalize ettiği için inhibitörler bilinen en önemli farmasötik maddeler arasındadır. Geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere iki çeşit inhibitör bulunmaktadır [17]. Geri dönüşümsüz inhibitörler, başlangıç hız ölçümü ve kararlı hal periyodunu da içeren tüm reaksiyon süresinde bağlanarak enzimi inhibe ederler. Bu inhibitörler kovalent ve non-kovalent bağlarla bağlanarak ya da oksidasyon gibi bazı kovalent davranışlarda bulunarak enzimin konformasyonunu geri dönüşümsüz olarak değiştirirler. Bir ligand analogu olarak inhibitör, enzimi inhibe edecek şekilde spesifik bağlanma bölgesine bağlanır ya da protein yüzeyi üzerinde herhangi bir erişilebilir reaktif grup ile reaksiyona girer. Geri dönüşümsüz inhibisyon hızı, enzim ve inhibitör konsantrasyonuna bağlıdır, ancak enzim konsantrasyonuna göre inhibitör konsantrasyonu çok yüksek olduğu takdirde enzim aktivitesi tamamen kaybolmaktadır [49], [50].

Geri Dönüşümlü İnhibisyon

Genellikle enzim inhibisyonu geri dönüşümlü olmaktadır, bir inhibitör tersinir bir şekilde aktif bölgeye benzer belirli bir bölgeye bağlanmaktadır ve inhibitör konsantrasyonunun seyreltilmesiyle ya da substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla bağlandığı yerden ayrılmaktadır. Geri dönüşümlü inhibitörler, diğer tip inhibitörlere göre düşük bir bağlanma enerjisi ile bağlanmaktadır. İnhibitörlerin proteinler ile farklı etkileşim olasılıkları bulunmaktadır ve böylece farklı inhibisyon mekanizmaları oluşmaktadır. Yarışmalı (competitive), yarışmasız (uncompetitive) ve karışık (mixed) olmak üzere üç farklı geri dönüşümlü inhibisyon mekanizması bulunmaktadır [17] [49],[50].

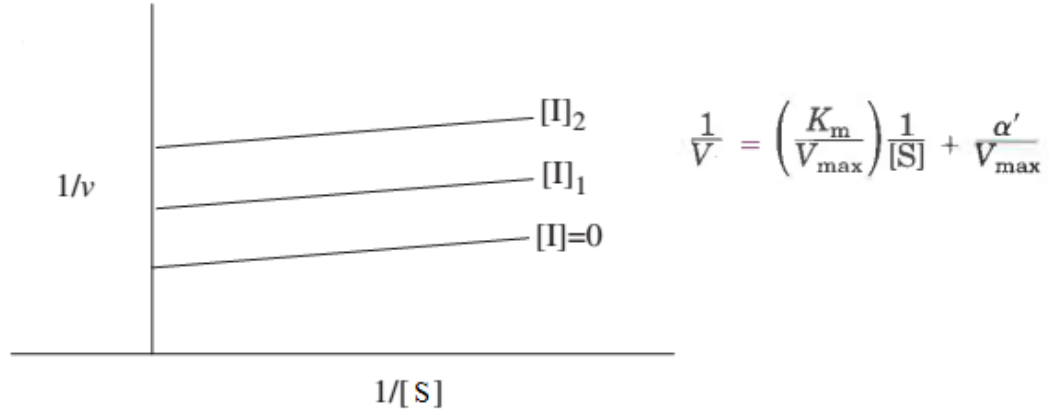
Yarışmalı inhibisyonda, inhibitör substratın gerçek bir analogu olarak hareket eder ve substratın enzime bağlandıktan sonra meydana getirdiği kompleksin aynısını oluşturmak için enzime seçici olarak bağlanır. İnhibitör aktif bölgeye bağlandığı zaman substratın enzime bağlanmasını engeller ve böylece enzim aktivitesini azaltır. Yarışmalı

inhibitörler aynı bölgeden enzime bağlandıkları için genel olarak substrat ile ortak yapısal özelliklere sahiptirler. Yarışmalı inhibisyon kararlı hal kinetiği ile kantitatif olarak analiz edilebilmektedir [17], [50]. Lineweaver-Burk grafiği ile iki veya daha fazla farklı konsantrasyondaki yarışmalı inhibitör varlığında substrat konsantrasyonuna karşı hız grafiği oluşturulabilmektedir. Artan inhibitör konsantrasyonu ile farklı eğimlerden oluşan aynı $1/v$ ekseninde kesişen grafik topluluğu meydana gelmektedir (Şekil 1. 8). Yarışmalı inhibisyon mekanizmasında V_{max} değeri değişmez, ancak K_m değeri artmaktadır. V_{max} değeri değişmemektedir, çünkü inhibitör konsantrasyonu ne olursa olsun yeterli derecede yüksek konsantrasyonda substrat varlığında inhibitör ile substrat yer değiştirerek enzimin aktif bölgesine geçebilmektedir [17].



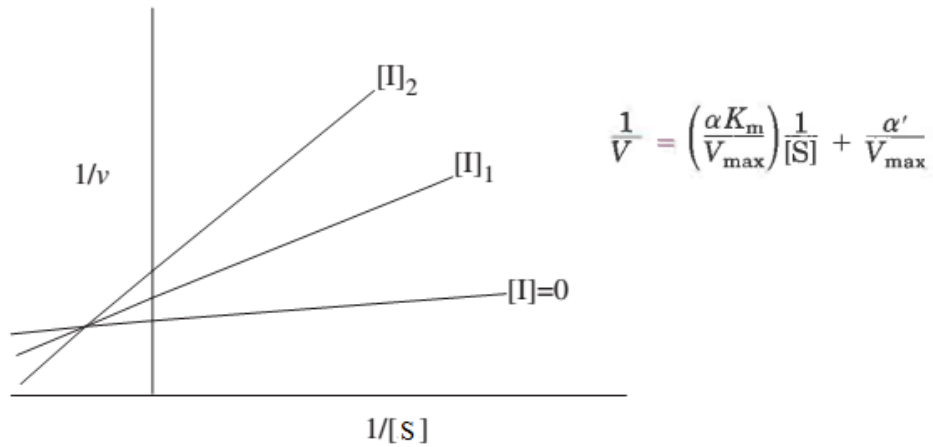
Şekil 1. 8 Yarışmalı inhibisyonunda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi [17], [51].

Yarışmasız inhibisyonunda, inhibitör substratın bağlı olduğu enzim kompleksi (ES) üzerinde aktif bölgeden farklı bir bölgeye seçici olarak bağlanmaktadır. Yarışmasız inhibitörler substrat analogu özelliği göstermemektedir ve bu inhibisyon çeşidi çoklu bağlanma bölgelerine sahip enzimlerde görülmektedir. Farklı konsantrasyonlardaki yarışmasız inhibitör varlığında oluşturulan Lineweaver-Burk grafiğinde, inhibitör konsantrasyonuna bağlı olarak farklı noktalarda dikey eksen ile kesişen paralel çizgiler bulunmaktadır (Şekil 1. 9). Yarışmasız inhibisyon mekanizmasında inhibitör V_{max} değerini azaltmaktadır ve α' faktörü nedeniyle V_{max} 'ın yarısına ulaşmak için gerekli olan substrat miktarı da azalacağından K_m değerinin de düştüğü görülmektedir [17], [50].



Şekil 1. 9 Yarışmasız inhibisyonda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi [17], [51].

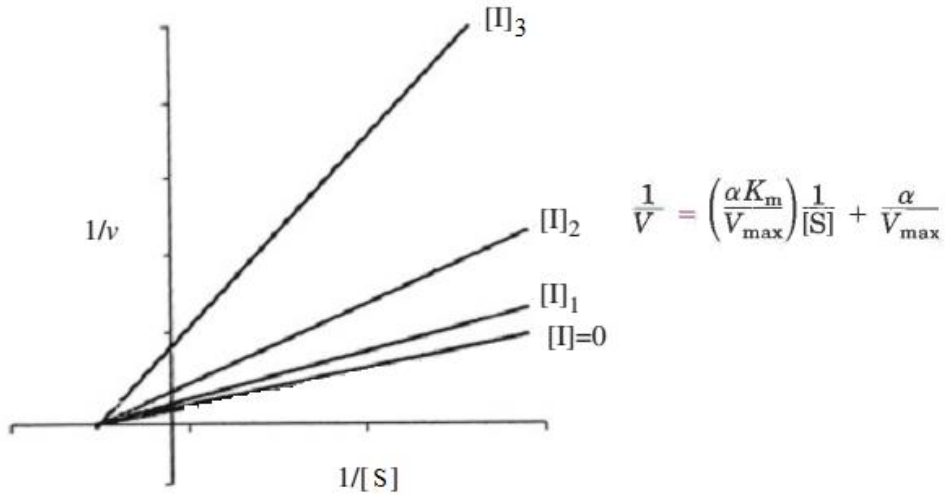
Karışık inhibisyonda, inhibitör aktif bölgenin dışında bir bölgeye bağlanmakta ve serbest enzim ya da enzim substrat kompleksine bağlanabilmektedir. Bu inhibisyon mekanizması için farklı inhibitör konsantrasyonlarında oluşturulan Lineweaver-Burk grafiğinde eksenler dışında kesişen çizgiler bulunmaktadır (Şekil 1.10). Ayrıca, K_m ve $V_{\max}$ değerlerinin her ikisi de değişimden etkilenmektedir [17], [51].



Şekil 1. 10 Karışık inhibisyonda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi [17], [51].

Özel bir durum olarak α değerinin α' değerine eşit olduğunda görülen yarışmayan (noncompetitive) inhibisyonda ise, inhibitör ile substrat arasında bir yarışma oluşmaz ve substrat konsantrasyonunun arttırılması inhibisyonun kaybolmasına neden olmaz. Bu inhibisyon mekanizmasında $V_{\max}$ azalırken, K_m değişmemektedir [17], [50]. Farklı konsantrasyonlardaki yarışmayan inhibitör varlığında oluşturulan Lineweaver-Burk

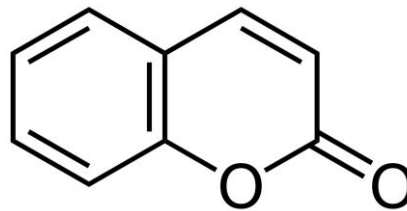
grafiğinde dikey eksenin solundaki bir noktada kesişen çizgiler bulunmaktadır (Şekil 1.11) [50].



Şekil 1. 11 Yarışmayan inhibisyonda oluşan Lineweaver-Burk grafiği ve inhibitör varlığında türetilen Michaelis-Menten denklemi [17], [50].

1.1.5 Kumarin ve İnhibisyon Özelliği

Doğal bileşikler, düşük toksisiteleri ve birden fazla hedef ile etkileşime girebilme yetenekleri ile farmakolojik özelliklere sahip yapısal analogların sentezlenmesinde önemli bir kaynaktır [20]. Kumarin (benzo- α -piron) tarçın, lavanta ve nane dahil olmak üzere çeşitli bitkilerin içerisinde bulunan doğal bir bileşiktir (Şekil 1. 12) [21] ve bitki aleminde bulunan bileşiklerin çok geniş bir sınıfını oluştururlar. Özellikle tarçın kabuğu yağı, Çin tarçını yaprağı yağı ve lavanta yağı gibi bazı esansiyel yağların içerisinde yüksek seviyede bulunurlar. Ayrıca, kumarinler çeşitli meyveler, yeşil çay ve hindiba gibi diğer gıdalardan da izole edilebilirler [52].



Kumarin

Şekil 1. 12 Kumarinin kimyasal gösterimi [21].

Kumarin türevlerinin antikanser, anti-HIV, antikoagülan, antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuar gibi tedavi edici etkileri bazı çalışmalarla bildirilmiştir [20]. Son yıllarda

yapılan bir çalışmada kumarin türevlerinin belirli konsantrasyonda kanser hücre hatlarına uygulanmasıyla sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir ve bu bileşiklerin konsantrasyonlarına bağlı olarak serbest radikalleri ortadan kaldırma özelliği ile antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir [53]. Bu bileşiklerin antikoagülan etkisi protrombin zamanı incelenerek fareler üzerinde yapılan bir çalışmada gözlenmiştir. Kumarin türevlerinin antikoagülan özellikleri uzun yıllardan beri bilinmektedir ve protrombin zamanını uzatma özellikleri nedeniyle kalp krizi geçirmiş veya risk grubunda bulunan hastalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [54]. Literatürdeki başka bir çalışmada ise, belirli bir kumarin türevinin yüksek kolesterol değeri görülen hayvanlarda uygulanması ile kolesterol düzeyinin belirli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir. Böylece kumarin türevlerinin kolesterol düşürücü olarak da kullanılabileceği gösterilmiştir [55]. Kronik enfeksiyonlarda, kumarinlerin immün sistemin makrofaj gibi hücrelerini destekleyici etkileri de görülmüştür. Kronik brusella tedavisinde kumarin gibi immün destekleyici bileşikler uygulanabilmektedir. Bu sonuçlar mikoplazma, toksoplazma gibi organizmaların neden olduğu enfeksiyonları önlemede teşvik edici olmaktadır [52]. Ayrıca, bazı kumarinlerin analjezik [56] ve antiepileptik [57] etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur.

Kumarin türevlerinin uygulandığı önemli bir alan da enzim inhibisyonudur. Yapılan bir çalışmada kumarinin buğdayda α -amilaz, glikokinaz gibi metabolik reaktivasyonu sağlayan önemli enzimleri inhibe ettiği belirlenmiştir [18]. Alzheimer hastalığının tedavisinde önemli olan asetilkolinesteraz ve monoaminoksidaz inhibitörleri olarak kumarin türevlerinin de uygulanabileceği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada 17 kumarin türevinin mikromolar aralıktaki konsantrasyonlarda asetilkolinesterazı inhibe ettiği tespit edilmiştir [19]. Başka bir çalışmada ise edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS) hastalığına neden olan insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) karşı enzim inhibisyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Çeşitli kumarin türevlerinin HIV-proteaz enzimi üzerinde 2 ile 61 μ M arasındaki konsantrasyonlarda yüzde elli inhibisyon gerçekleştirilmesiyle potansiyel inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir [58]. Literatürde bulunan bu tür çalışmalar kumarin türevlerinin potansiyel enzim inhibitörü olarak analiz edilebileceğini gösterdiğinden bu tez çalışmasında kullanılmıştır.

1.1.6 Bilgisayar Tabanlı Protein Yapı Analizleri

1.1.6.1 Homoloji Modelleme

Yapıya dayalı ilaç tasarımındaki *in silico* yöntemler; yapı ve fonksiyon ilişkilerini araştırmak için 3 boyutlu protein yapılarının bilgisi, tedaviye yönelik hedeflerin seçilip belirlenmesi, ligand-protein etkileşimlerinin moleküler temellerinin incelenmesi, protein üzerindeki bağlanma bölgelerinin karakterize edilmesi, hedefe yönelik kimyasal bileşik kütüphanelerinin belirlenmesi, yanaştırma (docking) çalışmaları ve en iyi bağlanan bileşiklerin tespit edilmesi ile tamamlanmaktadır [59]. Homoloji modelleme, proteinlerin 3 boyutlu yapısını belirlemek için kullanılan önemli bir bilgisayar tekniğidir. Bu yöntem, hastalıklara yönelik olarak yapılan ilaç tasarımı için hedef protein yapılarının belirlenmesinde uygulanmaktadır ve bu nedenle de yapıya dayalı ilaç tasarımındaki önemi zamanla artmaktadır [59], [60].

Homoloji modelleme yönteminde hedef protein modelinin oluşturulması için benzer yapıdaki yüksek çözünürlüklü protein yapıları kullanılmaktadır [60]. Bu yöntem model oluşturulacak proteine benzeyen doğal protein konformasyonu ile hedef proteinin amino asit dizisine göre oluşturulan 3 boyutlu yapısında meydana gelen küçük ve orta derecedeki değişikliklerin gözlemine dayanmaktadır [61]. Homoloji modelleme genel olarak dört adımdan oluşmaktadır: kalıp belirleme, amino-asit dizisi eşleştirme, model oluşturma ve validasyon (Şekil 1. 13) [60], [61].

3 boyutlu protein yapılarını oluşturmak için farklı yöntemler kullanan çeşitli modelleme programları mevcuttur. Geçerli stereo kimyayı uzamsal engellerle birleştiren CHARMM [62] enerji terimlerini içeren en yaygın kullanılan program MODELLER programıdır [63], [64]. MODELLER programında basit bir komut dosyası kullanılarak kalıpların atomik koordinatları ile modellenecek proteinin amino asit dizisi ile eşleştirilmesi gerçekleştirilmektedir [64]. SwissModel, I-TASSER sunucusu gibi web tabanlı sunucular, yalnızca protein dizisinin girilerek model oluşturulmasını sağlamaktadır [60], [65], [66]. İlk oluşturulan modelde optimal değerin altında bağ açıları ve uzunluklar olabilmektedir. Elde edilen modelin bu tür yapısal yönleri kontrol edilebilir, düzeltilebilir ve belirlenen eksiklikler enerji kuvvet alan yaklaşımları kullanılarak enerji minimizasyonu prosedürü ile giderilebilmektedir [60], [61]. Protein modeli oluşturulduktan sonra son aşama olarak bu modelin doğrulanması gerekmektedir. En iyi doğrulama (validasyon) sağduyu, biyolojik bilgi ve analitik araçların sonuçlarının birleştirilmesi ile yapılmaktadır. Validasyon sonuçlarının doğrultusunda proteinin tekrar modellenmesi de yapılabilmektedir [60]. Protein modelinin atomik bağlarının kontrolü, amino asitlerin ikincil yapıda hangi pozisyonda bulunduğu incelenmesi, ikincil yapısının ve kristalografisi çözümlenmiş proteinlere benzerliğinin araştırılması, protein kalitesinin belirlenmesi için ERRAT, RAMPAGE, ProSA, ProQ gibi web tabanlı birçok sunucu kullanılmaktadır [67], [68], [69], [70].

1.1.6.2 Moleküler Yanaştırma (Docking)

Moleküler yanaştırma, hedefin uygun bağlanma bölgeleri içine küçük ligandların yerleşme konformasyonlarının önemli bir doğruluk derecesi ile belirlenmesini sağladığı için yapıya dayalı ilaç tasarımında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Ligand bağlanma biçimleri ve sabit ligand-reseptör kompleksleri gibi moleküller arası etkileşimlerin dahil olduğu önemli moleküler olguları içeren aramalar, bu yöntem ile gerçekleştirilebilir. Moleküler yanaştırma algoritmaları, ligand-reseptör komplekslerinin bağlanma afinitesine göre bileşiklerin sıralanmasını sağlayarak bağlama enerjilerinin kantitatif olarak belirlenmesini gerçekleştirmektedir [71]. Reseptör protein yapısının uygun olduğu varsayıldığında optimizasyondaki ve yönlenme tahminindeki birincil zorluk ligand oryantasyonunun ve bağlanma afinitesinin belirlenmesidir [72]. Bu sorunlar doğrultusunda, moleküler yanaştırma

genellikle her bir basamakta karmaşıklığın daha da arttığı çok basamaklı bir proses olarak tasarlanmıştır [73].

Moleküler yanaştırma prosesi, aktif bölge içindeki küçük moleküllerin pozisyonlarını (Pose) belirlemek için yanaştırma algoritmasının uygulanması ile başlamaktadır [73]. Bir molekülün doğru bağlanma modunun araştırılması, birçok pozisyon denemesinin yapılması ve enerji açısından en iyi olan pozisyonun tutulması ile gerçekleştirilir. Bu durum doğru yönlendirme ve sabitlenen molekülün doğru konformasyonun bulunmasını içermektedir [74]. Moleküller (ligandlar) serbestlik içerisinde birçok konformasyonel dereceyi (torsiyonel (dihedral), translasyonel ve dönme serbestlik dereceleri gibi) içerebilirler. Serbestlik derecelerinin örneklendirilmesi, reseptör ile en iyi eşleşen konformasyonun belirlenmesi için uygun doğrulukta gerçekleştirilmelidir ve belirli bir yanaştırma döngüsünde bileşiklerin binlerce kez değerlendirilmesine izin verecek derecede hızlı olmalıdır [71], [73]. Bu araştırma öncelikle belirli sayıda değerlendirmenin yapılması ve sonrasında bir molekül için yeterli sayıda pozisyonun bulunması ile sonlanmaktadır [74]. Algoritma, bileşikler ve hedefler arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesi yoluyla biyolojik aktivitesini tahmin etmek için tasarlanmış skorum fonksiyonları ile tamamlanmaktadır. Erken skorum fonksiyonları şekil ve elektrostatik bağlanmaların hesaplanmasını temel alarak yanaştırılan bileşiği değerlendirmektedirler. Seçilen konformasyonlar, elektrostatik ve Van der Waals etkileşimlerinin daha detaylı incelenmesi ile daha kompleks skorum yöntemleri kullanılarak değerlendirilmektedir ve en son çözünme ve entropik etkiler bu skorlamaya eklenmektedir [73]. Çözücü etkileri, entropik etkiler ve reseptör esnekliği gibi konuların uygun pozisyonun tespit edilmesine önemli etkileri bulunmaktadır [71].

Moleküler yanaştırma analizlerinde muhtemel bağlanma konformasyonlarının belirlenmesi için çeşitli potansiyel bağlanma pozisyonlarını içeren büyük konformasyonel alanın araştırılması ve belirlenen bağlanma konformasyonlarının her biriyle ilgili etkileşim enerjisinin doğru öngörülmesi gerekmektedir [71], [75]. Konformasyonel arama algoritmaları, sistematik (arttırarak yapılandırma, veri tabanları) ve stokastik (olasılıklara bağlı, rastgele/ Monte Carlo, genetik algoritma) arama yöntemlerini kullanarak ligandların yapısal parametrelerinin değiştirilmesini gerçekleştirmektedir [71], [73]. Sistematik yöntemler, ligandların konformasyonunu

kademeli olarak değiştirilerek moleküllerin yapısal parametrelerinde hafif değişiklikler gerçekleştirirler. Stokastik yöntemler, ligandların yapısal parametrelerinin rastgele modifiye edilmesini sağlayarak konformasyonel aramayı gerçekleştirirler [71],[76], [77]. Konformasyonel arama algoritmalarına göre örnek gösterilecek olursa; FRED [78], DOCK [79], Glide [80] gibi programlar sistematik arama, AutoDock [81], MolDock [82], LigandFit [83] gibi programlar da stokastik arama yöntemlerini kullanmaktadırlar.

Moleküler yanaştırma programları, ligand-reseptör komplekslerinin bağ enerjisini öngörebilmek için skarlama fonksiyonlarını kullanmaktadırlar. Kuvvet alanı, ampirik ve bilgi temelli olmak üzere 3 farklı skarlama fonksiyonu bulunmaktadır [71]. Kuvvet alanı (Force field) skarlama fonksiyonları; Van der Waals (VDW) etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler ve bağ germe / bükme / burulma kuvvetleri dahil olmak üzere fiziksel atomik etkileşimlere dayalı olarak hesaplanmaktadır. Ampirik skarlama fonksiyonları, ağırlıklı olarak enerji terimlerinin bir toplamını esas alan bir kompleksin bağlanma afinitesini öngörmektedir. Bu hesaplamalarda; Van der Waals bağ enerjisi, elektrostatik, hidrofobisite, hidrojen bağı gibi enerji terimleri dikkate alınmaktadır [84]. Son olarak bilgi temelli skarlama fonksiyonları, protein-ligand komplekslerinin kristal yapılarının geniş bir veri tabanında gözlemlenen atomlar arası temas frekansları ve mesafeleri için istatistikler kullanılarak türetilmektedir [74]. Sık kullanılan moleküler yanaştırma programlarının her biri farklı skarlama fonksiyonlarını kullanabilmektedir. Molegro Virtual Docker [82], LigandFit [83], DOCK [79] gibi programlar kuvvet alanı skarlama fonksiyonunu kullanırken, Glide [80] programı ampirik skarlama fonksiyonunu kullanmaktadır. AutoDock [81] programı ise hem kuvvet alanı hem de ampirik skarlama fonksiyonunu kullanmaktadır [71].

Moleküler yanaştırma hesaplamaları son yıllarda ilaç araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Protein kalıpları üzerinden sanal bir taramanın yapılması, herhangi bir önyargı olmadan aktif bileşiklerin *de novo* tanımlanması için bir fırsat sağlamaktadır [73]. Böylece bu yöntem ile umut verici bileşiklerin belirlenmesi mümkün olacağından sağlık için kritik alanlardaki çözüm araştırmalarında uygulanabilmektedir [71].

1.2 Tezin Amacı

Parazit enfeksiyonlarında ilaç direncinin gelişmesi ile birlikte yapıya dayalı ilaç tasarımı kapsamında, parazitin metabolizmasında hayati role sahip enzimlerin izole edilerek seçici inhibisyonunun yapılması son derece önemlidir. Bu yaklaşım doğrultusunda gerçekleştirilen bu tezin amacı, potansiyel seçici inhibitörler belirleyip geliştirmek için 38 adet kumarin türevinden oluşan bir kütüphanenin *T. annulata* enolaz aktivitesi üzerindeki etkisinin yapısal ve kinetik analizler ile test edilmesidir.

1.3 Hipotez

Theileria annulata enolazının yüksek saflıkta üretilip uygun şartlarda saklanması sağlayarak, daha önceden sentezlenmiş olan kumarin türevleri ile seçici inhibisyon çalışmalarının yapılmasının tropikal theileriosise sebep olan *T. annulata* enfeksiyonunun tedavisinde parazit için hayati öneme sahip olan glikoliz metabolizmasının inhibe edilmesiyle alternatif bir ilaç geliştirilmesi yönündeki çalışmaların önünü açacağı öngörülmektedir.

MATERYAL VE METOD

2.1 Materyaller

2.1.1 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

T. annulata enolazının ekspresyonu sonrasında elde edilen proteinlerin saflaştırılması için QIAGEN (Almanya) tarafından üretilen Nikel-nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz ve Clontech Laboratories (ABD) tarafından üretilen TALON® kolonu kullanılmıştır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) proteinlerin molekül ağırlığını belirlemek için Thermo Scientific (ABD) tarafından üretilen Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder kullanılmıştır. Bu markerda bulunan protein bantlarının molekül ağırlıkları sırasıyla; 260, 140, 100, 70, 50, 40, 35, 25, 15, 10 kDa'dur.

Deneyler sırasında kullanılan diğer kimyasal maddeler Panreac AppliChem, BDH, Sigma, Promega, Roche, Aldrich ve Bacto™ 'dan temin edilmiştir.

2.1.2 Mikrobiyal Büyüme Besiyeri, Tamponlar ve Çözeltiler

2xYT Sıvı Besiyeri

Maya Ekstraktı	10 g/L
Tripton	16 g/L
NaCl	5 g/L

Amfisilin (100 mg/ml)

Stok amfisilin 1 ml'ye 100 mg olacak şekilde sulandırılmıştır, filtre ile sterilize edilmiştir.

IPTG (izopropil- β -D- tiyogaltopiranosid)

100 mM 1,5 ml stok IPTG için 35,74 mg IPTG tartılmıştır ve distile su ile 1,5 ml'ye tamamlanmıştır. Filtre ile sterilize edilmiştir.

% 30 Akrilamid/Bis Çalışma Çözeltisi (30 ml)

Akrilamid 8,7 g

N, N'-Metilen-Bis-Akrilamid 0,3 g

% 10 Amonyum Persülfat Çözeltisi

30 mg amonyum persülfat üzerine 300 μ l distile su eklenerek hazırlanmıştır.

SDS-PAGE Ayırma Jeli (% 12)

dH₂O 3,35 ml

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 2,5 ml

% 10 SDS 100 μ l

% 30 Akrilamid/Bis 4 ml

% 10 Amonyum Persülfat 75 μ l

TEMED 15 μ l

SDS-PAGE Yükleme Jeli (% 4)

dH₂O 3,05 ml

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 1,25 ml

% 10 SDS 50 μ l

% 30 Akrilamid/Bis 0,65 ml

% 10 Amonyum Persülfat 30 μ l

TEMED 6 μ l

SDS-PAGE Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB) (10 ml)

% 10 SDS	1 g
0,5 M Tris HCl (pH: 6,8)	0,6 g
% 5 Gliserol	0,5 ml
% 25 β -Merkaptoetanol	0,25 ml
% 0,05 Bromfenol mavisi	0,005 g

5X SDS-PAGE Tank Tamponu

0,025 M Trizma Base	15 g/L
0,192 M Glisin	72 g/L
% 0,1 SDS	5 g/L

Distile su ile 1X'e seyreltilerek kullanılmıştır.

Protein Boyama Çözeltisi

- % 0,1 Coomassie Brilliant Mavisi
- % 40 Metanol
- % 10 Glasiyal Asetik Asit

Boya Uzaklaştırıcı Çözelti

- % 5 Metanol
- % 7 Asetik Asit

Boya uzaklaştırıcı çözelti kullanıldıktan sonra aktif karbon ile muamele edilmiştir. Filtre kağıdı ile süzülerek tekrar kullanılmıştır.

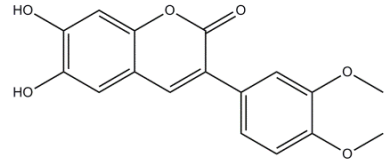
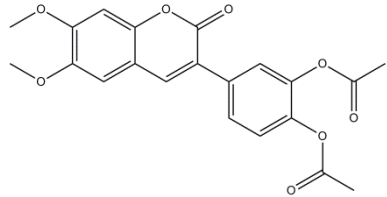
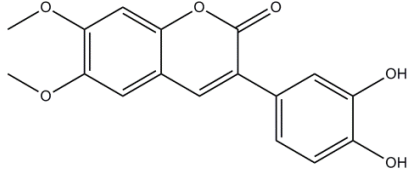
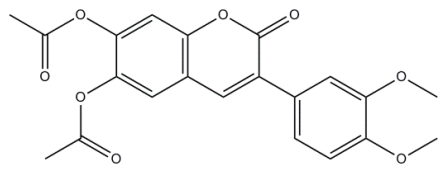
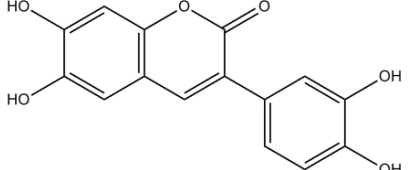
***T. annulata* Enolaz Aktivite Ölçümü İçin Kullanılan Tampon Çözeltisi**

- 50 mM Tris HCl (pH :7,4)
- 1,5 mM MgCl₂

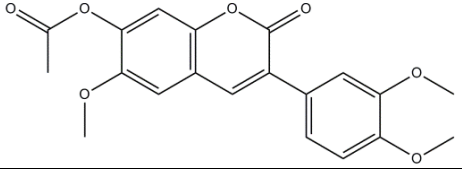
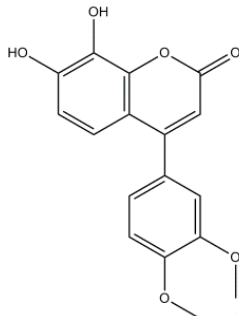
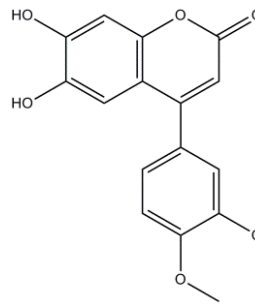
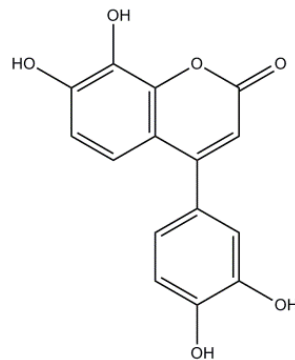
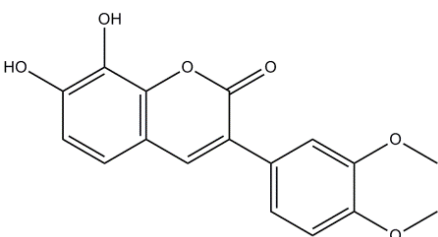
2.1.3 Enzim İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Kumarin Türevleri

Enzim inhibisyon analizlerinde kullanılan 3- ve 4-arilkumarin türevleri (K1-29) Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya ve Organik Kimya Anabilim Dalları'nda daha önceden Danis vd. tarafından belirtilen yöntemler ile sentezlenmiş [85], benzo[h]- ve benzo[g]-kumarin türevleri (A1-8 ve A10) ise Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda sentezlenmiştir (Yayın değerlendirme aşamasında) ve yapıları Çizelge 2. 1'de gösterilmiştir.

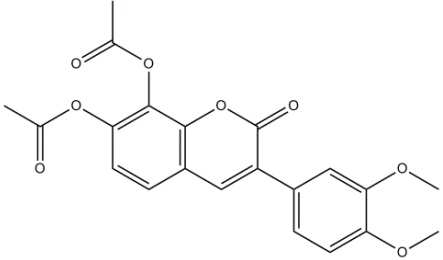
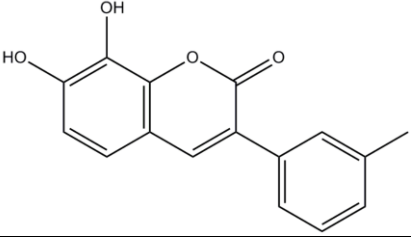
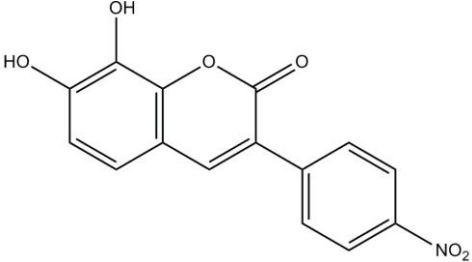
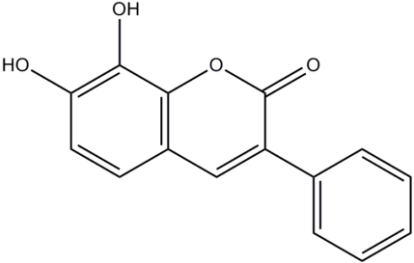
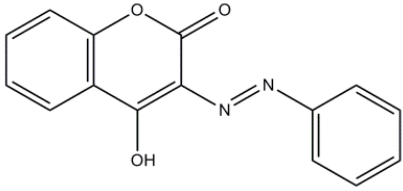
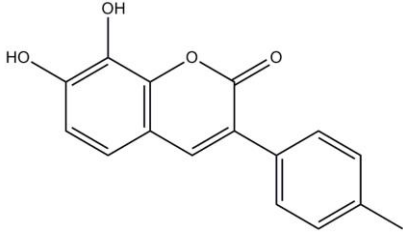
Çizelge 2. 1 Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri

Kumarin Türevleri		
Numarası	Adı	Formülü
K1	3-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K2	3-(3,4-diasetoksifenil)-6,7-dimetoksi-2H-kromen-2-on	
K3	3-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dimetoksi-2H-kromen-2-on	
K4	3-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-diasetoksi-2H-kromen-2-on	
K5	3-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	

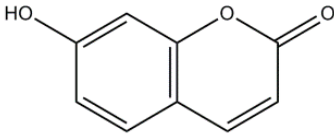
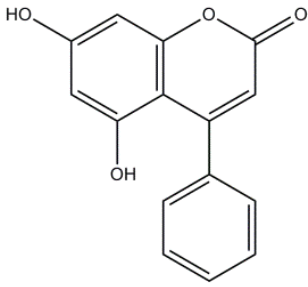
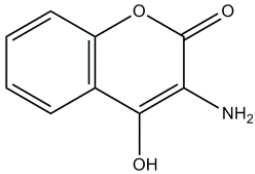
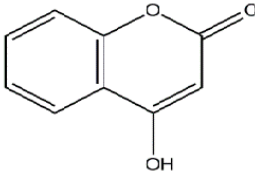
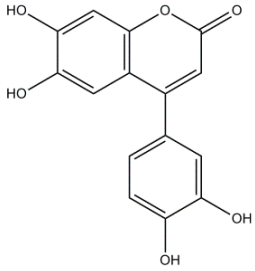
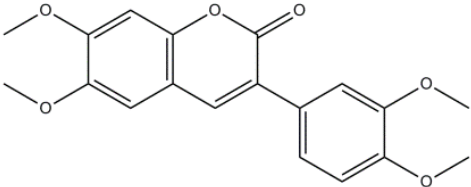
Çizelge 2. 1 Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri (Devamı)

Kumarin Türevleri		
Numarası	Adı	Formülü
K6	3-(3,4-dimetoksifenil)-6-metoksi-7-asetoksi-2H-kromen-2-on	
K7	4-(3,4-dimetoksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K8	4-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K9	4-(3,4-dihidroksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K10	3-(3,4-dimetoksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	

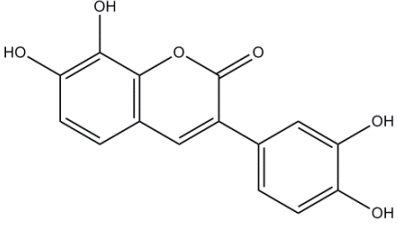
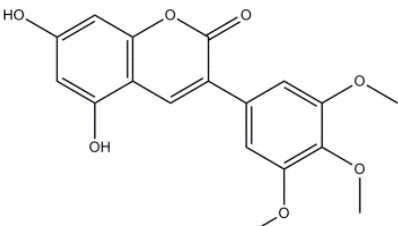
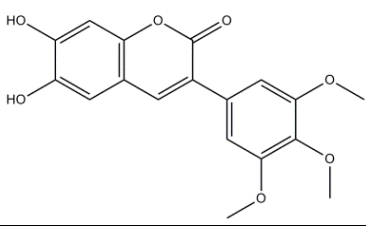
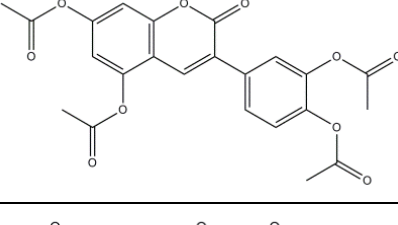
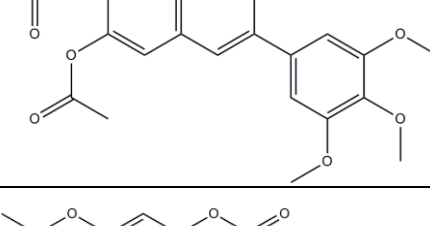
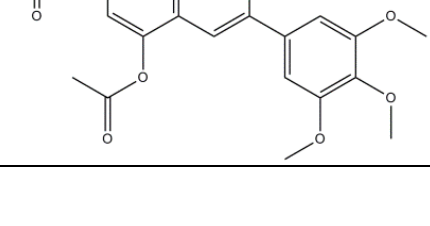
Çizelge 2. 1 Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri (Devamı)

Kumarin Türevleri		
Numarası	Adı	Formülü
K11	3-(3,4-dimetoksifenil)-7,8-diasetoksi-2H-kromen-2-on	
K12	3-(3-metilfenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K13	3-(4-nitrofenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K14	3-fenil-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K15	3-(fenildiazenil)-4-hidroksi-2H-kromen-2-on	
K16	3-(4-metilfenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	

Çizelge 2. 1 Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri (Devamı)

Kumarin Türevleri		
Numarası	Adı	Formülü
K17	7-hidroksi-2H-kromen-2-on	
K18	4-fenil-5,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K19	3-amino-4-hidroksi-2H-kromen-2-on	
K20	4-hidroksi-2H-kromen-2-on	
K21	4-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K22	3-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-dimetoksi-2H-kromen-2-on	

Çizelge 2. 1 Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri (Devamı)

Kumarin Türevleri		
Numarası	Adı	Formülü
K23	3-(3,4-dihidroksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K24	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-5,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K25	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
K26	3-(3,4-diasetoksifenil)-5,7-diasetoksi-2H-kromen-2-on	
K27	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-6,7-diasetoksi-2H-kromen-2-on	
K28	3-(3,4,5-trimetoksifenil)-5,7-diasetoksi-2H-kromen-2-on	

Çizelge 2. 1 Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri (Devamı)

Kumarin Türevleri		
Numarası	Adı	Formülü
K29	3-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on	
A1	3-(3,4-diasetoksifenil)-2H-benzo[g]kromen-2-on	
A2	3-(3,4-dimetoksifenil)-2H-benzo[g]kromen-2-on	
A3	3-(4-metoksifenil)-2H-benzo[g]kromen-2-on	
A4	3-(3,4-diasetoksifenil)-2H-benzo[h]kromen-2-on	
A5	3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[h]kromen-2-on	

Çizelge 2. 1 Kumarin türevlerinin kimyasal formülleri (Devamı)

Kumarin Türevleri		
Numarası	Adı	Formülü
A6	3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2H-benzo[g]kromen-2-on	
A7	3-(4-metoksifenil)-2H-benzo[h]kromen-2-on	
A8	3-(3,4-dimetoksifenil)-2H-benzo[g]kromen-2-on	
A10	6,6'-metilenbis(3-(3,4-dihidroksifenil)-2H-kromen-2-on	

2.2 Metod

2.2.1 TaENO'nun Ekspresyonu ve Nikel-Nitrilotriasetik Asit Agaroz Kolon Dolgu Maddesi Kullanılarak Yapılan Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

T. annulata enolazının ekspresyonu ve saflaştırılması Cayir vd. tarafından yayımlanan protokol esas alınarak gerçekleştirilmiştir [86]. TaENO genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücreleri 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml'lik 2xYT besiyeri içerisinde 37 °C'de ve 180 rpm'de bir gece inkübe edilerek kültürü yapılmıştır. 50 ml'lik ampisilin içeren 2xYT besiyerlerine bir gece öncesinde inkübe edilen kültürden 250'şer µl ekilerek 37 °C'de

ve 180 rpm'de OD₆₀₀ (Optik yoğunluk)'deki hücre yoğunluğu 0,5-0,6'ya ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. Hücre kültürü belirlenen hücre yoğunluğuna ulaştığında 30 °C sıcaklık, 0,5 mM IPTG konsantrasyonu ile 6 saat boyunca indüklemeye yapılmıştır. İndüklemeden sonra 25 ml'lik kültürler alınarak 5000 rpm'de 20 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelletler -80 °C'de saklanmıştır [86].

Ekspresyon aşaması tamamlandıktan sonra saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Saflaştırmada kullanılan tamponlar şu şekilde hazırlanmıştır:

Liziz Tamponu (1 L)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (MA 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl
10 mM imidazol	0,68 g imidazol

Elde edilen çözelti pH: 8,0'a ayarlanarak hazırlanmıştır.

Yıkama Tamponu (1 L)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (MA 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl
20 mM imidazol	1,36 g imidazol

Elde edilen çözelti pH: 8,0'a ayarlanarak hazırlanmıştır.

Elüsyon Tamponu (1 L)

50 mM NaH ₂ PO ₄	6,90 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (MA 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl
250 mM imidazol	17 g imidazol

Elde edilen çözelti pH: 8,0'a ayarlanarak hazırlanmıştır [86].

Saflaştırma basamağında 50 ml kültürden hazırlanan pelletler 3 ml lizis tamponunda çözülmüştür. Çözülen pellet, sonikatör ile % 40 güçte 10 saniye uygulama 10 saniye bekleme yapılarak 6 döngüde 2 dakika sürede parçalanmıştır. Elde edilen karışım, 14000 rpm'de 30 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir C- terminalinde His-tag ilavesi bulunan enzim ile Ni-NTA agarozun etkileşimini sağlamak için, süpernatant 1 ml Ni-NTA agaroz ile 1 saat boyunca +4 °C'de 120 rpm hızla karıştırılmıştır. Saflaştırma kolonunun paketlenmesi için 5 ml'lik bir şırınganın alt yüzeyini kapatacak şekilde kurutma kağıdı konulmuştur. Kurutma kağıdının üzeri 2,5 ml seviyesine kadar cam yünü ile kaplanmıştır ve uç kısmına ince hortum takılmıştır. Hazırlanan kolon destek çubuğuna sabitlenmiştir. Kolona 1 saat süreyle çalkalanan protein ve Ni-NTA agaroz karışımı yüklenmiştir. Kolondan çıkan ilk süzüntü toplanmıştır. Daha sonra 10 ml yıkama tamponu ile kolon yıkanarak iki tüp yıkama örneği alınmıştır. Son olarak elüsyon tamponu yüklenerek elüsyon örnekleri toplanmıştır [86].

2.2.2 Saflaştırılan *Ta*ENO'nun Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi Analizinin Yapılması

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak yapılmıştır. SDS-PAGE'de kullanılan jel, ayırma ve yükleme jeli olarak hazırlanmıştır.

Saflaştırma sonrasında birleştirilen enzim fraksiyonlarından 100 µl alınarak aynı miktarda SDS-PAGE örnek uygulama tamponu eklenmiştir ve 5 dakika kaynar suyun buharında bekletilmiştir. Jelde bulunan kuyucuklara hazırlanan örnekler yüklenmiştir. Elektroforez tamponu olarak 1 x TAE (Tris-asetat-EDTA) kullanılmıştır. Örnekler 85 voltta bromfenol mavisi jelin sonuna gelinceye kadar yürütülmüştür. Jel protein boyama çözeltisinde 37 °C'de 45 dakika boyunca boyanmıştır ve daha sonra boya uzaklaştırıcı çözelti içerisinde protein bantları net bir şekilde gözlenebilir duruma gelinceye kadar bekletilmiştir. Elde edilen jel örnekleri fotoğraflanmıştır [87].

2.2.3 *T. annulata* Enolazının Aktivite Tayini

*Ta*ENO'nun aktivite ölçümü, 2-PG'nin PEP'e dönüşümünün 240 nm'deki absorpsiyon artışı belirlenerek yapılmıştır. Reaksiyon 1,5 mM MgCl₂ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tamponunda oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, reaksiyonlarda kullanılan enzim miktarı ve substrat konsantrasyonları yapılan her bir aktivite analizinde optimize

edilmiştir. Enzim miktarı 1 ml'lik toplam hacimdeki reaksiyonlarda 10 µl kullanılmakla birlikte 200 µl'lik toplam hacimde gerçekleştirilen reaksiyonlarda 2 µl ve 4 µl arasında kullanılacak şekilde optimize edilmiştir. 2-PG konsantrasyonları ise 1 mM ve 3 mM arasında optimize edilerek kullanılmıştır [86].

2.2.4 *T. annulata* Enolazının Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi

Gliserol ve sığır serum albümin (BSA) kullanılarak yapılan stabilizasyon analizinde, 2.2.1'deki protokol esas alınarak yapılan saflaştırma sonrasında toplanan elüsyon örnekleri mikrofiltre ile filtrelenerek birleştirilmiştir. Filtre ile sterilize edilen *TaENO*'nun aktivite ölçümü 2.2.2'de belirtilen standart protokol ile yapılmıştır. Substrat olarak 1 mM 2-PG kullanılmıştır ve reaksiyon 1 ml hacimde 2 dakika süre içerisinde gerçekleştirilmiştir [86].

T. annulata enolazının stabilizasyonunun sağlanarak depolanması için yapılan ilk analizde, sığır serum albümin (BSA) [88] ve gliserol [89], [90] enzim stabilizasyonundaki etkileri bilindiğinden tercih edilmiştir. *TaENO* aktivite ölçümü yapıldıktan sonra elde edilen enzim çözeltisi 3 falkon tüpte 1,5 ml enzim olacak şekilde bölünmüştür. Gliserol ve BSA konsantrasyonları; son konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde BSA, % 10 gliserol olacak şekilde belirlenmiştir. Ayrıca, hiçbir stabilizatör eklenmeden zamanla enzimin aktivitesinin ne derece değiştiğini belirlemek için saf enzim çözeltisi ayrılmıştır. Bütün enzim çözeltileri 10'ar tüpe bölünerek her bir karışımdan 10'ar tüp olacak şekilde +4 °C, -20 °C ve -80 °C'de saklanmıştır. -80 °C'ye konulmadan önce her tüp sıvı azotta dondurulmuştur.

Belirlenen günlerde her bir enzim çözeltisi alınarak standart enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Stabilizatörler eklenmeden önce yapılan ölçüm her bir enzim çözeltisi için ilk değer kabul edilerek 2., 3., 6. ve 14. günlerde ölçümler yapılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Gliserol ve BSA'dan farklı stabilizatörler kullanılarak yapılan stabilizasyon analizinde, 2.2.1'deki standart protokole göre ekspresyon ve saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma aşamasında son olarak 4 ml elüsyon tamponu yüklenerek elüsyon fraksiyonları toplanmıştır [86]. Yapılan farklı saflaştırmalar ile yüksek konsantrasyonda protein

alındığı bilinen elüsyon fraksiyonları mikrofiltre ile filtrelenip birleştirilerek saf *T. annulata* enolaz elde edilmiştir.

Belirlenen fraksiyonların birleştirilmesi ile elde edilen 5 ml'lik saf enzim 1'er ml'lik fraksiyonlara bölünmüştür. Her bir fraksiyona Çizelge 2. 2'de belirtilen miktarlarda ditiotreitol (DTT), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), gliserol, sükroz, etilen glikol gibi stabilizatörler eklenmiştir.

Çizelge 2. 2 *Ta*ENO'nun stabilizasyonunda kullanılan stabilizatörler

	Stabilizatör	Son konsantrasyon	Kaynak
E1	DTT EDTA Gliserol	10 mM DTT 5 mM EDTA % 10 Gliserol (1,36 M)	[91]
E2	DTT Gliserol	10 mM DTT % 10 Gliserol (1,36 M)	[91]
E3	DTT	10 mM	[91]
E4	Sükroz	1 M	[92]
E5	Etilen Glikol	6 M	[92]

Hazırlanan her bir enzim çözeltisi 30 µl olacak şekilde 1,5 ml'lik tüplere bölünmüştür. Her bir çözeltiden elde edilen tüpler -80 °C, -20 °C ve +4 °C'ye konulacak şekilde ayrılmıştır. -80 °C'de saklanmak üzere hazırlanan tüm enzim çözeltileri sıvı nitrojen ile hızlı dondurma işlemine tabi tutulmuştur.

Belirlenen günlerde her bir sıcaklıkta her bir çözeltiden birer tüp alınmıştır ve standart enzim aktivite ölçümü 2 kez tekrarlı olarak yapılmıştır. Reaksiyonlarda substrat olarak 1,5 mM 2-PG kullanılmıştır ve reaksiyon 1 ml hacimde 2 dakika süre içerisinde gerçekleştirilmiştir [86].

2.2.5 *T. annulata* Enolazının Saflaştırma Optimizasyonları

2.2.5.1 Nikel-Nitrilotriasetik Asit Agaroz Kolon Dolgu Maddesi Kullanılarak Yapılan Afinite Kromatografisi Protokolünün Optimizasyon Çalışmaları

Standart protokoldeki ekspresyon aşamasının gerçekleştirilmesinden sonra saflaştırma basamağında son olarak 4 ml elüsyon tamponu yüklenerek 500 µl elüsyon fraksiyonları

toplanmıştır. Yapılan farklı saflaştırmalar ile yüksek konsantrasyonda protein alındığı bilinen elüsyon fraksiyonları mikrofiltre ile filtrelenip birleştirilmiştir. Standart protokoldeki tamponlar 2.2.1. başlığında belirtilen şekilde hazırlanmaktadır [86].

Theileria annulata enolazının yüksek saflıkta elde edilmesi için standart protokolde ekstra bantların görülmesine karşın önerilen çeşitli optimizasyonlar uygulanmıştır (Qiagen, Almanya). Protokolde Çizelge 2. 3'te belirtilen değişiklikler ayrı ayrı uygulanmış ve saf enzim elde etmek için çalışmalar yapılmıştır.

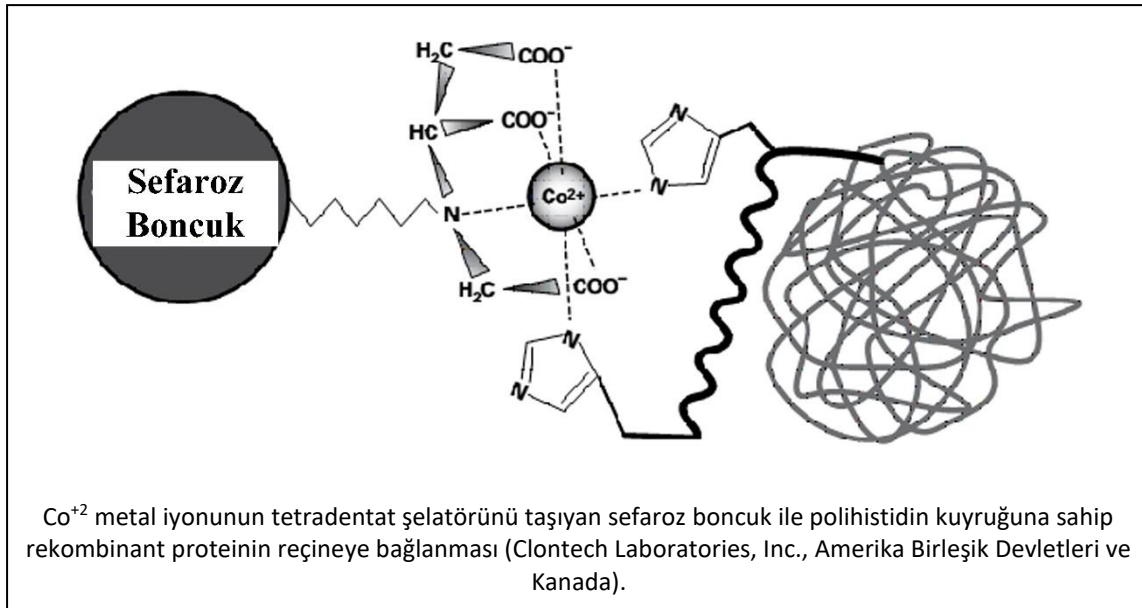
Çizelge 2. 3 Ni-NTA agaroz kolon dolgu maddesi ile yapılan afinite kromatografisi protokolündeki optimizasyon uygulamaları

Enzim Saflaştırma	Kurutma Kağıdı	NaCl Konsantrasyonu (Her bir tamponda)	Ni-NTA Agaroz Miktarı	Kimyasal İlavesi (Sadece liziz tamponu)	Gliserol ilavesi (Sadece yıkama tamponu)
1.uygulama	Çift	300 mM	1000 µl	-	-
2.uygulama	Tek	600 mM	1000 µl	-	-
3.uygulama	Tek	1000 mM	1000 µl	-	-
4.uygulama	Tek	300 mM	700 µl	-	-
5.uygulama	Tek	300 mM	1500 µl	-	-
6.uygulama	Tek	300 mM	2000 µl	-	-
7.uygulama	Tek	300 mM	1000 µl	15 mM 2-Merkapto etanol	-
8.uygulama	Tek	300 mM	1000 µl	%2 Triton-X	-
9.uygulama	Tek	300 mM	1000 µl	-	%5
10.uygulama	Tek	300 mM	1000 µl	-	%10
11.uygulama	Tek	600 mM	1500 µl	-	-
12.uygulama	Tek	600 mM	1500 µl	-	%5

2.2.5.2 Kobalt Yüklü TALON® Kolonu ile Yapılan Afinite Kromatografisi Yöntemiyle TaENO'nun Saflaştırılması

TALON® reçineler, rekombinant polihistidin bağlı proteinlerin saflaştırılması için tasarlanmış dayanıklı kobalt tabanlı metal afinite kromatografisi reçineleridir [93] (Clontech Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada). Bu reçineler, çok yaygın olarak kullanılan reaktifler ile uyumlu olan, doğal ya da denatüre edici koşullar

altında protein saflaştırılmasını sağlamaktadır (Şekil 2. 1) (Clontech Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada).



Şekil 2. 1 TALON metal afiniteli reçine.

Saflaştırma basamağında 2.2.1’de belirtilen şekilde 50 ml’lik kültürlerden elde edilen pelletler 3 ml liziz tamponunda çözülmüştür. Çözülen pellet, sonikatör ile % 40 güçte 10 sn uygulama 10 sn bekleme yapılarak 6 döngüde 2 dakika sürede parçalanmıştır. Elde edilen karışım, 14 000 rpm’de 30 dk 4 °C’de santrifüj edilmiştir. Ticari olarak elde edilen TALON® kolonu (Clontech Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada) 10 ml dengeleyici tampon ile yıkanmıştır. Elde edilen hücre lizatı kolona yüklenmiştir ve kolondan çıkan ilk süzüntü toplanmıştır. Bu basamaktan sonra kolon 8 ml dengeleyici tampon ile yıkanmıştır. Daha sonra 7 ml yıkama tamponu ile kolon yıkanarak iki tüp yıkama örneği alınmıştır. 5 ml elüsyon tamponu 2 yüklenerek 1 ml elüsyon fraksiyonları toplanmıştır. Belirtilen saflaştırma protokolü iki farklı 50 ml’lik hücre kültür pelleti için uygulanmıştır ve elde edilen en yüksek konsantrasyondaki elüsyon fraksiyonları mikrofiltreden geçirilerek birleştirilmiştir. Birleştirilen enzim çözeltisi tekrar TALON® kolona yüklenmiştir ve aynı protokol uygulanmıştır. Son olarak kolona 20 ml dengeleyici tampon kolona yüklendikten sonra 5 ml distile suyla yıkanmıştır. TALON® kolon tekrar kullanılmak üzere % 20’lik etanol eklenerek +4 °C’de saklanmıştır. Uygulanan protokolde belirtilen tamponlar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Liziz Tamponu (1 L)

50 mM NaH₂PO₄ 6,90 g NaH₂PO₄·H₂O (MA 137,99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

10 mM imidazol 0,68 g imidazol

NaOH kullanılarak pH: 8,0'a ayarlanmıştır.

Dengeleyici Tampon (1 L)

50 mM NaH₂PO₄ 6,90 g NaH₂PO₄·H₂O (MA 137,99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

10 mM imidazol 0,68 g imidazol

NaOH kullanılarak pH: 8,0'a ayarlanmıştır.

Yıkama Tamponu (1 L)

50 mM NaH₂PO₄ 6,90 g NaH₂PO₄·H₂O (MA 137,99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

20 mM imidazol 1,36 g imidazol

NaOH kullanılarak pH: 8,0'a ayarlanmıştır.

Elüsyon Tamponu 2 (1 L)

50 mM NaH₂PO₄ 6,90 g NaH₂PO₄·H₂O (MA 137,99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

150 mM imidazol 10,2 g imidazol

NaOH kullanılarak pH: 8,0'a ayarlanmıştır.

Saf olarak elde edilen *T. annulata* enolaz çözeltisine mikrofiltreden geçirildikten sonra son konsantrasyonu 6 M olacak şekilde etilen glikol eklenmiş ve standart aktivite ölçümünde substrat olarak 1,5 mM 2-PG kullanılmıştır ve reaksiyon 1 ml hacimde 2 dakika süre içerisinde gerçekleştirilmiştir [86].

2.2.6 Kumarin Türevlerinin İnhibitör Etkinliğinin *T. annulata* Enolazı Kullanılarak Taranması

*Ta*ENO'nun saflaştırılmasının ardından saf enzim çözeltisine son konsantrasyonu 6 M olacak şekilde etilen glikol eklenmiştir ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Bu aşamada elde edilen enzim çözeltisi +4 °C'de saklanmıştır.

Kumarin türevlerinin inhibitör etkinliğinin taranması için, standart *Ta*ENO enzim aktivite reaksiyon bileşenleri temel alınarak [86] ön deneylerde 2, 3, 4, µl enzim; 1,5 mM ve 2,25 mM, 3 mM 2-PG konsantrasyonları kullanılarak farklı reaksiyon ölçümleri yapılmıştır ve optimizasyon sonrasında 2 µl enzim, 3 mM 2-PG'nin reaksiyonlarda kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, 100 µM'dan daha yüksek kumarin konsantrasyonlarında yapılan reaksiyonlarda kumarinlerin çökmesi nedeniyle bu tarama analizlerinde üst sınır olan 100 µM kumarin konsantrasyonu temel alınarak çalışılmıştır. Kumarin türevleri ile yapılan inhibisyon çalışmalarında, kumarin türevleri DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözülmüştür. Reaksiyonlarda; 1,5 mM MgCl₂ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tampon, 2 µl inhibitör (DMSO içinde çözülmüş 100 µM konsantrasyonda 38 adet kumarin türevi) ve 2 µl enzim içeren reaksiyon karışımı 25 °C'de 600 devirde 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda son konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde 2-PG eklenmiştir ve 240 nm dalga boyunda, iki dakika boyunca 20 saniye aralıklarla absorbans ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol olarak, 2 µL kumarin çözeltisi yerine 2 µL DMSO (çözelti içindeki son konsantrasyon %1) eklenerek absorbans ölçümü yapılmıştır.

% İnhibisyon denklem 2. 1'e göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\Delta A_{240} \text{ kontrol} - \Delta A_{240} \text{ reaksiyon})}{\Delta A_{240} \text{ kontrol}} \times 100 \quad (2.1)$$

ΔA_{240} kontrol; negatif kontrol reaksiyonunun 240 nm'deki absorbans farkı değerini, ΔA_{240} reaksiyon; kumarin eklenerek gerçekleştirilen reaksiyonun 240 nm'deki absorbans farkı değerini ifade etmektedir.

2.2.7 Belirlenen Kumarin Türevlerinin IC_{50} Değerlerinin *T. annulata* Enolazı Kullanılarak Hesaplanması

Protein saflaştırma analizleri sonrası elde edilen saf enzim miktarı göz önünde bulundurularak kumarin türevlerinin IC_{50} değerlerinin belirlenmesi için yeni bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Standart TaENO enzim aktivite reaksiyon bileşenleri temel alınarak [86] 2, 3, 4, μ l enzim; 3 mM 2-PG konsantrasyonları kullanılarak farklı reaksiyon ölçümleri yapılmıştır ve optimizasyon sonrasında 3 μ l enzim, 3 mM 2-PG konsantrasyonlarının reaksiyonlarda kullanılmasına karar verilmiştir. Aktivite tarama çalışmasının sonucuna göre 100 μ M konsantrasyonda % 90 ve üzeri aktivite gösteren kumarin türevleri ile ileri inhibisyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda; 1,5 mM $MgCl_2$ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tampon, 2 μ l inhibitör (DMSO içinde çözünmüş 1-50 μ M arası konsantrasyonlarda kumarin türevi) ve 3 μ l enzim içeren reaksiyon karışımı 25 °C'de 600 devirde 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda son konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde 2-PG eklenmiştir ve 240 nm dalga boyunda, iki dakika boyunca 20 s aralıklarla absorbans ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol olarak, 2 μ L kumarin çözeltisi yerine 2 μ L DMSO eklenerek absorbans ölçümü yapılmıştır. % İnhibisyon denklem 3. 1'de gösterilen veriler ele alınarak hesaplanmıştır.

IC_{50} değeri spesifik bir substrat konsantrasyonunda bir enzimatik reaksiyonun % 50 oranında inhibisyonunu oluşturmak için gereken inhibitör konsantrasyonunu ifade etmektedir [94]. Belirlenen kumarin türevlerinin saflaştırılan enzim üzerinde çalışılarak tespit edilen IC_{50} değerleri; en az beş farklı inhibitör konsantrasyonunun doğal logaritmik değerlerine karşı yüzde inhibisyon değerlerinin lineer olmayan regresyon analizleri ile değişken eğim (variable slope) baz alınarak GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Ltd., La Jolla, ABD) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.8 *T. annulata* Enolazının Kumarin Türevleri Kullanılarak Enzim İnhibisyon Mekanizmasının Belirlenmesi

2.2.8.1 *T. annulata* Enolazının Konsantrasyon Tayini ve Kinetik Analizi

Saf enzim çözeltisine son konsantrasyonu 6 M olacak şekilde etilen glikol eklenmiş ve aktivite varlığını belirlemek için aktivite ölçümü yapılmıştır. Bu aşamada elde edilen enzim çözeltisi +4 °C’de saklanmıştır.

Enzim kinetiği ve enzim inhibisyon mekanizması çalışmalarında kullanılan saf *T. annulata* enolazının protein konsantrasyonu tayini Bradford yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemde kullanılan Bradford reaktifi olan Coomassie Brilliant Mavisi G-250 etanol içerisinde çözülmüş halde kullanılmıştır. Protein stok çözeltisi olan 2 mg/ml ovalbümin çözeltisi 0,1 mg/ml olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır (Çizelge 2. 4).

Çizelge 2. 4 Bradford yönteminde hazırlanan protein çözeltilerin içeriğine eklenen miktarlar

	Protein Stok Çözeltisi (µl)	Distile su (µl)	Bradford reaktifi (µl)
1	0	800	200
2	20	780	200
3	40	760	200
4	60	740	200
5	80	720	200
6	Örnek (2 µl)	798	200

Her bir çözeltiden 3 adet hazırlanmasıyla 3 kez tekrarlı olarak 595 nm’de ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda her bir stok çözeltinin protein konsantrasyonu belirlenerek konsantrasyona karşı absorbands (A_{595}) grafiği çizilmiştir. Grafikteki R^2 değerinin 1’e yakın olup olmadığı tespit edilerek yapılan ölçümlerin doğruluğu analiz edilmiştir ve $y=mx+n$ denklemi ile hesaplama yapılarak hazırlanan örnek için belirlenen absorbanda göre protein konsantrasyonu belirlenmiştir [95].

Enzimin kinetik analizi için, 240 nm dalga boyunda reaksiyon sonucunda oluşan PEP artışı ölçülmüştür. Reaksiyon hacmi 200 µl ve reaksiyon süresi 2 dakika olarak belirlenmiştir. Ölçüm 1,5 mM $MgCl_2$ ve 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) tampon içerisinde 25 °C’de gerçekleştirilmiştir [86]. Saflaştırılan enzimin bu koşullarda farklı substrat konsantrasyonlarındaki (50-2000 µM) reaksiyon sonuçlarına göre kinetik özellikleri

belirlenmiştir. Kumarin içermeyen bu reaksiyonlarda, 2 µL DMSO eklenerek absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen reaksiyon değerleri ile GraphPad Prism 6.0 programı (GraphPad Software Ltd., La Jalla, USA) kullanılarak enzimin kararlı hal kinetik grafiği elde edilmiştir ve PEP'in molar absorblama katsayısı ($\epsilon_{\text{PEP}} = 1400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [96] enzim konsantrasyonu da hesaplamalara eklenerek K_m , V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

2.2.8.2 Belirlenen Kumarin Türevleri ile Enzim İnhibisyon Mekanizmasının Tayin Çalışmaları

İnhibisyon analizleri sonucunda 15 µM'dan daha düşük IC_{50} değerine sahip kumarin türevleri kullanılarak 50 ile 2000 µM arası substrat (2-PG) konsantrasyonlarında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda; 1,5 mM MgCl_2 içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tampon, 2 µl inhibitör (DMSO içinde çözünmüş 0,5-5 µM arası konsantrasyonlardaki kumarin türevi) ve 3 µl enzim (1/6 seyreltilerek hazırlanan stok enzim çözeltisinden) içeren reaksiyon karışımı 25 °C'de 600 devirde 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 2-PG eklenmiştir ve 240 nm dalga boyunda, iki dakika boyunca 20 saniye aralıklarla absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; Lineaweaver-Burk grafiği oluşturularak inhibisyon mekanizması tespit edilmiştir [17].

Reaksiyonlar sonucunda ölçülen $\Delta A_{240}/\text{dk}$ değerleri ele alınarak reaksiyon hızı için spesifik aktivite değerleri hesaplanmıştır. Reaksiyonda oluşan fosfoenolpirüvat ile absorbans artışı tayin edildiğinden dolayı bu hesaplamada PEP'in molar absorblama katsayısı ($\epsilon_{\text{PEP}} = 1400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [96] kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi (V_T) ve kullanılan enzim miktarı (mg) hesaba katılarak spesifik aktivite ($\mu\text{mol} \cdot \text{dk}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) denklem 2. 2'ye göre hesaplanmıştır.

$$U/\text{mg} = \frac{[(\Delta A_{240}/\text{dk}) \times V_T] / (\epsilon_{\text{PEP}} \times \text{ışık yolu uzunluğu})}{\text{kullanılan enzim miktarı}} \quad (2. 2)$$

Substrat konsantrasyonu ve hız değerleri girilerek K_m ve V_{max} kinetik parametreleri GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Ltd., La Jalla, USA) programında Michaelis-Menten enzim kinetiği modülü kullanılarak belirlenmiştir. Yarışmasız (uncompetitive) inhibisyonunda belirlenen K_i' değeri $\text{Alpha}K_i$ olarak da adlandırılmaktadır

(http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curvefitting/index.htm?reg_uncompetitive_inhibition.htm). Ayrıca, inhibitör varlığında K_m ve V_{max} değerleri değişmektedir. Bu nedenle; hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri “apparent” yani görünür olarak adlandırılmaktadır (K_{mApp} ve V_{maxApp}) [17]. Bu değerler denklem 2. 3’e göre hesaplanmaktadır.

$$V_{maxApp} = \frac{V_{max}}{(1 + \frac{I}{\alpha K_i})} \quad K_{mApp} = \frac{K_m}{(1 + \frac{I}{\alpha K_i})} \quad (2. 3)$$

αK_i değeri GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Ltd., La Jalla, USA) programında lineer olmayan regresyon analizleri ile yarışmasız (uncompetitive) inhibisyon özelliği kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.9 Ticari Bir İnhibitör Olan ENOblock®’un *T. annulata* Enolazını İnhibisyon Potansiyelinin Analizi

Kumarin türevlerinin etkinliğinin analizinde olduğu gibi *Ta*ENO’nun saflaştırılmasının ardından saf enzim çözeltisine son konsantrasyonu 6 M olacak şekilde etilen glikol eklenmiştir ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Bu aşamada elde edilen enzim çözeltisi +4 °C’de saklanmıştır.

ENOblock® (AdooQ Bioscience)’un *Ta*ENO üzerinde inhibitör potansiyelinin araştırılması için, standart enzim aktivite reaksiyon bileşenleri temel alınarak [86] 3 µl enzim, 3 mM 2-PG ve farklı konsantrasyonlarda (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM) ENOblock® reaksiyonlarda kullanılmıştır. Reaksiyonlarda ENOblock® DMSO içerisinde çözülmüştür. 1,5 mM MgCl₂ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tampon, 2 µl inhibitör (ENOblock®) ve 3 µl enzim içeren reaksiyon karışımı 25 °C’de 600 devirde 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda son konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde 2-PG eklenmiştir ve 240 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol olarak, inhibitör olmadan 2 µl DMSO (çözelti içindeki son konsantrasyon % 1) eklenen reaksiyon karışımının absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen % inhibisyon değerleri daha önceki başlıklarda belirtilen denklem 2. 1’e göre hesaplanmıştır.

2.2.10 En İyi İnhibisyonu Sağlayan Kumarin Türevinin Enzim İle Etkileşiminin Kütle Spektroskopisi İle Gösterilmesi

MALDI-TOF kütle spektrometresi protein ve peptid karakterizasyonunda sıkça kullanılan ve proteomik çalışmalarının belkemiğini oluşturan bir yöntemdir. Kütle spektrometresinde ilgili molekül iyonlaştırılıp gaz fazına geçirilerek analizörde kütle/yük oranı saptanmaktadır. Bu sayede ilgili molekülün veya fragmentlerinin molekül kütleleri saptanabilmektedir. Moleküllerin iyonlaştırılması için önceden sert iyonlaştırma yöntemleri kullanılmaktaydı ve bu yöntemler molekülü fragmentlerine ayırmaktaydı. Ancak daha sonra geliştirilen ESI (elektrosprey iyonlaştırma) ve MALDI (Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon) gibi yumuşak iyonlaştırma yöntemleriyle molekül parçalarına ayrılmadan kütlesi saptanabilmektedir. Bu sayede çok yüksek molekül kütlelerine sahip proteinler bile parçalanmaya uğramadan bu yöntemle analiz edilerek molekül kütleleri bulunabilmektedir [97].

Yapılan tez çalışmasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Proteomiks Laboratuvarı'nda bulunan ABSciex MALDI-TOF/TOF 5800 cihazı kullanılarak enzim ve enzim inhibitör karışımlarının kütle spektrumları elde edilmiştir. Lineer modda yapılan analizlerde BSA ile kalibrasyon yapılmıştır.

Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektroskopisinde (MALDI-TOF) incelenen tüm enzim örnekleri afinite kromatografisinde saflaştırıldıktan sonra 6 M etilen glikol çözeltisine karşı 1 gece diyaliz edilmiştir. Bu sayede kütle spektrometresi analizlerinde sinyal oluşmasını engelleyebilecek olan iyonlar uzaklaştırılmıştır.

2.2.11 *T. annulata* Enolazının Açık ve Kapalı Konformasyonunun Homoloji Modellemesi

2.2.11.1 *T. annulata* Enolazının Protein Dizisinin Eşleştirilmesi

Theileria annulata (Erişim numarası: ADU859739), *Theileria parva* (Erişim numarası: XP_764336), *Toxoplasma gondii* (Erişim numarası: 3OTR_A GI:307568483), *Plasmodium falciparum* (Erişim numarası: AAA18634), *Lycopersicum esculentum* (Erişim numarası: X58108), *Bos taurus* (Erişim numarası: AAI02989 kas enolazı), *Homo sapiens* (Erişim numarası: 3UCC_A GI:401871303 kas enolazı), *Saccharomyces*

cerevisiae (Erişim numarası: P00924) amino asit dizileri NCBI protein veri tabanından elde edilmiştir ve MUSCLE programına FASTA formatı girilen bu protein dizileri eşleştirilmiştir. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) [98]. *T.annulata* enolazının fizikokimyasal özellikleri ExpASy portalından ProtParam kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.11.2 *T. annulata* Enolazının Homoloji Modellerinin Yapılması

Homoloji modellemedeki ilk basamak, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını kristalografi gibi deneysel yöntemlerle yapısı belirlenmiş uygun bir kalıp belirlemektir [59], [99]. Kalıp proteinler NCBI/BLAST sunucusu kullanılarak belirlenmiştir ve *TaENO*'nun FASTA formatındaki amino asit dizisi kullanılarak (Erişim numarası: ADU859739) PDB (Protein Data Bank)'deki proteinlere karşı PSI-BLAST taraması (BLOSUM62 matrix, Expect threshold, 10) gerçekleştirilmiştir. Kalıp proteinler Maksimum skor, Query cover, E-değeri ve yüzde benzerlik oranına dayanarak seçilmiştir. Belirlenen kalıp proteinin atom koordinatları protein bilgi bankasından (RSCB Protein Data Bank) (www.rcsb.org) elde edilmiştir.

TaENO'nun açık konformasyonunun 3 boyutlu modeli MODELLER ver9.12 programı [64] kullanılarak homoloji modelleme yöntemiyle oluşturulmuştur. Model oluşturulurken bu programa veri olarak kalıp protein dosyası ve hedef amino asit dizisi girilmiştir. Farklı Optimize Edilmiş Protein Enerjisi (DOPE) ve normalize DOPE (z-DOPE) skorlarına dayanarak 50 model arasından en iyi model seçilmiştir. *TaENO*'nun kapalı konformasyonunun modeli MODELLER ver9.15 programı [64] kullanılarak oluşturulmuştur ve en iyi model belirtilen skora dayanarak 100 model arasından seçilmiştir.

Seçilen modellerin enerji minimizasyonu ile birlikte geometrisi AMBER kuvvet alanı 14SB uygulanarak ve UCSF Chimera ver1.10.1 programındaki Steepest Descent algoritması kullanılarak optimize edilmiştir [100]. PyMOL programı, seçilen kalıplar ve model proteinlerin üç üşte eklenerek pozisyon analizi (süperimpozisyon) ve Sapmanın Ortalama Karekökü (RMSD) değerinin hesaplanması için kullanılmıştır (The PyMOL Molecular Graphics System, ver1.7.4 Schrödinger, LLC).

Oluşturulan protein modellerine çeşitli tiplerdeki validasyon aşamaları uygulanmıştır. ERRAT ver2.0, atomlar arasındaki etkileşimlerin istatistiklerin analiz edilmesinde

kullanılmıştır [67]. Model proteinlerin Ramachandran plotları RAMPAGE kullanılarak belirlenmiştir [68]. Protein kalitesi ProQ ve ProSA kullanılarak değerlendirilmiştir. ProSA sunucusu, protein modellerin enerji düzeyini ve toplam kalite skorunu vermektedir. ProQ sunucusu ise, LGscore (P-değerinin logaritması) değerinin hesaplanarak protein modelin kalitesinin belirlenmesini sağlamaktadır [69], [70].

2.2.11.3 *T. annulata* Enolazının İkincil Yapı ve Domain Analizi

T. annulata enolazının ikincil yapı elementleri (alfa heliks, beta tabaka ve rastgele dönüşler) PSIPRED protein dizi analizi tekniği kullanılarak belirlenmiştir [101]. PSIPRED ver3.3 sunucusu, PSI-BLAST taraması tarafından oluşturulan pozisyon spesifik skorlama matrislerine dayanan tahmini kriterlerin yüksek doğruluğu ile protein ikincil yapısını tespit etmek için seçilmiştir [102]. Domain analizi, FASTA arama seçeneği ile CATHGene3D protein yapı sınıflandırma veritabanı (Sınıf, Yapı, Topoloji, Homoloji) kullanılarak yapılmıştır [103].

TaENO'nun domainleri Molsoft ICM-Browser (MolSoft LLC, La Jolla, CA, USA) ile görüntülenmiştir. Kapalı ve açık konformasyonlarının Poisson-Boltzmann elektrostatiklerin hesaplanması PDB2PQR ver2.0.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [104]. Başlangıçta PROPKA ver3.0 sunucusu, bu sunucudan sağlanan AMBER99 kuvvet alanı uygulanmasıyla pH 7,4'teki protonasyon durumunu değerlendirmek için ve APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) giriş dosyaları oluşturmak için [105] kullanılmıştır. Daha sonra APBS ver1.3 ile Poisson-Boltzmann elektrostatiklerin hesaplanması başlatılmıştır [106].

2.2.12 *T. annulata* Enolazının Homoloji Modeli ile Yapılan Moleküler Yanaştırma Analizleri

2.2.12.1 *T. annulata* Enolaz Modelinin Substratı olan 2-Fosfoglisarik Asit ile Moleküler Yanaştırmasının Yapılması

T. annulata enolazının ilaç bağlama yeteneği ve potansiyel aktif bölge cepleri DoGSiteScorer (Aktif bölge belirleme ve analiz sunucusu) [107] ve 3DligandSite (Ligand bağlanma bölgesi belirleme sunucusu) [108] kullanılarak belirlenmiştir. 2-PG yapısı SDF file formatı (PubChem ID: 59) ile NCBI PubChem veri tabanından alınmıştır. En düşük enerjideki konformasyonu MarvinSketchver15.2.9, 2015, ChemAxon

(<http://www.chemaxon.com>) kullanılarak belirlenmiştir ve yanaştırma çalışmalarında kullanılmıştır. *Ta*ENO'nun aktif bölgesine 2-PG'nin bağlanma çeşitleri AutoDockVina ve Molegro Virtual Docker programları kullanılarak belirlenmiştir. Bu programlar ile substratın bağlanma çeşitleri tahmin edilmektedir ve moleküller arası kuvvetlerin toplamı ile tanımlanan skorum fonksiyonuna dayalı belirli pozisyon enerjisi hesaplanmaktadır [82], [109]. 2-PG'nin protein modelindeki bağlanma çeşitleri PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Ver1.7.4 Schrödinger, LLC) kullanılarak görüntülenmiştir.

2.2.12.2 *T. annulata* Enolaz Modelinin Belirlenen Kumarin Türevleri ile Schrödinger Glide Programı Kullanılarak Moleküler Yanaştırmasının Yapılması

Kumarin türevlerinin kimyasal yapıları ChemDraw ver10 programı ile çizilmiş ve en düşük enerji konformasyonları MMFF94 kuvvet alanı uygulanması ile MarvinSketch ver15.2.9, 2015, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) yazılımı tarafından belirlenmiştir. *In silico* analizlerde uygulanan bütün programlar için altyapı olarak Maestro Molecular Modeling Interface 11.1 (Schrödinger Release 2017-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) kullanılmıştır ve *Ta*ENO modelinin belirlenen dört farklı potansiyel ilaç bağlanma bölgelerine belirlenen kumarin türevleri ile yanaştırma yapılmıştır.

*Ta*ENO kapalı konformasyon modelinin PDB dosyası yüklenerek ProteinPrepWizard [110] programı ile proteine hidrojen eklemesi yapılmış ve pH 7,0'da protonasyon belirlenerek minimize edilmiştir. Yanaştırma analizlerinde uygulanan bütün aşamalarda OPLS3 forcefield kullanılmıştır [111]. Belirlenen kumarin türevleri ligand olarak Maestro'ya yüklenerek LigPrep programı (Schrödinger Release 2017-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) ile hazırlanmıştır. Bu aşamada ligandlar OPLS3 forcefield ile minimize edilerek 3 boyutlu konformasyonları belirlenmiştir. Receptor Grid Generation programı ile enzim üzerinde yanaştırma yapılacak her bir bölgenin 3 boyutlu x-y-z koordinatları ve hacmi belirlenerek Gridfile dosyası hazırlanmıştır. Daha sonra Glide docking programı [80], [112], [113] ile XP-ligand Flexible seçeneği kullanılarak yanaştırma yapılmış ve denklem 2. 4'e göre XP-Gscore belirlenmiştir [113].

$$XP \text{ GlideScore} = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bind} + E_{penalty} \quad (2.4)$$

$$E_{bind} = E_{hyd_enclosure} + E_{hb_nn_motif} + E_{hb_cc_motif} + E_{PI} + E_{hb_pair} + E_{phobic_pair} \quad (2.5)$$

$$E_{penalty} = E_{desolv} + E_{ligand_strain} \quad (2.6)$$

Denklem 2. 4'te verilen E_{coul} Coulomb enerjisini, E_{vdW} Van der Waals enerjisini temsil etmektedir. Denklem 2. 5'teki $E_{hyd_enclosure}$ hidrofobik çevreleme, $E_{hb_nn_motif}$ özel nötr-nötr hidrojen-bağ motif, $E_{hb_cc_motif}$ özel yüklü-yüklü hidrojen-bağ motif, E_{PI} pi istifleme ve pi-kasyon etkileşimlerinin, E_{hb_pair} çift hidrojen bağı, E_{phobic_pair} çift lipofilik enerjilerini ifade etmektedir. Denklem 2. 6'da verilen E_{desolv} ve E_{ligand_strain} ise sırasıyla çözücü etkisini ve ligand gerilme enerjilerini temsil etmektedir [80], [113].

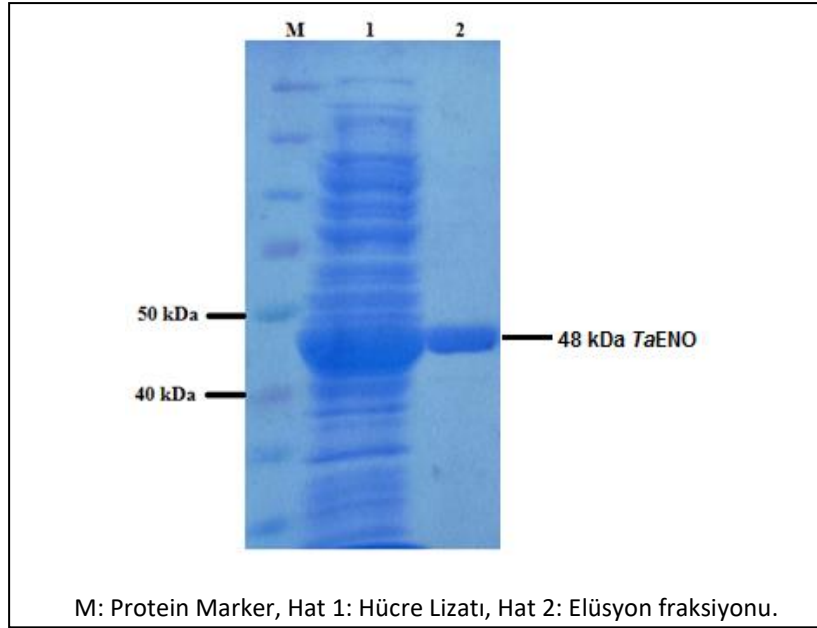
Yanaştırma sonrasında Prime-MMGBSA (Prime ver4.7, [114], [115]) programı ile reseptör-ligand (enzim-kumarin) arasındaki ΔG bağlanma enerjisi [116] hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 *T. annulata* Enolazının Ekspresyonu ve Saflaştırılması

T. annulata enolazının ekspresyonu IPTG indüklemesi ile 6 saat boyunca hücre kültürü yapılarak gerçekleştirilmiştir. IPTG; *lac* operonu ile düzenlenen genlerin ekspresyonunda indüklemeye rol almaktadır. Bu bileşik, *lac* operonunu engelleyen represör molekülüne bağlanır ve böylece gen bölgesine ekspresyon için gerekli enzimin bağlanmasını sağlamaktadır. *lac* operonu ile düzenlenen genlerin transkripsiyonu ve translasyonu IPTG eklenmesi ile bu şekilde tetiklenmektedir [117].

TaENO'nun ekspresyonu sonrasında saflaştırılması Ni-NTA agaroz kolon dolgu maddesi kullanarak afinite kromatografisi ile yapılmıştır. Bu kromatografi yönteminde *TaENO*'nun C-terminal bölgesinde yer alan 6xHis-tag, kolon dolgu maddesinde yer alan nikel iyonu ile etkileşime girmektedir. Kolon dolgu maddesine tutunan enzimin elimine edilmesi elüsyon tamponunda bulunan yüksek konsantrasyondaki imidazol ile sağlanmaktadır. Elüsyon aşamasında imidazolun nikel iyonu ile etkileşiminin artmasıyla serbest kalan enzim saf olarak elde edilmektedir [118]. Saflaştırma sonrası yapılan SDS-PAGE jel elektroforezi analizlerinde Cayir vd. tarafından belirtilen yaklaşık 48 kDa [86] molekül ağırlığındaki *TaENO*'nun % 95 üzeri saflıkta elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 3. 1). Yapılan çalışmada gerçekleştirilen her spesifik analizde *TaENO*'nun ekspresyonu, saflaştırılması tekrarlanmıştır ve saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel elektroforezi yapılarak enzim saflığı kontrol edilmiştir.



Şekil 3. 1 *Ta*ENO'nun saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.

3.2 *T. annulata* Enolazının Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi

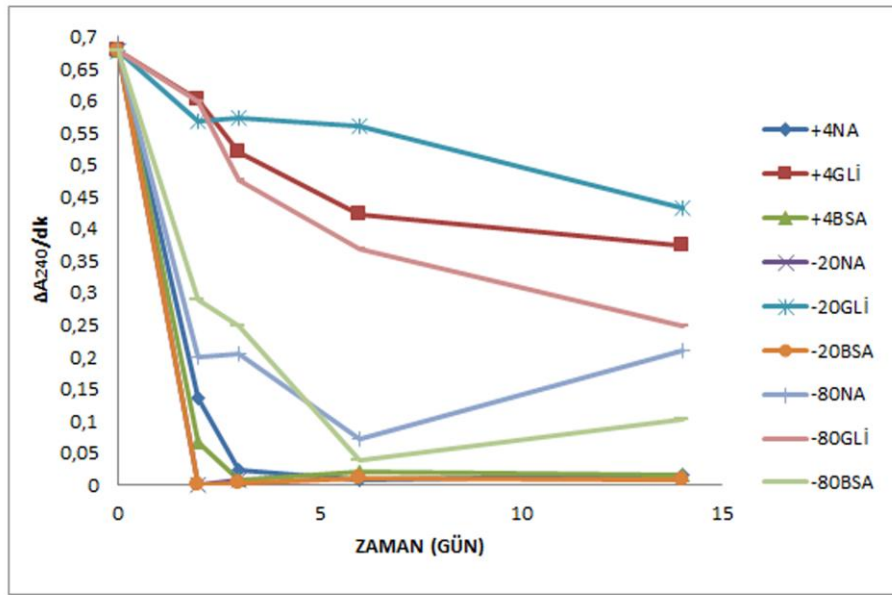
3.2.1 Gliserol ve BSA Kullanılarak Yapılan Stabilizasyon Çalışması ile *Ta*ENO'nun Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi

Stabilizatör olarak gliserol, amfifilik ara yüz oluşturma özelliği sayesinde proteinlerin hidrofobik yüzey bölgelerinin tercihli etkileşim yoluyla oluşan ara maddelerinin stabilizasyonunu sağlaması ve proteinlerin yanlış katlanmasını önlemesi ile protein agregasyonunu engeller [119]. BSA'nın da 1995 yılında yapılan bir çalışmada enzim ile hidrofobik etkileşimler yaparak stabilizasyonu sağladığı belirlenmiştir [88]. Bu özellikler nedeniyle *Ta*ENO'nun stabilizasyonu için yapılan ilk analizde gliserol ve BSA kullanılmıştır.

*Ta*ENO'nun saflaştırılması sonrasında alınan elüsyonlar birleştirilmiş ve filtrelenmiştir. Filtre ile sterilize edilen enzim ile 1,5 mM MgCl₂ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tamponunda 1 mM 2-PG kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda $\Delta A_{240}/dk$ değeri 0,679 bulunarak aktivite ölçümünde sıfır noktası belirlenmiştir. 2., 3., 6. ve 14. günün sonunda yapılan aktivite ölçümleri ile belirlenen değerler Çizelge 3. 1'de verilmiş ve bu ölçümler sonucunda Şekil 3. 2'deki grafik elde edilmiştir.

Çizelge 3. 1 2., 3., 6. ve 14. günün sonunda yapılan enzim aktivite ölçümleri

	Zaman (Gün)	0	2	3	6	14
$\Delta A_{240}/dk$	+4°C'de <i>Ta</i> ENO	0,679	0,135	0,022	0,009	0,015
	+4°C'de gliserol ekli <i>Ta</i> ENO	0,679	0,602	0,519	0,422	0,373
	+4°C'de BSA ekli <i>Ta</i> ENO	0,679	0,066	0,008	0,021	0,016
	-20 °C'de <i>Ta</i> ENO	0,679	0	0,008	0,014	0
	-20 °C'de gliserol ekli <i>Ta</i> ENO	0,679	0,569	0,572	0,561	0,433
	-20 °C'de BSA ekli <i>Ta</i> ENO	0,679	0	0,004	0,011	0,009
	-80 °C'de <i>Ta</i> ENO	0,679	0,2	0,206	0,071	0,21
	-80 °C'de gliserol ekli <i>Ta</i> ENO	0,679	0,598	0,476	0,368	0,247
	-80 °C'de BSA ekli <i>Ta</i> ENO	0,679	0,289	0,249	0,039	0,103



Şekil 3. 2 2., 3., 6. ve 14. günün sonunda yapılan enzim aktivite ölçüm sonuçları. NA: Stabilizatör eklenmeyen enzim çözeltisi, GLİ: Gliserol ekli enzim çözeltisi, BSA: Sığır serum albümin ekli enzim çözeltisi.

Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen değerler incelendiğinde 6. günde -80 °C'den alınan enzim aktivite ölçümlerinde bazı sapmalar olduğu görülmektedir. Bu durumun ölçüm sırasında yapılan pipetleme hatalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde, zaman içerisinde enzim aktivitesinin korunduğu en iyi koşulların -20 °C'de % 10 gliserol eklenmesi ile elde edildiği görülmektedir.

3.2.2 Gliserol ve BSA'dan Farklı Stabilizatörler Kullanılarak Yapılan Stabilizasyon Çalışması ile *Ta*ENO'nun Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi

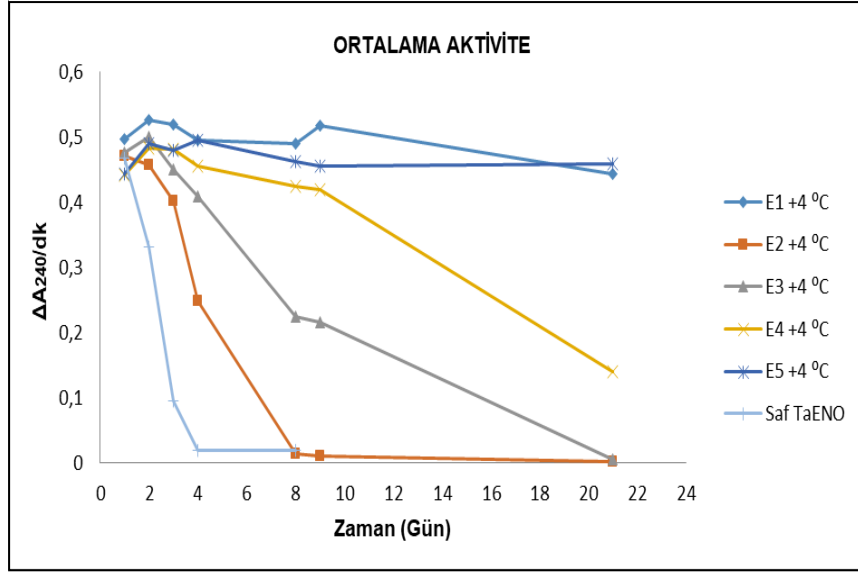
T. annulata enolazının önceki çalışmalarda belirlenen saklama koşulları (% 10 gliserol eklenmiş olarak -20 °C'de saklanması) gün içerisinde tek bir zaman zarfında yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. *Ta*ENO'nun üzerinde inhibitör etkinliğinin ön deneylerinin yapılması sırasında gün içerisinde çoklu denemeler ile analiz yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda enzimin -20 °C'den çıkarılarak +4 °C'de bekletilmesi ile zamanla reaksiyonların tekrarlanması sonrasında enzim aktivitesinin arttığı ve bu değişimin IC₅₀ değerlerinde de artışa neden olduğu görülmüştür. Bu durum, *Ta*ENO'nun dondurulduktan sonra çözülerek gün içerisinde +4 °C'de uzun süre bekletilmesi sonucunda stabil kalmadığını göstermiştir. Belirlenen koşullarda ortaya çıkan bu sonuca göre enzim stabilizasyonu analizleri farklı stabilizatörler kullanılarak tekrarlanmıştır. Kullanılan stabilizatörler; EDTA (etilendiamintetraasetik asit), DTT (ditiotreitol), gliserol, etilen glikol ve sükrozdur. Enzim stabilizasyonu için bu stabilizatörler farklı konsantrasyonlarda tek başlarına veya farklı kombinasyonları oluşturularak saflaştırılan enzim çözeltisine eklenmiştir.

Kullanılan stabilizatörler incelendiğinde; EDTA'nın, Ca⁺² ve Fe⁺³ gibi metal iyonları ile kompleks oluşturarak enzimdeki -SH gruplarının metaller tarafından oksidasyonunu engelleyerek stabilizasyonu sağladığı bilinmektedir [120]. DTT proteinlerin sistein amino asitleri arasında meydana gelen disülfid bağlarının oluşmasını engeller [120], [121]. Etilen glikol çeşitli biyomalzemelerin düşük sıcaklıklarda uzun süreli korunması ve sıfırın altındaki fraksiyonları için kriyoprotektan olarak kullanılmaktadırlar [122]. Sükroz ise, çözücü sistem içerisindeki suya ilave edildiği zaman çözücü kohezyon kuvvetinin artışıyla protein stabilizasyonunu sağlamaktadır [123]. EDTA'nın metal iyonları ile kompleks oluşturma özelliği bulunmaktadır ve Mg⁺² iyonuna bağlı olan enzimatik reaksiyonlarda enzimi inaktive ettiği de görülmüştür [120], [124]. Bu nedenle stabilizasyon analizlerinde EDTA eklenmeden DTT ve gliserolün ekli olduğu enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrıca, önceki çalışmada görülen gliserol etkisinin tekrar görülebilme ihtimaline karşı sadece DTT'nin eklendiği bir enzim çözeltisi de hazırlanmıştır.

İnhibisyon analizlerinin ön deneyleri sırasında, enzimin dondurulup çözülmesi ve çözülerek kullanılan enzimin gün içerisinde aktivitesinin değişmesi sonucunda tekrar yapılan enzim stabilizasyonu analizlerinde +4 °C’de enzim aktivitesinin stabil kalabilmesi ayrı bir önem taşımaktadır. Bu sayede aynı gün içerisinde ve devam eden günlerde enzimin dondurulmadan aktivitesinin sabit kalması sağlanarak % inhibisyon değerlerinde birbirine eşdeğer sonuçlar alınabilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, Çizelge 3. 2’de verilen ortalama aktivite değerlerine göre oluşturulan grafikte (Şekil 3. 3) görüldüğü gibi hiçbir stabilizatör eklenmeden saf halde +4 °C’de saklanan *Ta*ENO’nun takip eden günlerde aktivitesinin azaldığı ve 4. günde aktivitesinin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. +4 °C’de en iyi stabilizasyon koşulları, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1,36 M gliserol eklenmesi ile hazırlanan E1 çözeltisinin ve 6 M etilen glikol eklenmesi ile hazırlanan E5 çözeltisinin enzim aktivite sonuçlarında görülmektedir. 20. günün sonunda dahi bu enzim çözeltileri ile yapılan ölçümler sonucunda 1. gündeki enzim aktivite değerlerine yakın değerler gözlenmiştir. 1 M süktroz eklenmesi ile hazırlanan E4 çözeltisi ile 9 gün boyunca düşük miktardaki aktivite düşüşleri ile belli oranda stabilizasyon sağlanabilmiş ancak 20. günün sonunda aktivitede belirgin bir düşüş gözlenmiştir. 10 mM DTT, 1,36 M gliserol eklenmesi ile hazırlanan E2 ve 10 mM DTT eklenmesi ile hazırlanan E3 çözeltisi ile yapılan ölçümlerde 2. günden itibaren enzim aktivite değerlerinde düşüş gözlenmiş ve 20. günün sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmüştür (Şekil 3. 3).

Çizelge 3. 2 +4 °C’de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri

	Zaman (Gün)	1	2	3	4	8	9	21
$\Delta A_{240}/dk$	E1 +4 °C	0,497	0,527	0,520	0,495	0,491	0,518	0,444
	E2 +4 °C	0,472	0,457	0,401	0,249	0,015	0,011	0,002
	E3 +4 °C	0,477	0,501	0,450	0,409	0,224	0,216	0,005
	E4 +4 °C	0,442	0,483	0,482	0,456	0,424	0,419	0,139
	E5 +4 °C	0,444	0,490	0,480	0,495	0,463	0,456	0,459
	Saf <i>Ta</i> ENO	0,468	0,332	0,096	0,019	0,020		

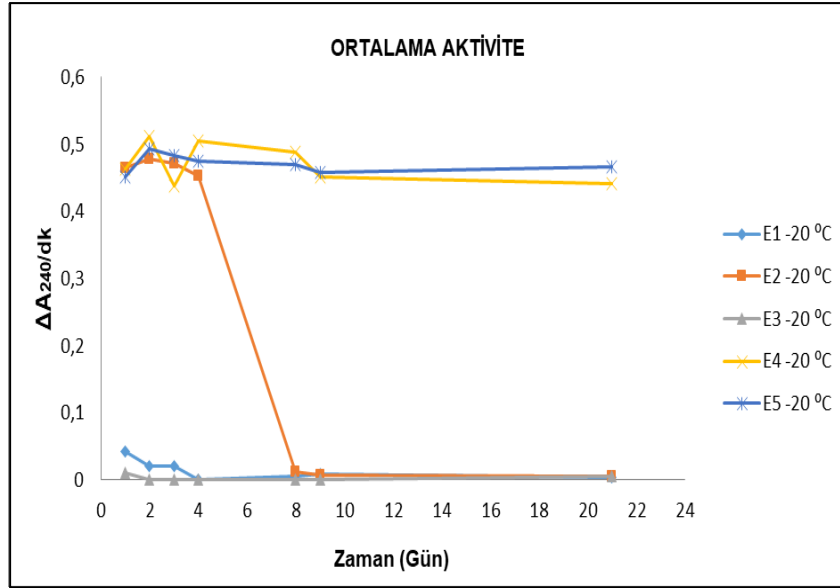


Şekil 3. 3 +4 °C’de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri grafiği. Kullanılan stabilizatörler; E1: 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1,36 M gliserol, E2: 10 mM DTT, 1,36 M gliserol, E3: 10 mM DTT, E4: 1 M Sükroz, E5: 6 M Etilen Glikol

-20 °C’deki saklama koşullarında, Çizelge 3. 3’te verilen enzim aktivite değerlerine göre oluşturulan grafikte de görüldüğü gibi en iyi stabilizasyon, 1 M sükroz eklenmesi ile hazırlanan E4 çözeltisinin ve 6 M etilen glikol eklenmesi ile hazırlanan E5 çözeltisinin enzim aktivite sonuçlarında görülmektedir. 20. günün sonunda dahi bu enzim çözeltileri ile yapılan ölçümler sonucunda 1. gündeki enzim aktivite değerlerine yakın değerler gözlenmiştir. 10 mM DTT, 1,36 M gliserol eklenmesi ile hazırlanan E2 çözeltisi ile yapılan ölçümlerde enzim aktivitesinin 4. güne kadar stabil kaldığı ancak 8. günde aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmektedir. 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1,36 M gliserol eklenmesi ile hazırlanan E1 ve 10 mM DTT eklenmesi ile hazırlanan E3 çözeltisi ile yapılan ölçümlerde 1. günde enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğu görülmüştür (Şekil 3. 4).

Çizelge 3. 3 -20 °C’de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri

	Zaman (Gün)	1	2	3	4	8	9	21
$\Delta A_{240}/dk$	E1 -20 °C	0,042	0,021	0,020	0,001	0,005	0,009	0,003
	E2 -20 °C	0,465	0,478	0,471	0,453	0,012	0,007	0,006
	E3 -20 °C	0,010	0,001	0,001	0,001	0,001	0,0001	0,005
	E4 -20 °C	0,463	0,512	0,438	0,505	0,489	0,452	0,442
	E5 -20 °C	0,451	0,493	0,483	0,475	0,470	0,458	0,466

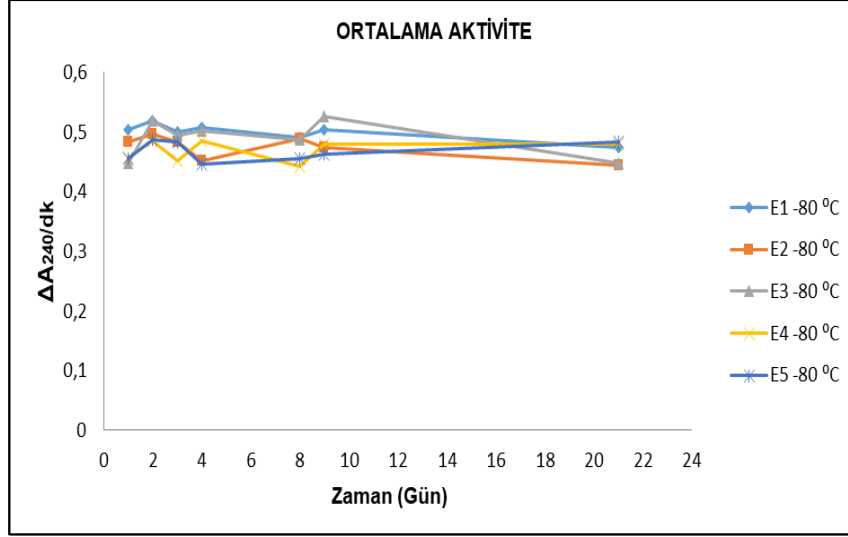


Şekil 3. 4 -20 °C’de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri grafiği. Kullanılan stabilizatörler; E1: 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1,36 M gliserol, E2: 10 mM DTT, 1,36 M gliserol, E3: 10 mM DTT, E4: 1 M Sükroz, E5: 6 M Etilen Glikol

-80 °C’deki saklama koşullarında, Çizelge 3. 4’te verilen enzim aktivite değerlerine göre oluşturulan grafikte de görüldüğü gibi hazırlanan tüm enzim çözeltileri ile yapılan ölçümlerde 20. günün sonunda 1. gündeki enzim aktivite değerlerine benzer değerler gözlenmiştir. Böylece, bu sıcaklıkta hazırlanan tüm enzim çözeltileri ile stabilizasyonun sağlandığı görülmektedir (Şekil 3. 5).

Çizelge 3. 4 -80 °C’de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri

	Zaman (Gün)	1	2	3	4	8	9	21
$\Delta A_{240}/dk$	E1 -80 °C	0,503	0,519	0,500	0,508	0,490	0,503	0,473
	E2 -80 °C	0,483	0,496	0,482	0,452	0,488	0,474	0,444
	E3 -80 °C	0,448	0,518	0,494	0,502	0,487	0,527	0,448
	E4 -80 °C	0,457	0,484	0,451	0,484	0,441	0,480	0,479
	E5 -80 °C	0,454	0,487	0,483	0,446	0,456	0,463	0,484

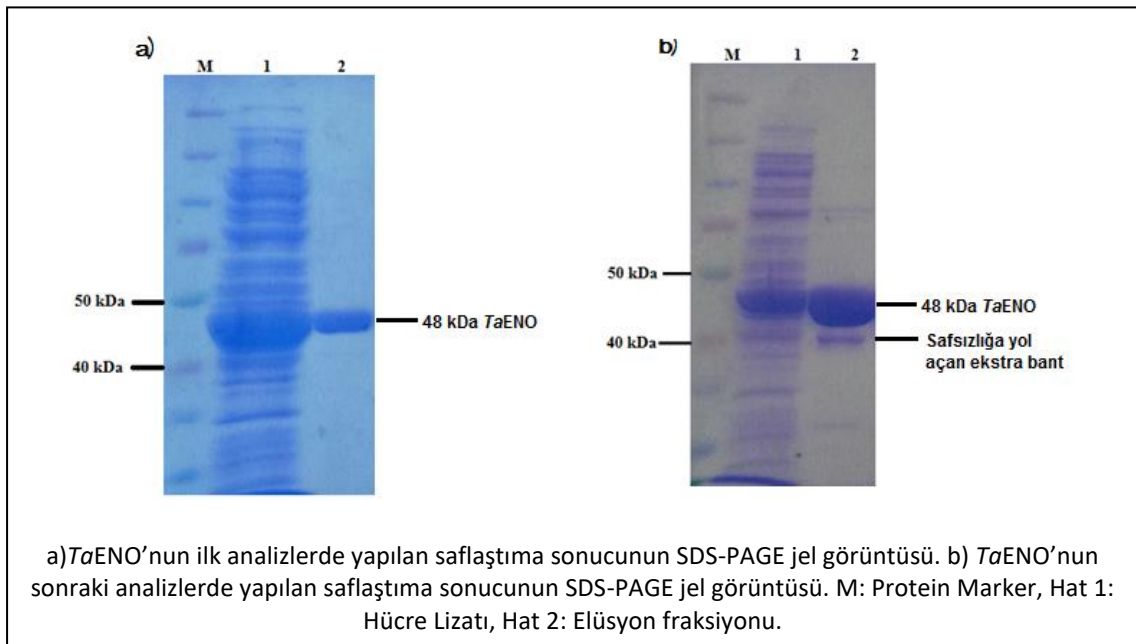


Şekil 3. 5 -80 °C’de saklanan enzim çözeltilerinin belirli günlerde ölçülen ortalama enzim aktivite değerleri grafiği. Kullanılan stabilizatörler; E1: 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1,36 M gliserol, E2: 10 mM DTT, 1,36 M gliserol, E3: 10 mM DTT, E4: 1 M Sükroz, E5: 6 M Etilen Glikol

Bütün enzim stabilizasyon analizlerinin sonuçları özetlenecek olur ise; +4 °C’de hazırlanan E1 ve E5 çözeltilerinin; -20 °C’de hazırlanan E4 ve E5 çözeltilerinin; -80 °C’de ise hazırlanan tüm enzim çözeltilerinin enzim aktivite değerlerinin stabil kaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar her bir çözeltinin tek bir zaman zarfında 2 tekrarlı ölçümler yapılması ile elde edilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında, -20 °C ve -80 °C saklanan enzimin dondurulup çözülmesinin (etilen glikol ile muamele edilen enzim -20 °C donmamaktadır) ardından gün içerisinde aktivitesinin ne derece değiştiği bilinmemektedir. Ayrıca, E1 çözeltisinde stabilizatör olarak EDTA’nın bulunması daha önce belirtilen Mg^{+2} iyonu ile bağlanma özelliği nedeniyle [120], [124] enzim inhibisyon çalışmalarını etkileyebileceği öngörülmektedir. Ek olarak; 6 M etilen glikol ile hazırlanan E5 çözeltisi ile tüm saklama sıcaklıklarında yapılan ölçümlerde benzer ortalama aktivite sonuçları gözlenmiş ve 20 gün boyunca enzim stabilizasyonu sağlanmıştır. Sonuç olarak; belirtilen gerekçeler doğrultusunda gün içerisinde de enzim stabilizasyonunu sağlamak üzere en uygun saklama koşulunun enzim çözeltisinin dondurulmadan 6 M etilen glikol ile hazırlanarak +4 °C’de saklanması ile sağlanabileceği belirlenmiştir.

3.3 *T. annulata* Enolazının Saflaştırma Optimizasyonunun Yapılması ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi Analizinin Yapılması

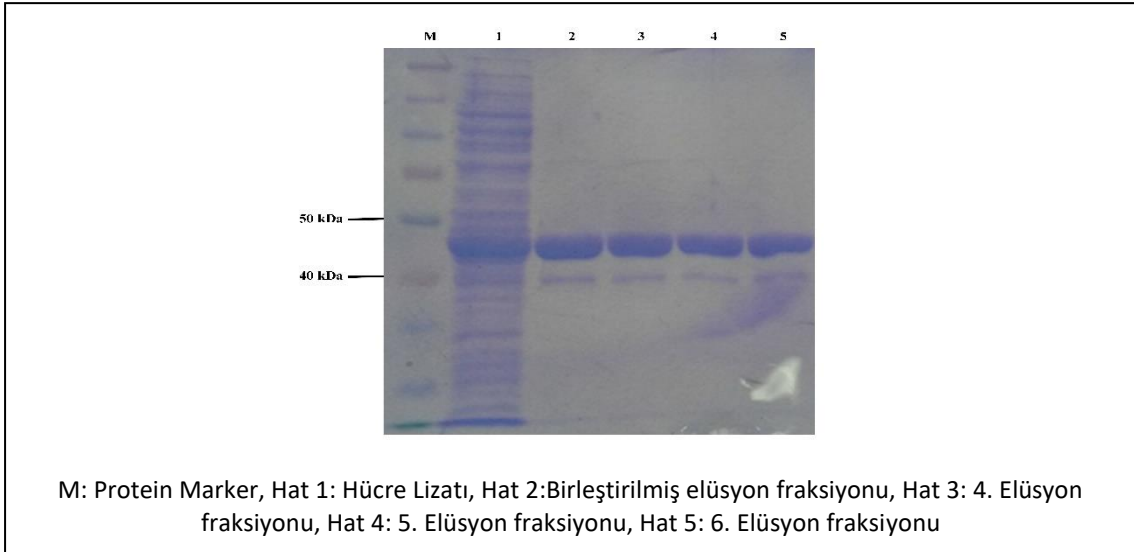
İleri inhibisyon analizlerine geçildiğinde Ni-NTA agaroz kolonu kullanılarak yapılan saflaştırmalar sonucunda SDS-PAGE jelinde Şekil 3. 6'da görüldüğü gibi sebebi tespit edilemeyen bir şekilde *Ta*ENO'nun molekül ağırlığından (yaklaşık 48 kDa) daha düşük bir molekül ağırlığında ek bir bant gözlenmiştir. Saflaştırma sonrasında standart olarak gözlemlenen bu ek protein bandının *Ta*ENO'nun 6xHis-tag içeren kısa kesik bir formu (truncated form) olduğu ya da istenmeyen bir ekspresyona bağlı görülen ekstra bir bant olduğu ön görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda saflaştırma protokolünün optimize edilmesi için çeşitli uygulamalar gerçekleştirilmiştir. *Ta*ENO hücre lizatında süpernatantta çözünür halde bulunduğu için, doğal koşullarda uygulanan protokol ile saflaştırma yapılmış ve belirlenen koşullar değiştirilmiştir. Her bir çalışma için yapılan saflaştırma sonucunda enzim örneklerinin SDS-PAGE analizi yapılmıştır.



Şekil 3. 6 *Ta*ENO'nun saflaştırma sonucunun değişiminin gösterilmesi.

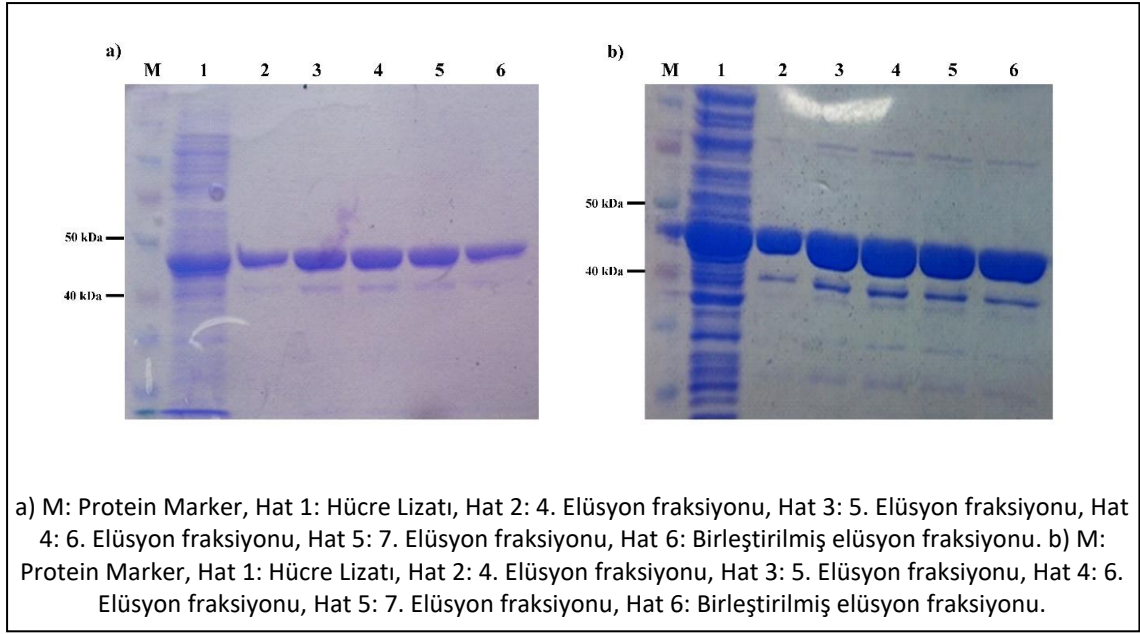
Şekil 3. 7'deki jel görüntüsünde sadece çift kurutma kağıdı kullanılarak yapılan standart saflaştırma sonucunda elde edilen hücre lizatı ve elüsyon örnekleri ile yapılan SDS-PAGE analizi sunulmuştur. Bu uygulamada çift kurutma kağıdı protein eliminasyonunu arttırmak için kullanılmıştır. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen tüm

elüsyon fraksiyonlarında safsızlığa neden olan standart ekstra bant gözlenmiştir. Bu nedenle saflaştırma solüsyonlarının tuz konsantrasyonu değiştirilerek optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.



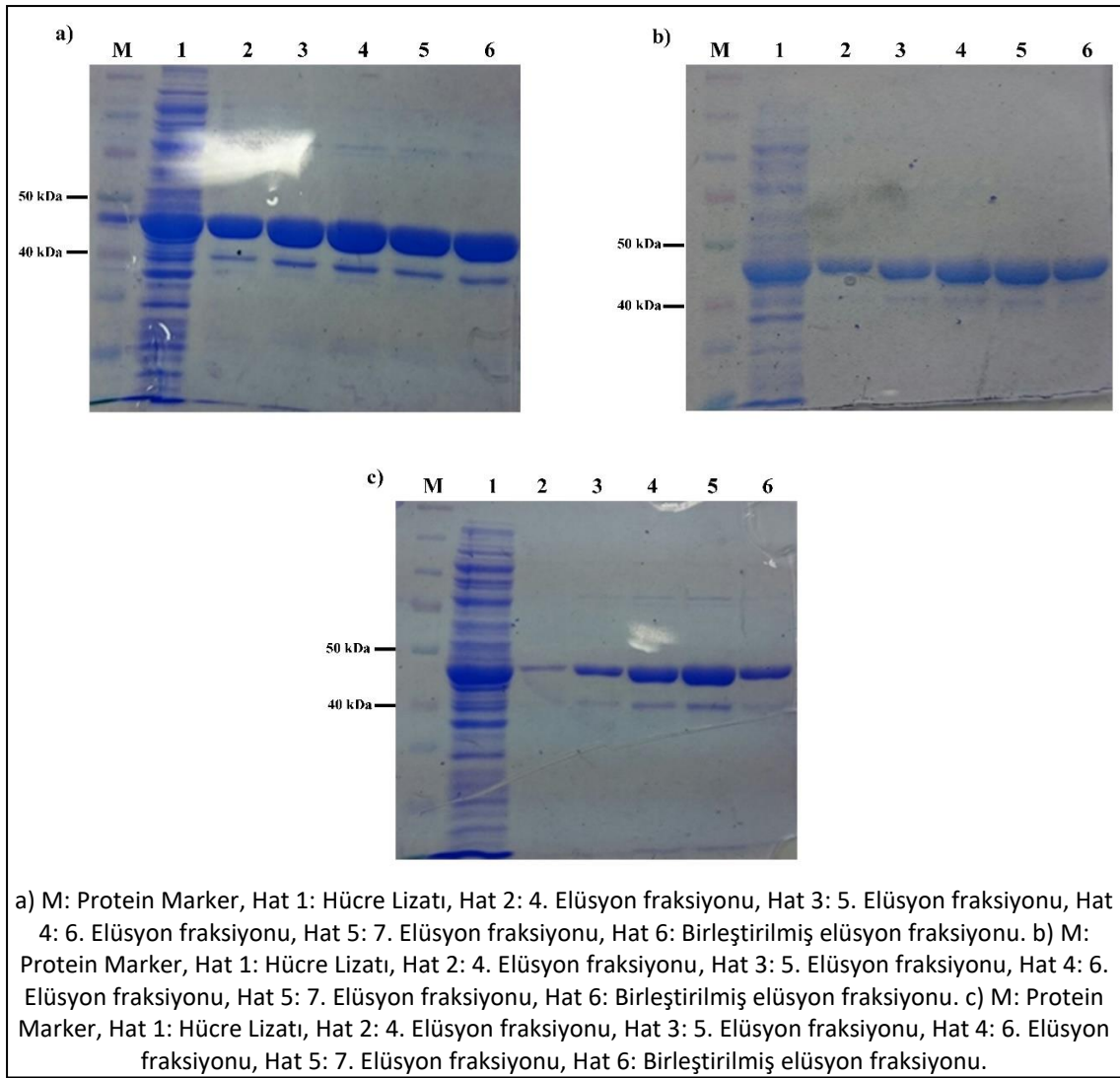
Şekil 3. 7 Çift kurutma kağıdı ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.

Şekil 3. 8a'daki jel görüntüsünde 600 mM NaCl kullanılarak ve Şekil 3. 8b'deki jel görüntüsünde ise 1000 mM NaCl kullanılarak yapılan standart saflaştırma sonucunda elde edilen hücre lizatı ve elüsyon örnekleri ile yapılan SDS-PAGE analizi gösterilmiştir. Bu uygulamada farklı tuz konsantrasyonları spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için kullanılmıştır [118]. Şekil 3. 8a'daki jel görüntüsünde görüldüğü gibi tüm elüsyon fraksiyonlarında standart ekstra bant gözlenmiştir. Yapılan SDS-PAGE analizinde hat 2 ve hat 6'da görülen elüsyon fraksiyonlarında ekstra bantın konsantrasyonu düşmüştür, ancak bu durum enzim aktivite analizlerinde safsızlık sorununa yol açabileceğinden optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Şekil 3. 8b'deki jel görüntüsünde görüldüğü gibi protein konsantrasyonu yükselmiştir ancak safsızlığa neden olan ekstra bantlar artmıştır. Bu nedenle saf *Ta*ENO elde etmek için optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 3. 8 Farklı NaCl konsantrasyonları ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.

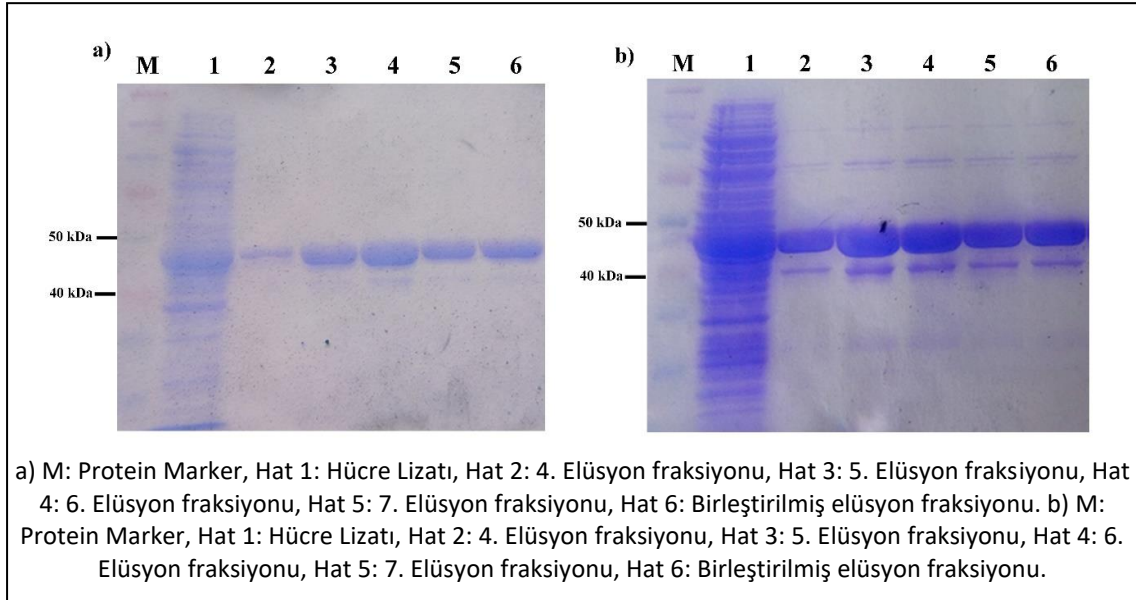
Şekil 3. 9a'daki jel görüntüsünde 700 µl Ni-NTA agaroz kullanılarak, Şekil 3. 9b'deki jel görüntüsünde 1500 µl Ni-NTA agaroz kullanılarak ve Şekil 3. 9c'deki jel görüntüsünde ise 2000 µl Ni-NTA agaroz kullanılarak yapılan standart saflaştırma sonucunda elde edilen hücre lizatı ve elüsyon örnekleri ile yapılan SDS-PAGE analizi sunulmuştur. Bu uygulamada farklı hacimlerdeki Ni-NTA agaroz, spesifik bağlanmayı arttırarak enzimi kontaminantlardan ayırabilmek için kullanılmıştır [118]. Şekil 3. 9a'da görüldüğü gibi yapılan analizde tüm elüsyonlarda protein konsantrasyonu artmasına rağmen safsızlığa neden olan standart ekstra bant bulunmaktadır. Şekil 3. 9b'de yapılan analizde protein konsantrasyonu azalmıştır ve yine tüm elüsyonlarda ekstra bant gözlenmiştir. Özellikle hat 2'de verilen elüsyonda standart ekstra bantın konsantrasyonu azalmıştır, ancak enzim aktivite analizlerinde safsızlık sorunu oluşabileceğinden optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Şekil 3. 9c'de görüldüğü gibi yapılan analizde tüm elüsyonlarda protein konsantrasyonu azalmıştır. Hat 2'deki elüsyon fraksiyonu hariç tüm elüsyonlarda safsızlığa neden olan standart ekstra bant gözlenmiştir. Hat 2'deki elüsyon fraksiyonunda saf *Ta*ENO elde edilmiştir, ancak protein konsantrasyonu enzim inhibisyon analizleri için yeterli olmayacağından optimizasyon analizlerine devam edilmiştir.



Şekil 3. 9 Farklı Ni-NTA agaroz miktarları ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.

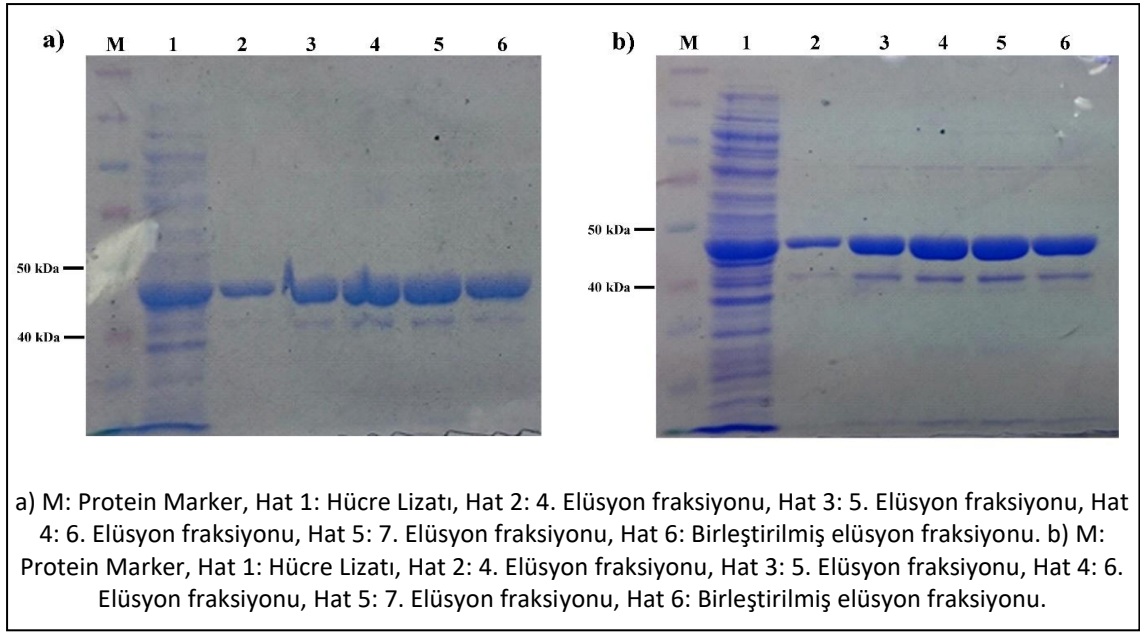
Şekil 3. 10a'daki jel görüntüsünde liziz tamponuna 15 mM 2-Merkaptoetanol eklenerek, Şekil 3. 10b'deki jel görüntüsünde liziz tamponuna % 2 Triton-X eklenerek yapılan standart saflaştırma sonucunda elde edilen hücre lizatı ve elüsyon örnekleri ile yapılan SDS-PAGE analizi gösterilmiştir. Bu uygulamada 2-Merkaptoetanol disülfid bağlarının azaltılması için, Triton-X ise spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için kullanılmıştır [118]. Şekil 3. 10a'da görüldüğü gibi yapılan analizde hat 2'de görülen elüsyon fraksiyonu hariç tüm elüsyonlarda safsızlığa neden olan standart ekstra bant gözlenmiştir. Hat 3, 5 ve 6'daki elüsyon fraksiyonlarında ekstra bantın konsantrasyonu çok düşüktür, ancak enzim aktivite analizlerinde safsızlık sorunu oluşacağından ileriki çalışmalarda kullanılmamıştır. Hat 2'deki elüsyon fraksiyonunda saf *Ta*ENO elde edilmiştir, ancak protein konsantrasyonu enzim inhibisyon analizleri için yeterli

olmayacağından optimizasyon analizlerine devam edilmiştir. Şekil 3. 10b'deki analizde protein konsantrasyonu artmıştır, ancak safsızlığa neden olan ekstra bantlarında olduğu görülmüştür. Bu nedenle farklı bir optimizasyon çalışması ile analizlere devam edilmiştir.



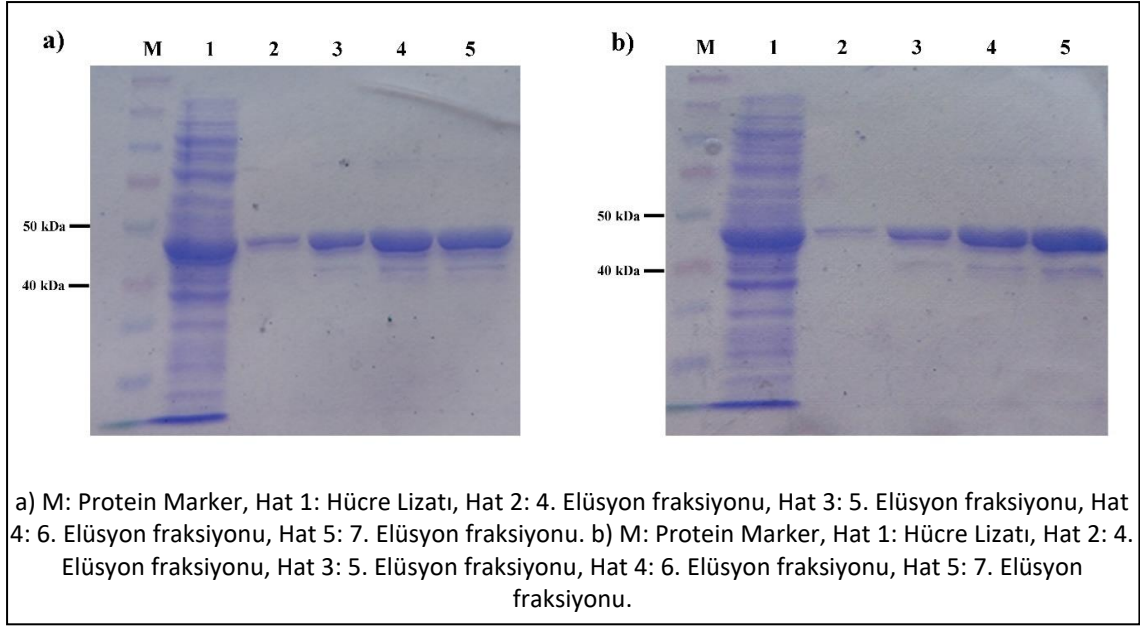
Şekil 3. 10 Liziz tamponuna farklı kimyasal ilaveleri ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.

Şekil 3. 11a'daki jel görüntüsünde yıkama tamponuna % 5 gliserol eklenerek, Şekil 3. 11b'deki jel görüntüsünde yıkama tamponuna % 10 gliserol eklenerek yapılan standart saflaştırma sonucunda elde edilen hücre lizatı ve elüsyon örnekleri ile yapılan SDS-PAGE analizi gösterilmiştir. Bu uygulamada farklı konsantrasyonlardaki gliserol spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için kullanılmıştır [118]. Şekil 3. 11a'daki analizde hat 2'deki elüsyon fraksiyonu hariç tüm elüsyon fraksiyonlarında net bir şekilde safsızlığa neden olan ekstra bant gözlenmiştir. Hat 2'de ise hem protein konsantrasyonunun azalmış olduğu görülmekte hem de çok seyrek de olsa ekstra bant gözlenmektedir. Bu nedenle optimizasyon çalışmalarına devam edilmesine karar verilmiştir. Şekil 3. 11b'de görülen analizde ise tüm elüsyon fraksiyonlarında standart ekstra bant gözlenmiş ve bu nedenle de farklı değişkenler ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 3. 11 Yıkama tamponuna gliserol ilaveleri ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.

Elde edilen SDS-PAGE jel görüntülerinde en iyi sonuç veren üç farklı bileşen iki farklı saflaştırma ile çalışılmıştır. Şekil 3. 12a'daki jel görüntüsünde 1500 µl Ni-NTA agaroz ve 600 mM NaCl ekli tamponlar kullanılarak, Şekil 3. 12b'de 1500 µl Ni-NTA agaroz, 600 mM NaCl ekli tamponlar ve % 5 gliserol ekli yıkama tamponu kullanılarak yapılan standart saflaştırma sonucunda elde edilen hücre lizatı ve elüsyon örnekleri ile yapılan SDS-PAGE analizi sunulmuştur. Şekil 3. 12a ve Şekil 3. 12b'de görülen her iki analizde de hat 2'de bulunan elüsyon fraksiyonları hariç tüm elüsyon fraksiyonlarında standart ekstra bant gözlenmiştir. İki analizde de hat 2'de görüldüğü gibi saf *Ta*ENO elde edilmiştir, ancak protein konsantrasyonu enzim aktivite çalışmalarında kullanılacak derecede yeterli olmadığından optimizasyon analizlerine devam edilmiştir.

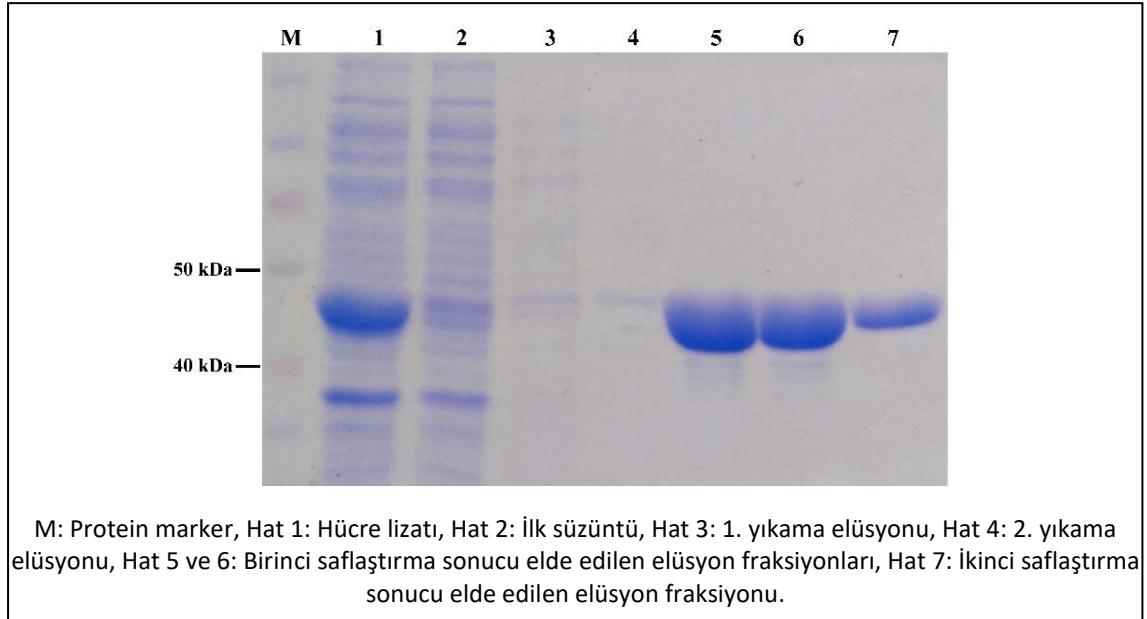


Şekil 3. 12 En iyi sonuç veren bileşenlerin kombinasyonu ile yapılan saflaştırma sonucunun SDS-PAGE jel görüntüsü.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda tüm SDS-PAGE jel görüntülerinde belirgin ekstra bant gözlenmiştir ve ekstra bant gözlenmeyen elüsyon fraksiyonlarında da protein konsantrasyonun düşük olduğu görülmüştür. Bu problemlerin giderilebilmesi için yeni bir saflaştırma protokolü uygulanmıştır.

Yeni saflaştırma protokolü için ticari kobalt yüklü TALON® kolonu ile afinite kromatografisi tercih edilmiştir. Saflaştırma prosesi olarak Ni-NTA agaroz kolonu kullanılarak yapılan afinite kromatografisi ile benzer şekilde uygulanmaktadır. Ancak bu yöntemin tercih edilmesinin nedeni, diğer reçinelerde karşılaşılan metal sızıntısı sorunun üstesinden gelmek için TALON® reçinelerde rekombinant polihistidin bağlı proteinleri (ABD Patenti No. 5.962.641) saflaştırmada özel bir tetradentat metal şelatör kullanılmasıdır. Bu şelatör kobalt gibi metal iyonlarını bağlamak için ideal bir elektronegatif cep olarak elektropozitif metali tutar. Bu proses polihistidin bağlı proteinlerin çevresine metal iyonlarının erişebilmesini sağlayarak TALON® reçineye protein bağlama kapasitesi artırır. Bu özellikleri ile metal afinite kromatografisi ile saflaştırma basamağında uygulanabilir reçineler olmaktadır (Clontech Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada). *T. annulata* enolazının TALON® kolonu ile saflaştırılmasının sonucunda elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 3. 13'te gösterilmiştir. İlk saflaştırma sonucunda hat 5 ve hat 6'da *TaENO*'nun bulunduğu

protein bandının altında seyrek görülen ekstra bantlar ikinci saflaştırma sonucunda giderilmiştir. Hat 7’de görüldüğü gibi *Ta*ENO, % 95 üzeri saflıkta ve enzim aktivite deneyleri için ideal olan konsantrasyonda elde edilmiştir.



Şekil 3. 13 *Ta*ENO’nun TALON® kolonu ile saflaştırılmasının sonucunda elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü.

Elde edilen enzim çözeltisi ile yapılan standart enzim aktivite tayini sonucunda görülen aktivite ($\Delta A_{240}/dk$) değeri 0,426 olarak belirlenmiştir. Böylece TALON® kolonu ile yapılan yeni saflaştırma protokolü ile inhibisyon çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için yüksek konsantrasyonda ve yüksek saflıkta enzim çözeltisi elde edildiği doğrulanmıştır.

3.4 Kumarin Türevlerinin İnhibitör Etkinliğinin *T. annulata* Enolazı Kullanılarak Taranması ve Belirlenen Kumarin Türevlerinin IC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

Kumarin türevlerinin saf olarak elde edilen *Ta*ENO ile taranması aşamasında substrat, enzim ve kumarin konsantrasyonlarının belirlenmesi için reaksiyon optimize edilmiştir. Reaksiyonlarda; 1,5 mM MgCl₂ içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,4) tampon çözeltisi, 2 µl inhibitör (100 µM kumarin) ve 2 µl enzim içeren reaksiyon karışımı 600 devirde 10 dakika inkübe edildikten sonra, son konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde 2-PG eklenmiş ve 240 nm dalga boyunda absorbands ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol olarak, 2 µL kumarin çözeltisi yerine 2 µL DMSO eklenerek absorbands ölçümü gerçekleştirilmiştir. Enzim stabilizasyonu sağlandıktan sonra, inhibitör taramasında belirlenen bir kumarin türevi için IC₅₀ değeri belirlendikten sonra takip eden üç günde

aynı kumarin türevi için inhibisyon ölçümü tekrarlanarak IC₅₀ değeri doğrulanmıştır. Bunun sonucunda analiz edilen tüm günlerde absorbans farkının gün içerisinde stabil kaldığı görülmüştür ve tüm kumarinler için inhibisyon taraması gerçekleştirilmiştir. Bu tarama sonucunda Çizelge 3. 5'te 100 µM kumarin konsantrasyonundaki % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 3. 5 Kumarin türevlerinin 100 µM kumarin konsantrasyonundaki % inhibisyon değerleri

Kumarin Türevleri	% inhibisyon
K1	5,17
K2	11,92
K3	50,91
K4	8,04
K5	97,84
K6	8,46
K7	18,5
K8	98,56
K9	98,21
K10	26,54
K11	9,73
K12	52,36
K13	58,91
K14	34,34
K15	İnhibisyon gözlenmemiştir.
K16	21,7
K17	5,64
K18	9,12
K19	5,93
K20	8,07
K21	99,13
K22	8,43
K23	98,89
K24	9,48
K25	6,17
K26	8,43
K27	3,9
K28	8,44
K29	46,17
A1	İnhibisyon gözlenmemiştir.
A2	11,32

Çizelge 3. 5 Kumarin türevlerinin 100 µM kumarin konsantrasyonundaki % inhibisyon değerleri (Devamı)

Kumarin Türevleri	% inhibisyon
A3	5,52
A4	2,03
A5	İnhibisyon gözlenmemiştir.
A6	9,58
A7	7,11
A8	12,19
A10	47,52

Tabloda verilmiş olan % inhibisyon değerleri incelendiğinde, tarama çalışmasının gerçekleştirildiği 38 bileşikten, 13 kumarin türevinin, 100 µM konsantrasyonda % 25 ve üzerinde aktivite gösterdiği görülmektedir.

3-aril kumarin türevleri incelendiğinde 100 µM konsantrasyonda % 3,9 ve % 98,89 arasında inhibisyon değerlerine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Yapılan incelendiğinde A halkasındaki substitüsyonların kumarin türevinin etkinliğinin belirlenmesindeki etkinin B halkasındaki substitüsyonların etkisine göre daha sınırlı olduğu görülmektedir. Ancak genel olarak A halkasında hidroksil grupları içeren kumarin türevlerinin metoksi grupları içeren kumarin türevlerine göre, metoksi grubu içeren kumarin türevlerinin de asetoksi grubu içeren kumarin türevlerine göre daha etkili olduğu görülmektedir. B halkasındaki substitüsyonlar incelendiğinde ise *p*-hidroksil veya *p*-metoksi gruplarının bulunmasının inhibisyon aktivitesine olumlu yönde katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Asetoksi grupları ve trimetoksi grupları ise incelenen tüm 3-arilkumarin türevleri arasında en düşük aktivitelere sahiptir. Benzer açıklamalar 4-arilkumarin türevleri için de söylenebilir. İncelenen bileşikler arasındaki tek biskumarin türevi olan A10 B halkasında *p*-hidroksil grubu içermektedir ve 100 µM konsantrasyonda % 47,52 gibi iyi sayılabilecek bir inhibisyon değerine sahiptir.

Kaynaşmış benzen halkası içeren kumarin türevlerinin (A1-A8) inhibisyon değerleri % 0- % 12,19 aralığındadır. Bu kumarin türevlerinin diğer kumarin türevlerine göre yapısal olarak farklılıkları kumarin A halkasında kaynaşmış olarak benzen grubu içermeleridir. Bu nedenle çalışılan diğer kumarinlere göre daha büyük yapıya sahiptirler. Bunun yanı sıra içerdikleri yan grupların hidrofobik özelliklerinden dolayı sulu çözeltilerdeki

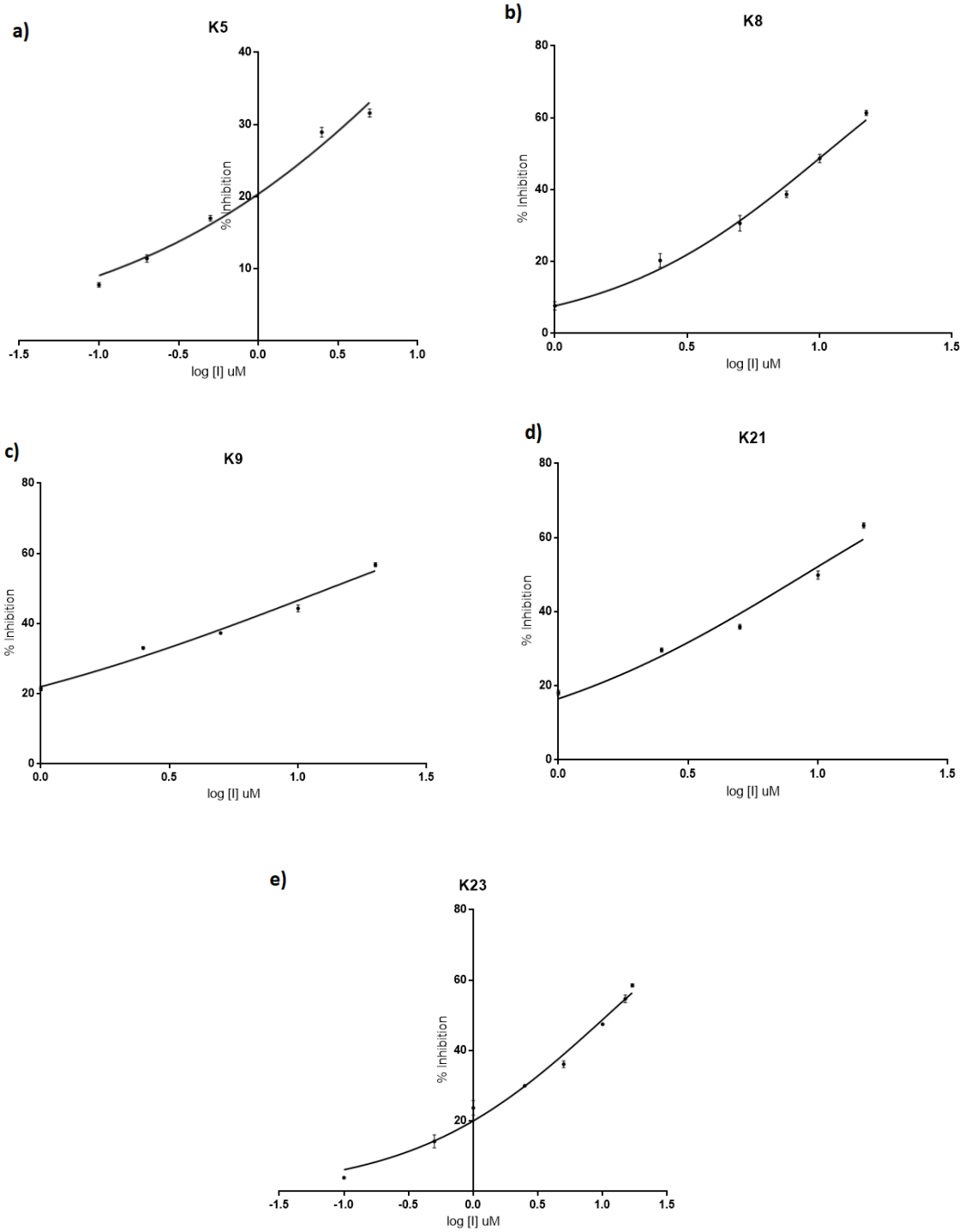
çözünürlükleri düşüktür. Gösterdikleri düşük inhibisyon değerleri bu faktörler göz önüne alınarak açıklanabilir. B halkasında *p*-metoksi içeren kaynaşmış benzo[g/h]kumarin türevlerinin (A2 ve A8) en yüksek aktiviteyi gösterdikleri görülmektedir (sırasıyla % 11,32 ve % 12,19). Aynı pozisyonda asetoksi yan gruplarına sahip olan A1 ve A4 türevlerinde ise inhibisyon, bu türevler arasında gözlemlenen en düşük değerlere karşılık gelmektedir (sırasıyla % 0 ve % 2,03). Bu değerler 3- ve 4-arilkumarinler için elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir.

100 µM kumarin konsantrasyonundaki yüzde inhibisyon değerlerine göre %90 ve üzeri inhibisyonun gözlemlendiği 5 farklı kumarin türevi IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için seçilmiştir. Seçilen bu kumarin türevleri için en az beş farklı kumarin konsantrasyonunda, saflaştırılmış *Ta*ENO ile analiz yapılmıştır. Bu kumarin türevleri için elde edilen % inhibisyon değerleri doğrultusunda IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. *Ta*ENO üzerinde yapılan inhibitör etkinliği taraması sonucunda IC₅₀ değerleri hesaplanan kumarin türevlerinin logaritmik inhibitör konsantrasyonuna (log [I]) karşı % inhibisyon grafikleri Şekil 3. 14'te verilmiştir. Elde edilen grafikler doğrultusunda kumarin türevlerinin *Ta*ENO enzim reaksiyonunun yüzde ellisini inhibe eden konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplanmıştır ve elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 3. 6'da sunulmuştur.

*Ta*ENO üzerinde en yüksek inhibisyon değeri K21 kumarin türevi ile elde edilmiştir ve IC₅₀ değeri 8,871 µM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, K21'e ek olarak K5, K8, K9 ve K23 kumarin türevlerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 27,910; 10,450; 13,170; 10,863 µM olarak belirlenmiştir. Tüm belirlenen IC₅₀ değerleri göz önüne alındığında *Ta*ENO üzerinde yüksek inhibisyona sahip potansiyel inhibitörlerin K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevleri olduğu görülmüştür. Bu bileşikler içerisinde K9, K21, K23 kumarin türevlerinin kimyasal formüllerinin aynı olduğu tek farklılığın aril kumarinlerin A veya B fenil halkalarına hidroksil gruplarının farklı pozisyonlarda bağlanması olduğu görülmektedir. Bu kumarin türevlerinin enzim ile benzer etkileşimler gösterme olasılığı bulunduğundan yaklaşık olarak eşdeğer IC₅₀ değerleri gözlemlenmektedir.

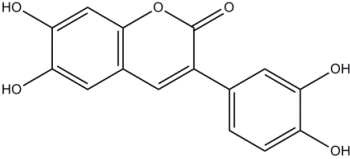
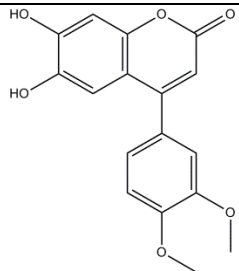
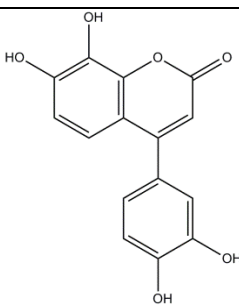
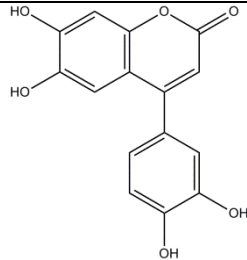
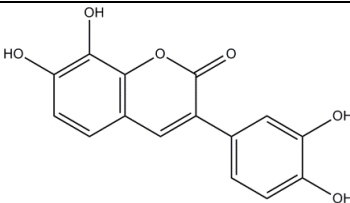
En yüksek etki gösterdiği tespit edilen bu kumarin türevleri incelendiğinde 4-aril kumarin türevlerinin izomerleri olan 3-arilkumarin türevlerine göre az da olsa daha yüksek inhibisyon etkisine sahip oldukları görülmektedir. A-halkası üzerinde 6,7- ve 7,8-

pozisyonlardaki substitüentlerin inhibisyon üzerindeki etkilerinin sınırlı olduğu görülmektedir, ancak özellikle 3-aril kumarin türevleri için 7,8- pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının etkisinin 6,7-pozisyonunda hidroksil grubu içeren türevlere göre daha yüksek olduğu öngörülmektedir.



Şekil 3. 14 K5 (a), K8 (b), K9 (c), K21 (d) ve K23 (e) kumarin türevlerinin logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı reaksiyon sonucunda meydana gelen % inhibisyon grafikleri

Çizelge 3. 6 Kumarin türevlerinin IC₅₀ ve standart sapma değerleri

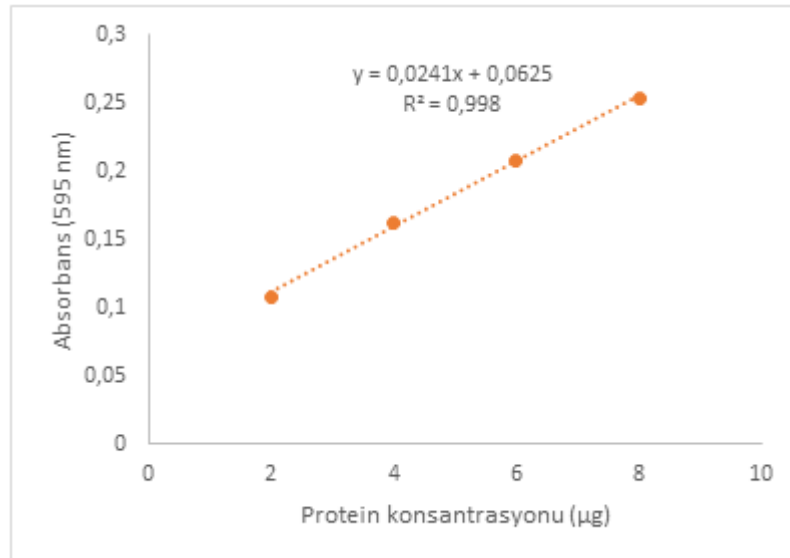
Kumarin Türevleri	IC ₅₀ (μM)	Standart Sapma	Kimyasal Formülü
K5	27,910	± 1,564	 3-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on
K8	10,450	± 0,180	 4-(3,4-dimetoksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on
K9	13,170	± 0,380	 4-(3,4-dihidroksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on
K21	8,871	± 0,164	 4-(3,4-dihidroksifenil)-6,7-dihidroksi-2H-kromen-2-on
K23	10,863	± 0,404	 3-(3,4-dihidroksifenil)-7,8-dihidroksi-2H-kromen-2-on

3.5 *T. annulata* Enolazının Kumarin Türevleri Kullanılarak Enzim İnhibisyon Mekanizmasının Belirlenmesi

3.5.1 Saflaştırılan *T. annulata* Enolazının Kinetik Analizi

Saflaştırma sonucunda elde edilen enzim çözeltisine son konsantrasyonu 6 M olacak şekilde etilen glikol eklenmiş ve standart reaksiyon koşulları uygulanarak ΔA_{240} değeri 0,598 olarak ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin kinetik çalışmalar için uygun olduğu tespit edilmiş ve enzim çözeltisi belirlenen şekilde +4 °C'de saklanmıştır. Kinetik analizler etilen glikol eklendikten sonra *Ta*ENO'nun 1/6 oranında seyreltilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Enzim konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Stok çözeltilerin 595 nm'deki absorpsanları ölçülerek Şekil 3. 15'te verilen Bradford standart eğrisi grafiği çizilmiştir. Bu grafikten elde edilen denkleme göre protein konsantrasyonu 1,068 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplanmıştır. Michaelis-Menten grafiğine göre K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanabilmesi için enzim aktivite reaksiyonları optimize edilmiştir ve enzim çözeltisi 1/6 oranında seyreltilerek reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu koşullara göre 3 μl enzim eklenerek gerçekleştirilen reaksiyonlarda 0,534 μg protein kullanılarak aktivite değerleri belirlenmiştir.



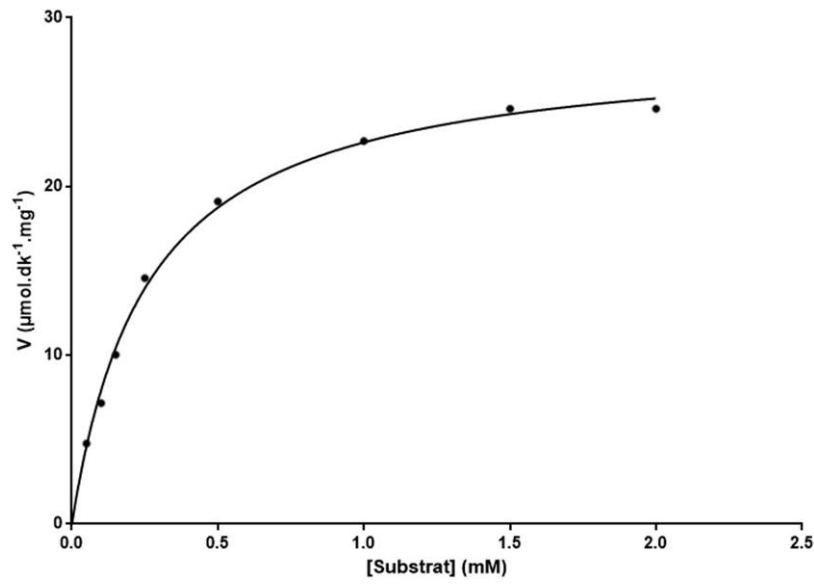
Şekil 3. 15 Bradford standart eğrisi

Enzimin kinetik analizinin yapılması için farklı 2-PG konsantrasyonlarında enzim aktivitesi belirlenmiştir. 50-2000 μM arasında değişen substrat konsantrasyonlarında

yapılan reaksiyonların 240 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır (Çizelge 3. 7). GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Ltd., La Jalla, USA) programı kullanılarak elde edilen veriler ile K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, bu program kullanılarak enzimin kararlı hal kinetik grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3. 16). Tüm absorbans farkı değerleri enzim konsantrasyonu, ϵ_{PEP} ($1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [96] katsayısı baz alınarak spesifik aktivite ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) değerine dönüştürülmüş ve V_{max} değeri hesaplanmıştır.

Çizelge 3. 7 Belirli substrat konsantrasyonlarındaki reaksiyonlar sonucu elde edilen hız değerleri

Substrat (mM)	V ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)
0,05	4,78
0,1	7,17
0,15	10,038
0,25	14,579
0,5	19,12
1	22,705
1,5	24,617
2	24,617



Şekil 3. 16 *Ta*ENO’nun belirlenen koşullarda kararlı hal kinetiği grafiği

Kinetik analiz sonucunda *T. annulata* enolazının K_m , V_{max} değerleri sırasıyla 259,5 μM , 28,5 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

3.5.2 Belirlenen Kumarin Türevleri ile Enzim İnhibisyon Mekanizması

T. annulata enolazının kumarin türevleri ile inhibisyon mekanizmasının belirlenmesi için yüksek inhibisyonun görüldüğü kumarinler ile farklı substrat ve inhibitör konsantrasyonlarında analizler gerçekleştirilmiştir.

K8 kumarin türevi inhibisyon mekanizmasının belirlenmesi için gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen spesifik aktivite değerleri Çizelge 3. 8’de verilmiştir.

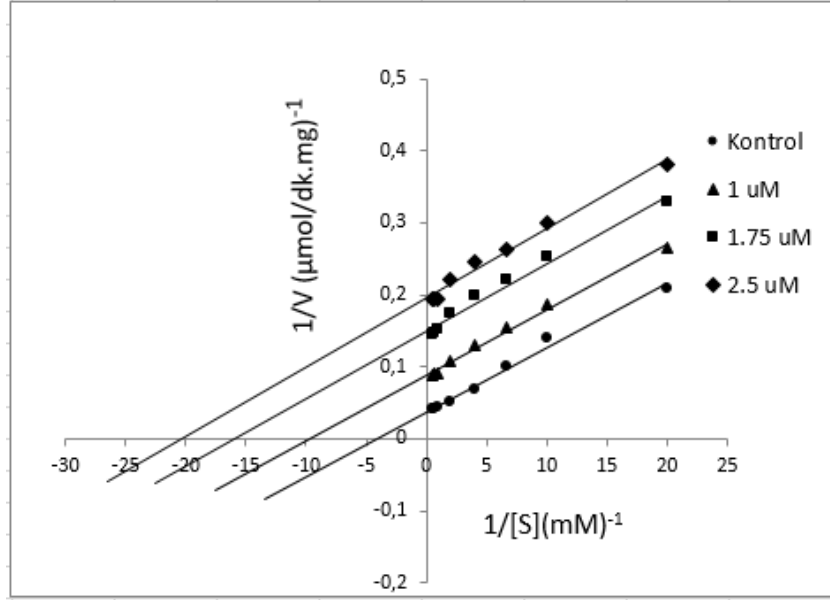
Çizelge 3. 8 K8 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Spesifik aktivite Kontrol ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (1 μM K8 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (1,75 μM K8 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (2,5 μM K8 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)
0,05	4,780	3,776	3,042	2,629
0,1	7,170	5,377	3,962	3,346
0,15	10,038	6,439	4,545	3,800
0,25	14,579	7,648	5,054	4,086
0,5	19,120	9,252	5,756	4,523
1	22,705	10,994	6,554	5,138
1,5	24,617	10,994	6,734	5,138
2	24,617	11,233	6,864	5,138

Belirli konsantrasyonlarda (1, 1,75 ve 2,5 μM) K8 kumarin türevi eklenerek yapılan reaksiyonlar sonucunda elde edilen reaksiyon hız değerlerine göre Lineweaver–Burk grafiği oluşturulmuştur. Şekil 3. 17’de verilen Lineweaver–Burk grafiği analiz edildiğinde *T. annulata* enolazının K8 kumarin türevi için inhibisyon mekanizmasının yarışmasız (uncompetitive) inhibisyon olduğu tespit edilmiştir. Yarışmasız inhibisyon mekanizmasında; inhibitörün, enzim-substrat kompleksine bağlandığı bilinmektedir [17].

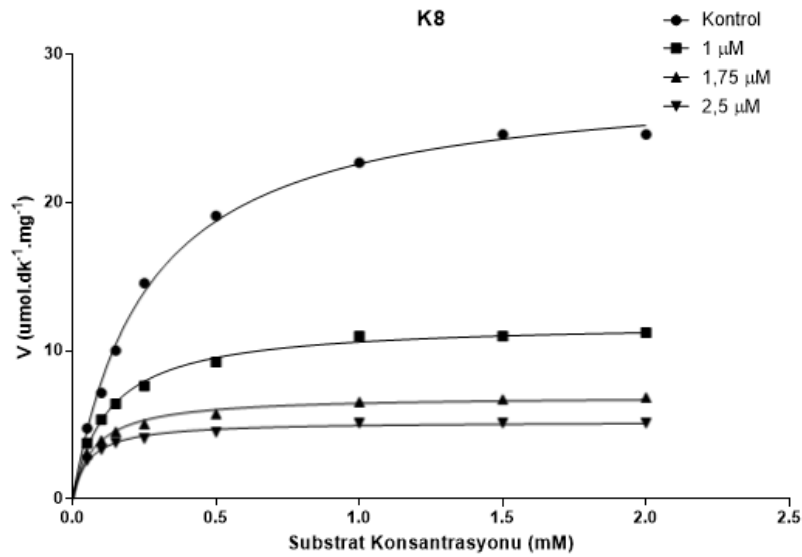
Türkçe literatürde enzim inhibisyonu terimlerinin kullanımı açısından bir kavram kargaşasının yaşandığı görülmektedir. Çeviri editörlüğünü Prof. Dr. Y. Murat Elçin ve ekibinin gerçekleştirdiği Lehninger Biyokimyanın temelleri kitabının 2008 yılında yapılan çevirisinde bu soruna değinilmiş ve daha önceki yayınlarda yarı yarışmalı olarak Türkçeleştirilen “uncompetitive inhibiton” teriminin yarışmasız inhibisyon olarak

Türkçeleştirilmesi önerilmiştir. “Uncompetitive” inhibisyonda inhibitörün substrat ile hiçbir şekilde yarışma haline girmediği görülmektedir. Bu nedenle, yapılan tez çalışmasında söz konusu inhibisyon teriminin yarışmasız inhibisyon olarak kullanılması uygun bulunmuştur [17].



Şekil 3. 17 Üç farklı K8 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği

Reaksiyonlar sonucunda elde edilen spesifik aktivite değerlerine göre Michaelis-Menten grafiği oluşturulmuş ve kinetik parametreler hesaplanmıştır (Şekil 3. 18).



Şekil 3. 18 Üç farklı K8 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği

1 μM konsantrasyondaki K8 kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 125 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 11,93 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, 1,75 μM konsantrasyondaki K8 kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 76,61 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 6,956 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; 2,5 μM konsantrasyondaki K8 kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 56,28 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 5,247 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ olduğu belirlenmiştir. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça K_m ve $V_{\max}$ değerlerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinde de görüldüğü gibi enzim inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda GraphPad Prism 6 programında lineer olmayan regresyon analizi kullanılarak enzim kinetiği denkleminde yarışmasız inhibisyon mekanizmasına göre $\text{Alpha}K_i$ değeri 0,5978 μM olarak belirlenmiştir.

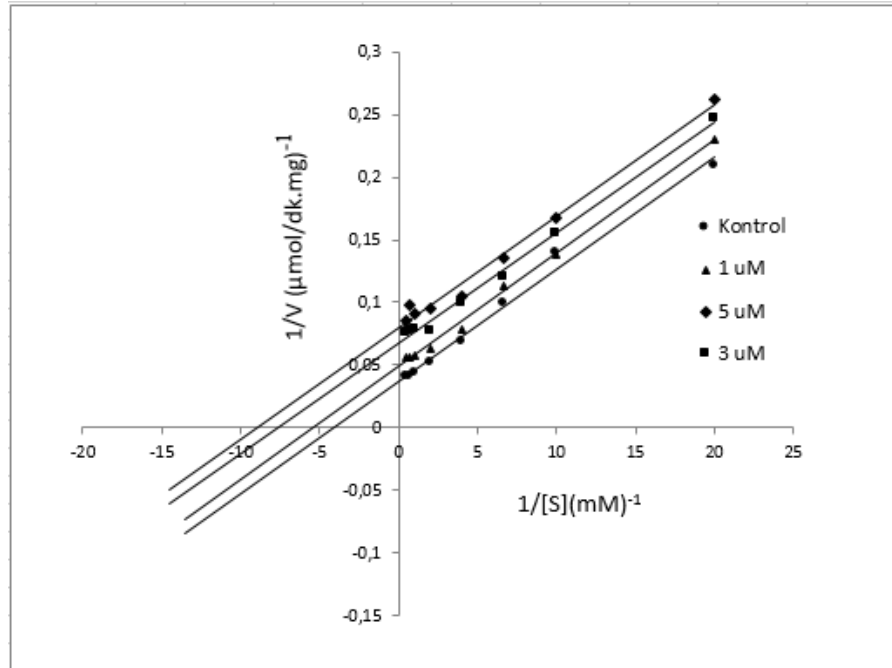
Belirlenen dört kumarin türevinden biri olan K9 kumarin türevi ile enzim inhibisyonunun belirlenmesi için gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen $\Delta A_{240}/\text{dk}$ değerlerine göre hesaplanan spesifik aktivite değerleri Çizelge 3. 9'da sunulmuştur.

Çizelge 3. 9 K9 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Spesifik aktivite Kontrol ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (1 μM K9 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (3 μM K9 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (5 μM K9 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)
0,05	4,780	4,352	4,063	3,824
0,1	7,170	7,216	6,453	5,975
0,15	10,038	8,794	8,365	7,409
0,25	14,579	12,768	10,038	9,560
0,5	19,120	15,991	12,906	10,516
1	22,705	17,258	12,667	10,994
1,5	24,617	17,678	12,906	10,277
2	24,617	17,678	13,145	11,711

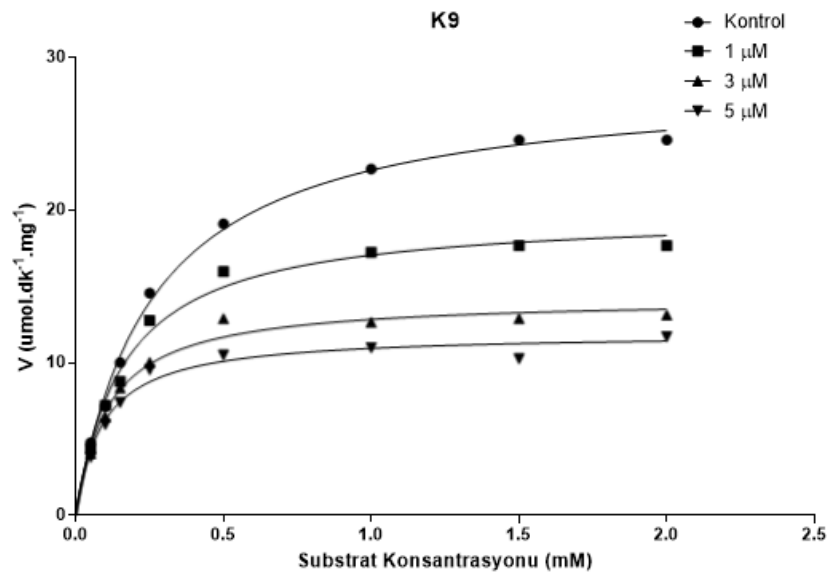
K9 kumarin türevi eklenerek yapılan reaksiyonlar sonucunda elde edilen reaksiyon hız değerlerine göre Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3. 19). Lineweaver-

Burk grafiği analiz edilerek *Ta*ENO'nun K9 kumarin türevi için inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. 19 Üç farklı K9 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği

Reaksiyonlar sonucunda oluşan spesifik aktivite değerlerine göre Michaelis-Menten grafiği oluşturulmuş ve kinetik parametreler hesaplanmıştır (Şekil 3. 20).



Şekil 3. 20 Üç farklı K9 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği

K9 kumarin türevinin 1 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 162,4 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 19,84 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, 3 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 109,2 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 14,25 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; 5 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 90,96, $V_{\max}$ değerinin ise 11,95 olduğu belirlenmiştir. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça K_m ve $V_{\max}$ değerlerinde azalma olduğu tespit edildiği için ve Lineweaver-Burk grafiğinde de görüldüğü gibi enzim inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen hız değerleri ile GraphPad Prism 6 programında lineer olmayan regresyon analizi kullanılarak enzim kinetiği denkleminde yarışmasız inhibisyon mekanizmasına göre $\text{Alpha}K_i$ değeri 3,551 μM olarak belirlenmiştir.

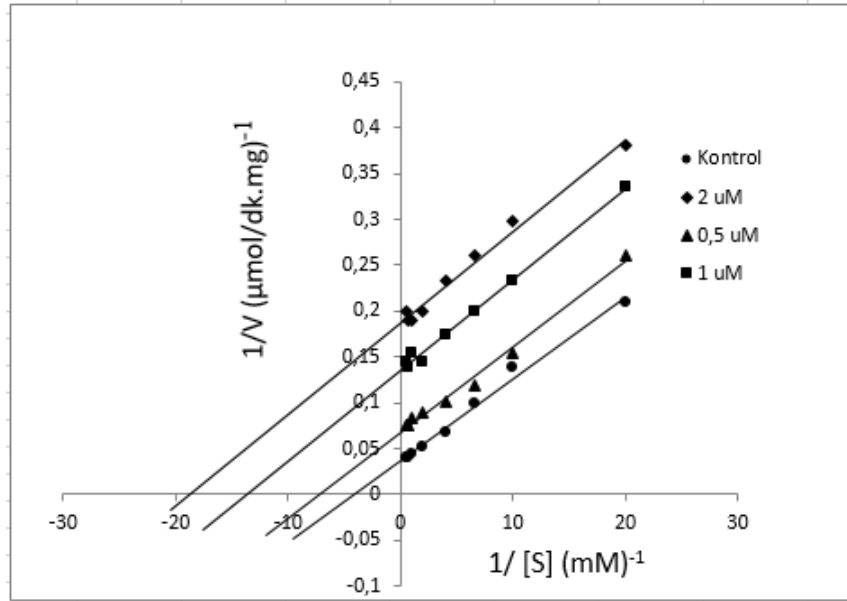
T. annulata enolaz üzerinde en yüksek inhibisyonun gözlemlendiği K21 kumarin türevi ile enzim inhibisyonunun belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda kumarin türevi eklenerek gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen spesifik aktivite değerleri Çizelge 3. 10'da sunulmuştur.

Çizelge 3. 10 K21 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Spesifik aktivite Kontrol ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (0,5 μM K21 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (1 μM K21 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (2 μM K21 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)
0,05	4,780	3,824	2,987	2,629
0,1	7,170	6,453	4,302	3,346
0,15	10,038	8,365	5,019	3,824
0,25	14,579	9,799	5,736	4,302
0,5	19,12	11,233	6,931	5,019
1	22,705	11,950	6,453	5,258
1,5	24,617	13,145	7,170	5,258
2	24,617	13,145	6,931	5,019

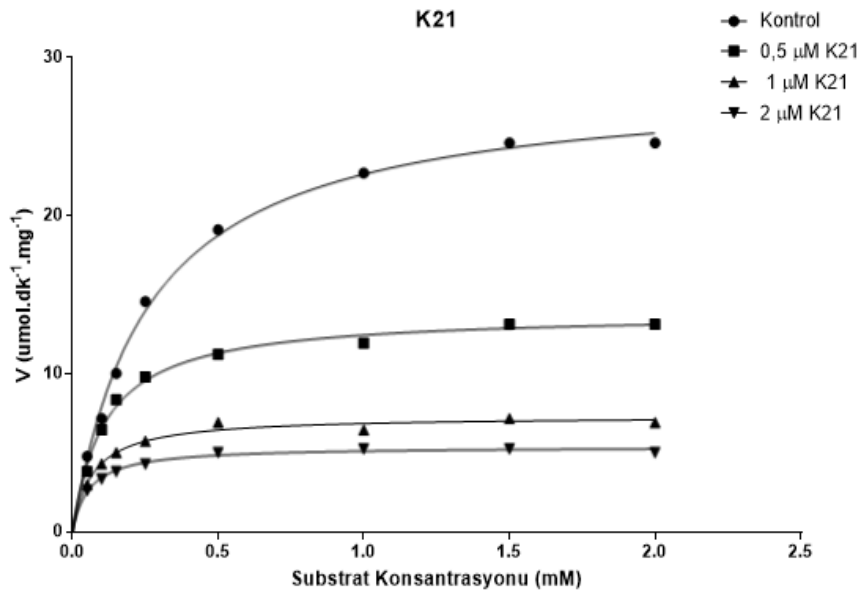
K21 kumarin türevi eklenerek yapılan reaksiyonlar sonucunda elde edilen reaksiyon hız değerlerine göre Lineweaver–Burk grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3. 21). Lineweaver–

Burk grafiği analiz edilerek *Ta*ENO'nun K21 kumarin türevi için inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. 21 Üç farklı K21 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği

Reaksiyonlar sonucunda elde edilen spesifik aktivite değerlerine göre Michaelis-Menten grafiği oluşturulmuş ve kinetik parametreler hesaplanmıştır (Şekil 3. 22).



Şekil 3. 22 Üç farklı K21 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği

K21 kumarin türevinin 0,5 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 111,7 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 13,84 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, 1 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 69,17 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 7,331 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; 2 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 57,52 , $V_{\max}$ değerinin ise 5,401 olduğu belirlenmiştir. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça K_m ve $V_{\max}$ değerlerinde azalma olduğu tespit edildiği için ve Lineweaver-Burk grafiğinde de görüldüğü gibi enzim inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda GraphPad Prism 6 programında lineer olmayan regresyon analizi kullanılarak enzim kinetiği denkleminde yarışmasız inhibisyon mekanizmasına göre Alpha K_i değeri 0,4235 μM olarak belirlenmiştir.

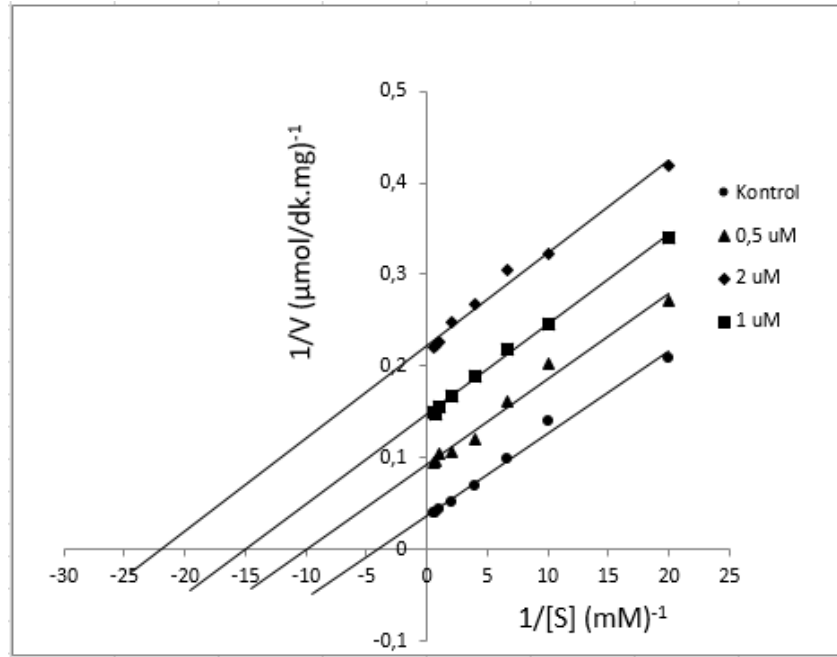
Son olarak *T. annulata* enolaz üzerinde yüksek inhibisyonun gözlemlendiği dört kumarin türevinden biri olan K23 kumarin türevi ile enzim inhibisyonunun belirlenmesi için enzim çözeltisine farklı konsantrasyonlarda kumarin türevi eklenerek gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen spesifik aktivite değerleri Çizelge 3. 11’de sunulmuştur.

Çizelge 3. 11 K23 kumarin türevi ile yapılan reaksiyonlarda kullanılan substrat konsantrasyonları ve elde edilen spesifik aktivite değerleri

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Spesifik aktivite Kontrol ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (0,5 μM K23 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (1 μM K23 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	Spesifik aktivite (2 μM K23 ekli) ($\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)
0,05	4,780	3,676	2,941	2,390
0,1	7,170	4,950	4,063	3,107
0,15	10,038	6,205	4,562	3,285
0,25	14,579	8,274	5,319	3,743
0,5	19,120	9,347	5,948	4,036
1	22,705	9,478	6,392	4,408
1,5	24,617	10,388	6,775	4,516
2	24,617	10,518	6,713	4,541

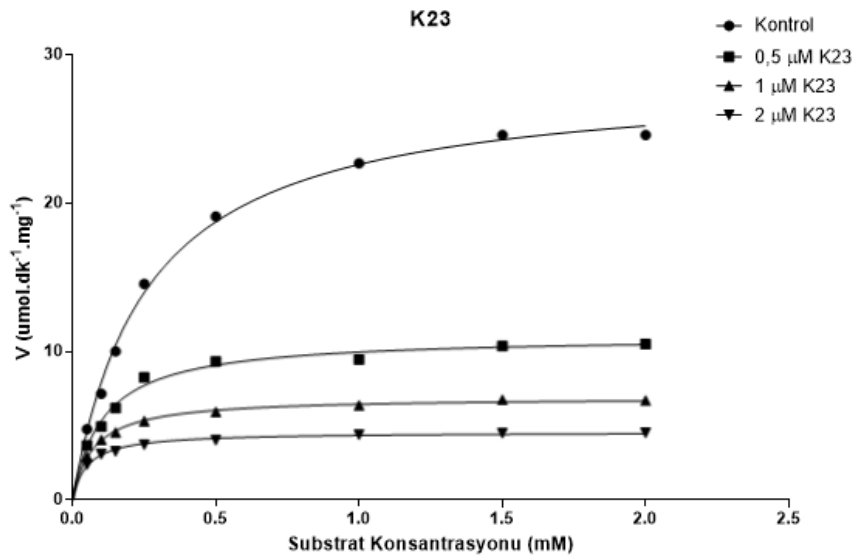
K23 kumarin türevi eklenerek yapılan reaksiyonlar sonucunda elde edilen reaksiyon hız değerlerine göre Lineweaver–Burk grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3. 23). Lineweaver–

Burk grafiği analiz edilerek *Ta*ENO'nun K23 kumarin türevi için inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. 23 Üç farklı K23 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Lineweaver–Burk grafiği

Reaksiyonlar sonucunda oluşan spesifik aktivite değerlerine göre Michaelis-Menten grafiği oluşturulmuş ve kinetik parametreler hesaplanmıştır (Şekil 3. 24).

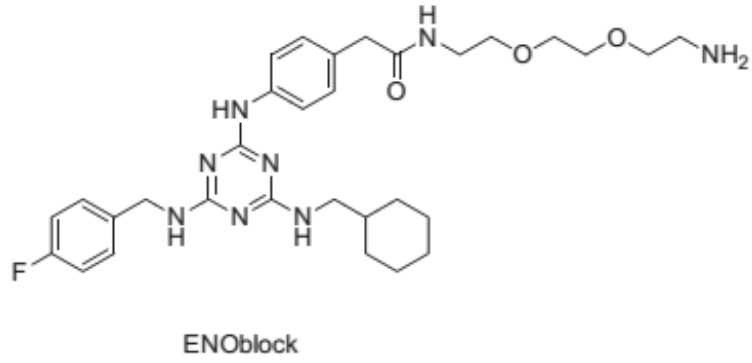


Şekil 3. 24 Üç farklı K23 kumarin konsantrasyonları varlığında farklı substrat konsantrasyonlarına karşı hız oluşumunun Michaelis-Menten grafiği

K23 kumarin türevinin 0,5 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 107,1 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 11,04 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, 1 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 72,53 μM , $V_{\max}$ değerinin ise 6,928 $\mu\text{mol.dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; 2 μM konsantrasyonu için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 50,6 , $V_{\max}$ değerinin ise 4,586 olduğu belirlenmiştir. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça K_m ve $V_{\max}$ değerlerinde azalma olduğu tespit edildiği için ve Lineweaver-Burk grafiğinde de görüldüğü gibi enzim inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda GraphPad Prism 6 programında lineer olmayan regresyon analizi kullanılarak enzim kinetiği denkleminde yarışmasız inhibisyon mekanizmasına göre Alpha K_i değeri 0,3224 μM olarak belirlenmiştir.

3.6 ENOblock® İnhibitörünün TaENO Üzerindeki İnhibisyon Potansiyelinin Belirlenmesi

Enolaz inhibitörleri, son dönemlere kadar sadece substrat analogları olarak bulunmaktaydı. Ancak, Jung vd., tarafından yapılan bir çalışmada ENOblock® olarak adlandırılan tri-substitue triazin yapısında küçük bir bileşik keşfedilmiştir (Şekil 3. 24). Substrat analogu olmayan bu bileşiğin literatürde ilk defa direkt olarak tavşan kas enolazına bağlandığı ve enzim aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir [125], [126]. Jung vd., tarafından yapılan çalışmada tavşan kas hücrelerinden enolaz saflaştırılmış ve belirli konsantrasyonlarda 2-PG substratı ve ENOblock® eklenerek yapılan reaksiyonların 240 nm'de aktiviteleri ölçülmüştür. Bu çalışmada ENOblock®, konsantrasyona bağlı olarak tavşan kas enolazını inhibe etmiş ve IC_{50} değeri 0,576 μM olarak tespit edilmiştir [125]. ENOblock® bileşiğinin yapılan çalışmalarda sitotoksositeye yol açmayan konsantrasyonlarda kanser hücresi istilasını azalttığı, hipoksik koşullar altında hücre canlılığını azalttığı ve mikrotübül destabilize edici ilaçlar ile sinerji içerisinde olduğu görülmüştür [126]. Özellikle kanser araştırmalarında ileriki analizlerde ENOblock®'un kanser hücre metastazını *in vivo* olarak inhibe edeceği öngörülmüştür [125].



Şekil 3. 25 ENOblock®'un kimyasal yapısının gösterimi [126].

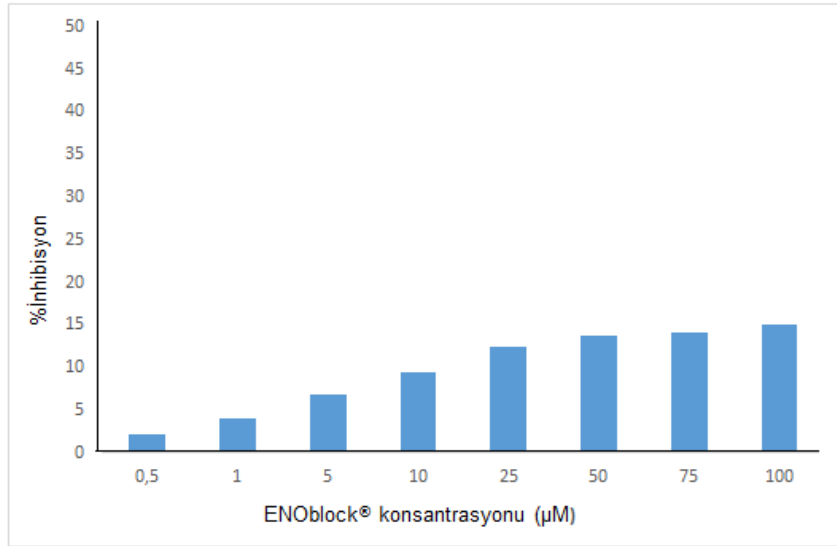
T. annulata enolazı üzerinde ENOblock® bileşiğinin inhibisyon potansiyelinin araştırılması için yapılan çalışmada 3 mM 2-PG substratı ve farklı konsantrasyonlarda ENOblock® kullanılarak standart reaksiyon koşullarında 240 nm'de aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen % inhibisyon değerleri Çizelge 3. 12'de gösterilmiştir. 100 µM ENOblock® konsantrasyonu ile yapılan analizde dahi % inhibisyon değeri % 15,04 olarak bulunmuştur ve bu sonuçlar doğrultusunda *Ta*ENO üzerinde bu bileşiğin inhibisyon potansiyelinin düşük olduğu görülmektedir. Elde edilen % inhibisyon değerleri çok düşük olduğundan IC₅₀ hesaplaması yapılamamıştır.

Çizelge 3. 12 *Ta*ENO ile yapılan reaksiyonlar sonucunda kullanılan ENOblock® konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri

ENOblock® konsantrasyonu (µM)	% İnhibisyon değerleri
0,5	2,16
1	3,99
5	6,94
10	9,42
25	12,40
50	13,72
75	14,05
100	15,04

*Ta*ENO üzerinde ENOblock®'un inhibisyon potansiyelinin tavşan kası enolazı üzerindeki kadar yüksek olmadığı görülmektedir. Jung vd., tarafından yapılan çalışmada % 50 inhibisyona ulaşmak için (IC₅₀) 0,576 µM'lık ENOblock® konsantrasyonu yeterli iken *Ta*ENO üzerinde uygulanan 100 µM ENOblock® konsantrasyonunda dahi % 50 inhibisyon değerine ulaşamamıştır (Şekil 3. 26). Tavşan kas enolazı bir memeli enolazı

iken *Ta*ENO bir parazit enolazıdır. Bu nedenle, 3 boyutlu protein yapıları farklı olabileceğinden aynı bileşiğin farklı organizmalardaki aynı enzimde benzer inhibisyon potansiyelini göstermeyeceği öngörülmektedir. Yapılan analizler sonucunda ENOblock® bileşiğinin *Ta*ENO üzerinde etkin bir inhibisyon potansiyeli bulunmamaktadır ve bu enzimi literatürde ilk defa, belirlenen kumarin türevleri yüksek oranda inhibe ettiği için bu bileşiklerin ileriki çalışmalarda uygun bir ilaç adayı olabileceği öngörülmektedir.



Şekil 3. 26 Farklı ENOblock® konsantrasyonlarına karşı *Ta*ENO üzerinde elde edilen % inhibisyon değerleri

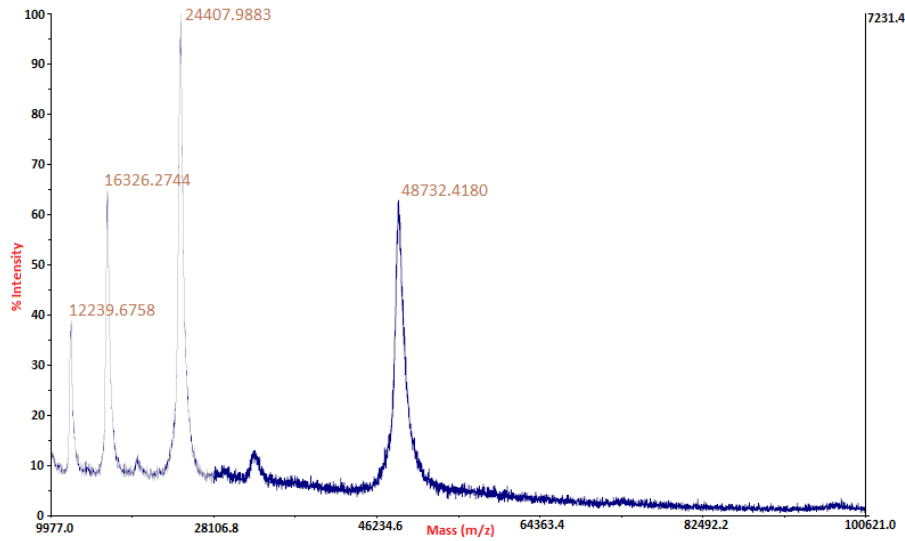
3.7 En İyi İnhibisyonu Sağlayan Kumarin Türevinin *Ta*ENO İle Etkileşiminin Kütle Spektroskopisi İle Gösterilmesi

MALDI-TOF enzim-inhibitör etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılabilecek önemli bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada, lipaz enzimine bir kumarin türevinin kovalent olarak bağlanması MALDI-TOF kütle spektrometresiyle saptanmıştır. Kovalent bağ iyon oluşumu sırasında bozulmadığından ilgili inhibitörün enzime bağlanması net bir şekilde saptanabilmiştir [127]. Ancak kovalent olmayan bağlarla inhibitörün enzime bağlanması durumunda bunun saptanması zorlaşmaktadır. Enzim ve inhibitör arasında kuvvetli non-kovalent bağlar mevcutsa inhibitörün enzime bağlanması belirlenebilmektedir. Örneğin, Tioredoksin redüktaz enzimine farklı altın (III) bileşiklerinin yüksek afiniteyle bağlanması yine MALDI-TOF ile saptanabilmiştir [128].

Yapılan çalışmada ise, MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılarak, afinite kromatografisiyle saflaştırılarak saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş olan *Ta*ENO'nun

molekül kütlesi saptanmıştır. Ardından enzim çözeltisine en iyi inhibisyonun gerçekleştiği K21 kumarin türevi eklenerek enzimin molekül kütlesindeki değişim incelenmiştir.

Şekil 3. 27'de MALDI-TOF ile yapılan analize sonucu elde edilen *Ta*ENO'ya ait kütle spektrumu verilmektedir. Şekildeki spektrumda 4 pik görülmektedir. 12239.7, 16326.3, 24408 ve 48732.4 m/z değerlerinde çıkan bu pikler farklı sayıda protonla veya iyonla iyonlaştırılmış olan $[M+4H]^{4+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+2H]^{2+}$ ve $[M+H]^+$ iyonlarına aittir. Burada M, *Ta*ENO'ya aittir. Sonuç olarak, saf enzimin molekül kütlesinin ortalama 48,8 kDa olduğu net bir şekilde anlaşılmaktadır. Bu değer de teorik olarak hesaplanan 48,1 kDa değeriyle uyum içerisindedir. *Ta*ENO'ya ilişkin daha önce yapılan çalışmada bu enzimin çözelti içinde dimeri halinde bulunduğu belirlenmiştir [86]. Ancak kütle spektrometresi analizinde gerçekleştirilen iyonlaştırma işlemi, var olan dimerlerdeki proteinler arası non-kovalent bağları ayırmış olabilir.

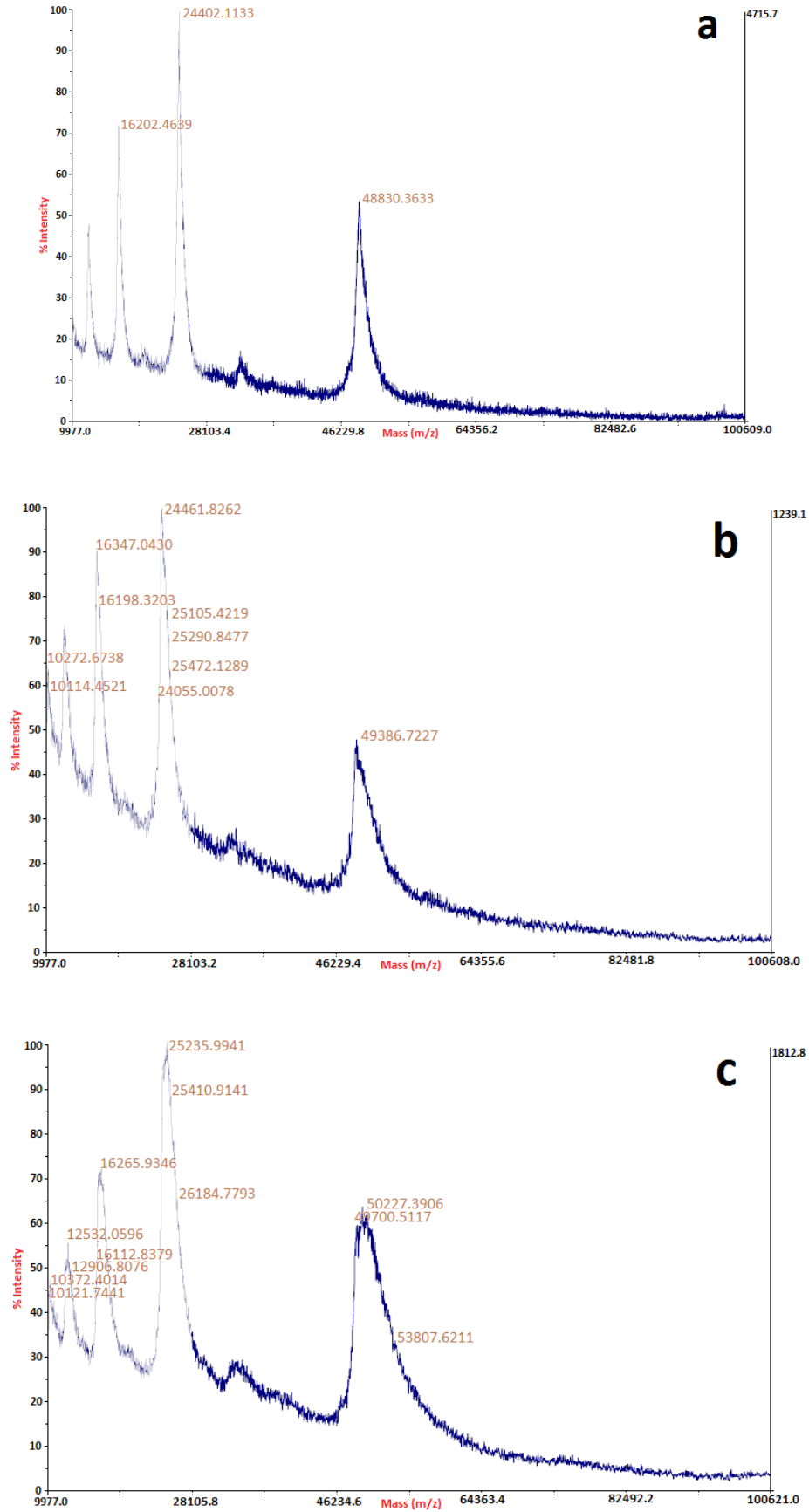


Şekil 3. 27 Afinite kromatografisinden elde edilmiş saf *Ta*ENO'ya ait kütle spektrumu

Saf *Ta*ENO'nun analizinden sonra, enzimin kumarinle (K21, MA=286,24 Da) etkileşimi MALDI-TOF ile incelenmiştir. Bu kısımda yapılan kütle spektroskopisi ön deneylerinde, enzim inhibisyon analizlerinde kullanılan enzim ve kumarin konsantrasyon koşulları uygulanmış ancak MALDI-TOF kütle spektrometresinde sinyal alınamamıştır ve bu konsantrasyon değerlerinin çalışılan kütle spektrometresi cihazı için çok düşük olabileceği öngörülmüştür. Bu sebeple de hem enzimin ve hem de K21 kumarin

türevinin konsantrasyonları minimum 10 kat arttırılarak tekrar MALDI-TOF analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, enzim konsantrasyonları sabit ama K21 kumarin konsantrasyonları farklı (50, 100 ve 200 μM) olan üç çözelti MALDI-TOF ile incelenmiştir. Kütle spektroskopisi analizlerinden önce bu çözeltilerin de enzim inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yapılan inhibisyon analizlerinde saf *Ta*ENO'nun ΔA_{240} değeri 0,526 iken kumarin türevi eklenerek yapılan analizler sonucunda 50 μM kumarin konsantrasyonu için ΔA_{240} değeri 0,453, 100 μM kumarin konsantrasyonu için ΔA_{240} değeri 0,408, 200 μM kumarin konsantrasyonu için ΔA_{240} değeri 0,244 olarak bulunmuştur. Yapılan analizde enzim-inhibitör konsantrasyonlarının önceki çalışmalara göre farklı olmasından ötürü aktivitenin aynı oranda olmasa da belirli bir ölçüde düştüğü gözlenmiştir. Elde edilen kütle spektrumları Şekil 3. 28'de verilmiştir.

Şekil 3. 28a'da 50 μM K21 kumarin türevini içeren enzim çözeltisinin kütle spektrumu bulunmaktadır. Enzim kütlelerinde önemli bir değişim görülmemektedir. Kumarin konsantrasyonu 100 μM 'a çıkarıldığında ise (Şekil 3. 28b) enzimin kütlelerinin +1 iyon için 49386'ya çıktığı, +2 iyonu için ise 50900'e kadar çıktığı görülmektedir. Şekil 3. 28c (200 μM K21 kumarin türevi) incelendiğinde ise +1 iyonunun kütlelerinin 50227'ye kadar çıktığı görülmektedir. Ayrıca +2 ve +4 iyonlarına ait piklerine göre hesaplandığında saf enzime göre daha yüksek molekül kütlelerini göstermektedir. Ayrıca, 100 ve 200 μM K21 kumarin türevini içeren enzim çözeltilerinde +1 iyon pikinin saf enzime göre çok daha geniş bir dağılıma sahip olduğu açıkça görülmektedir. +2 iyonuna ait pikin de saf enziminkine göre daha geniş dağılıma sahip olduğu da grafiklerden analiz edilebilmektedir.



Şekil 3. 28 50 μM (a), 100 μM (b) ve 200 μM (c) K21 kumarin türevini içeren *Ta*ENO çözeltilerinin kütle spektrumları

100 ve 200 μM K21 kumarin türevini içeren enzim çözeltilerinin kütle spektrumlarında +1 iyonları baz alınarak hesaplama yapıldığında; 100 μM 'lık çözeltide 2 adet kumarinin enzime bağlandığı ve 200 μM çözeltide de yaklaşık 5 adet kumarinin yüksek afiniteyle enzime bağlandığı söylenebilir. Ancak, bu piklerin saf enzime göre daha geniş dağılıma sahip olmaları, enzim yüzeyine rasgele sayıda kumarin molekülünün bağlandığını da göstermektedir. Sonuç olarak MALDI-TOF analizleri ile K21 kumarin türevinin *Ta*ENO ile yüksek afinite ile bağlandığı ispatlanmıştır.

3.8 *Theileria annulata* Enolazının Kapalı ve Açık Konformasyonunun Homoloji Modellemesi

Çalışmanın bu bölümündeki *T. annulata* enolazının açık ve kapalı konformasyonlarının homoloji modellemesi, *in silico* yapısal analizleri ve aktif bölgesinin belirlenerek 2-PG ile moleküler yanaştırması 2016 yılında Computational Biology and Chemistry dergisinde yayınlanmıştır [129] (Mutlu O., Yakarsonmez S., Sarıyer E., Danis O., Yuce Dursun B., Topuzogulları M., Akbulut E., Turgut-Balık D. 2016, "Comprehensive Structural Analysis of the Open and Closed Conformations of *Theileria annulata* Enolase by Molecular Modelling and Docking", Computational Biology and Chemistry, 64: 134-144.).

3.8.1 *Theileria annulata* Enolazının Belirlenen Farklı Enolazlar ile Karşılaştırmalı Protein Dizi Analizinin Yapılması

T. annulata enolazının katalitik rezidüleri, katalitik esnek halkaları, insersiyon bölgeleri ve plazminojen bağlanma bölgeleri literatürdeki bilgilerden yararlanılarak protein dizi analizi ile belirlenmiştir [14], [40], [41], [46], [47], [48], [130], [131], [132], [133], [134]. Enolazlardaki amino asit sayılarının farklı olmasından dolayı katalitik rezidüler tüm organizmalarda aynı numaralarla eşleşmemektedir. Bu nedenle, yapılan protein dizi analizi sonucunda elde edilen amino asit rezidülerinin numaralandırması hedef protein olan *Ta*ENO'ya göre yapılmıştır. Maya ve diğer organizmaların eşdeğer amino asit rezidüleri verilmesi gerektiğinde bu rezidü numaraları parantez içerisinde sunulmuştur. Literatür çalışmaları temel alınarak belirlenen Ala40, Ser41, His165, Gln173, Glu174, Glu217, Asp252, Glu300, Asp327, Lys352, His380, Arg381, Ser382, Lys403 rezidülerinin

reaksiyonun gerçekleşmesinde, 2-PG substratının ve Mg^{+2} iyonlarının bağlanmasında etkin olan katalitik rezidüer olduğu belirlenmiştir (Şekil 3. 29).

T. annulata enolazının katalitik halka bölgeleri olan halka1 (Cys36-Arg57), halka2 (His165-Gln173) ve halka3 (Phe258-Thr279) bu enzimin kalıp proteini olan *T. gondii* enolazının yapısına göre belirlenmiştir. Belirlenen bu halka bölgeleri, 2-PG substratı enzime bağlandığına katalitik aktif bölgeye doğru hareket ederek enzimin kapalı konformasyonunu oluşturmaktadır [12], [14].

T. annulata enolazı bitki benzeri insersiyonlar olarak bilinen pentapeptid (₁₀₃EWGYC₁₀₇) ve dipeptid (₂₆₂EK₂₆₃) insersiyonlar içermektedir (Şekil 3. 29) [131]. Diğer literatür çalışmalarında dipeptid olarak belirlenen insersiyon [14], [131] Akat vd. tarafından bir tripeptid insersiyon (₂₆₂EKS₂₆₄) bölgesi olarak önerilmiştir [130] fakat burada bulunan Ser264 amino asidinin fonksiyonu tam olarak belirlenemediğinden ileriki çalışmalarda analiz edilmesi planlanmaktadır. *P. falciparum* enolazında yapılan bir çalışmada pentapeptid insersiyonun delesyonunun k_{cat}/K_m değerinde azalmaya ve monomerlerde ayrılmaya neden olduğu görülmüştür [134]. Ek olarak *T. gondii* enolazında pentapeptid ve dipeptid olarak belirlenen bu insersiyonların delesyonu substrat afinitesinde azalmaya neden olmuştur [131]. Belirlenen diğer dipeptid insersiyon bölgelerinin (₁₄₇ID₁₄₈, ₃₁₇KL₃₁₈) fonksiyonları bilinmediğinden ileriki çalışmalarda analiz edilmesi gerekmektedir.

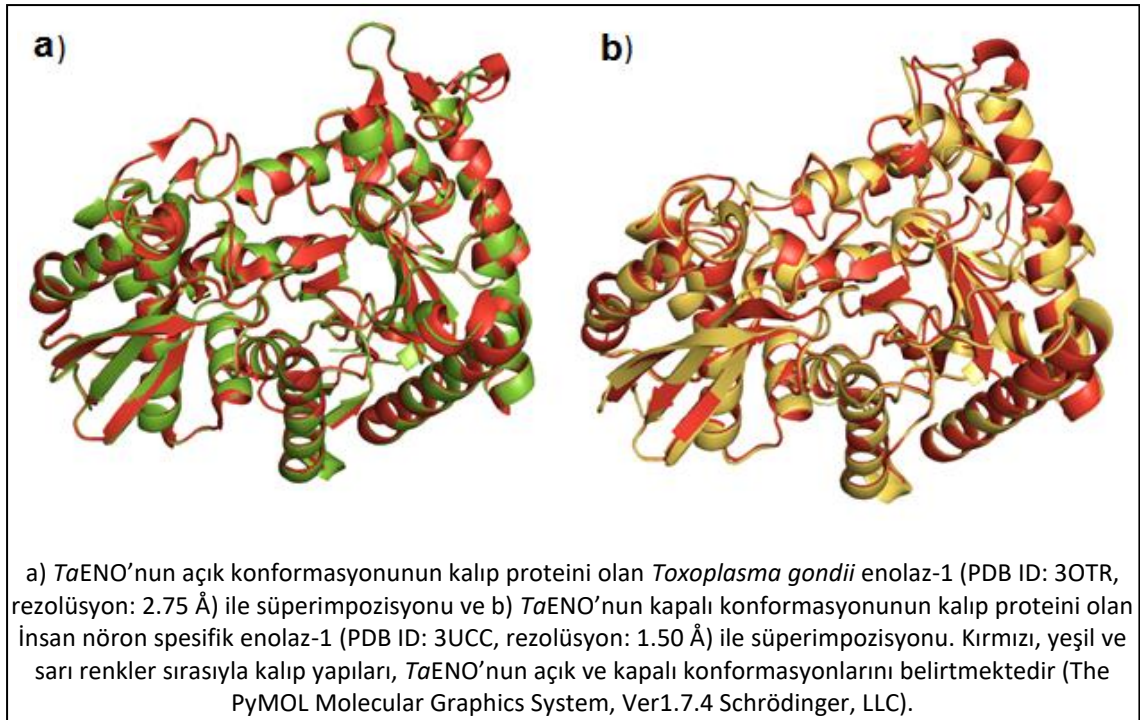
TaENO'da iki farklı bölgenin (₂₅₈FYVKEKSSYN₂₆₇ ve ₂₇₃EKELLK₂₇₈) plazminojen bağlanma bölgeleri olduğu belirlenmiştir ve bu bölgelerin parazitin konakta yayılmasında etkin olabilecek bölgeler olduğu bilinmektedir. Ayrıca belirlenen dipeptid (₂₆₂EK₂₆₃) insersiyon birinci plazminojen bağlanma bölgesi içerisinde bulunmaktadır. Bu insersiyon bölgesinin delesyonu ile plazminojen bağlanma aktivitesinin ne derecede etkileneceğinin ileriki çalışmalarda araştırılması planlanmıştır.

Eşleştirme analizine ek olarak, *T. annulata* enolazının fizikokimyasal özellikleri değerlendirilmiştir. ProtParam sonuçları, enzimin yaklaşık 48,1 kDa ve teorik pI'nın 6,17 olduğunu, 55 negatif ve 52 pozitif yüklü rezidü içerdiğini, ekstraksiyon sabiti değerinin 37860 olduğunu, alifatik indeksin 90,23 ve hidropatisitesinin büyük ortalamasının -0,200 olduğunu göstermiştir.

3.8.2 *Theileria annulata* Enolazının İki Farklı Konformasyonunun Modellerinin Oluşturulması

Homoloji modelleme yönteminde başlangıçta *Toxoplasma gondii* ME49 (PDB ID: 3OTR_A) [14] enolazı 591 Maks. skor, % 99 Query cover, 0.0 E-değeri ve % 65 yüzde benzerlik oranı ile *Ta*ENO'nun açık konformasyonu için kalıp protein olarak seçilmiştir. İnsan nöron spesifik enolaz-1-PgaPEP (PDB ID: 3UCC_A) [48] proteini ise 577 Maks skor, % 99 Query cover, 0.0 E-değeri, % 66 yüzde benzerlik oranı ile *Ta*ENO'nun kapalı konformasyonu için kalıp protein olarak belirlenmiştir. Protein yapılarının geometrileri AMBER kuvvet alanı 14SB ve steepest descent algoritması uygulanarak enerji minimizasyonu ile optimize edilmiştir. Bu protein konformasyonların modelleri, kalıp proteinler ve *Ta*ENO amino asit dizisi kullanılarak MODELLER v9.12 ve v9.15 programlarında oluşturulmuştur. Minimizasyon adımından önce, açık ve kapalı konformasyon modellerinin sırasıyla 41884 kJ/mol ve 51332 kJ/mol başlangıç potansiyel enerjilerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Optimizasyon sonrasında, potansiyel enerjiler sırasıyla -41609 kJ/mol ve -39822 kJ/mol değerlerine minimize edilmiştir.

*Ta*ENO'nun açık konformasyon modeli ve 3OTR_A'nın süperimpozisyonu yapılmış ve RMSD değeri 0,288 Å olarak belirlenmiştir. Ek olarak, enzimin kapalı konformasyon modelinin ve 3UCC_A'nın süperimpozisyonu yapılmıştır ve RMSD değeri 0,342 Å olarak tespit edilmiştir (Şekil 3. 30). İki protein yapısının kıyaslanması sonucu ortaya çıkan RMSD değeri süperimpozisyonu yapılmış proteinlerin atomları arasındaki uzaklıkları belirlemektedir. RMSD değeri sıfıra ne kadar yakınsa iki proteinin birbirine o derece yapısal olarak benzediğini göstermektedir [100], [135]. Elde edilen düşük RMSD değerleri, bu modellerin kalıp protein yapıları ile yüksek benzerlik gösterdiğini belirtmektedir.



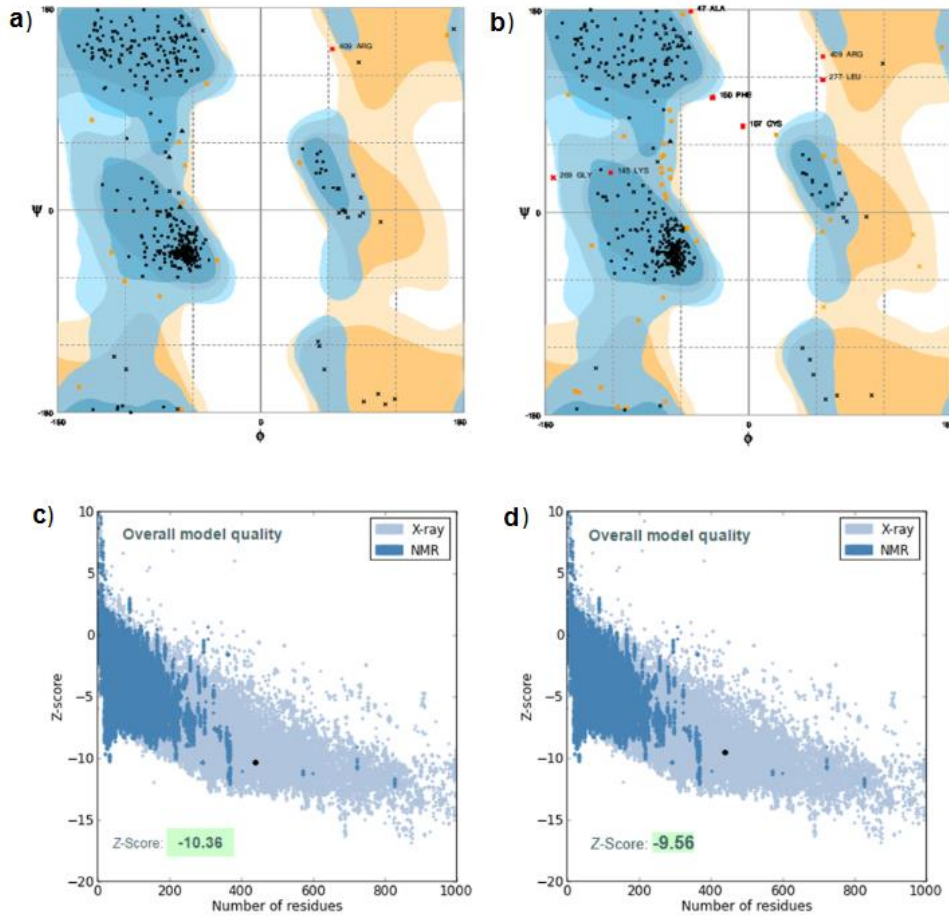
Şekil 3. 30 *TaENO* modellerinin kalıp proteinler ile süperimpozisyonu.

Modellerin kalitesi ERRAT, Prosa, ProQ ve RAMPAGE sunucuları kullanılarak doğrulanmıştır [67], [68], [69], [70]. Tüm validasyon sonuçları Çizelge 3. 13'te verilmiştir.

Çizelge 3. 13 *TaENO*'nun oluşturulan modellerinin validasyonu

Protein	Web-Sunucusu					
	ERRAT (Genel kalite faktörü)	ProSA (Z-score)	ProQ (LGscore)	RAMPAGE (Ramachandran plot)		
<i>TaENO</i>				Asıl bölge (%)	Kabul edilebilir bölge (%)	Dış bölge (%)
Açık konformasyon modeli	92,308	-10,36	6,443	96,8	3,0	0,2
Kapalı konformasyon modeli	82,949	-9,56	6,425	90	8,4	1,6

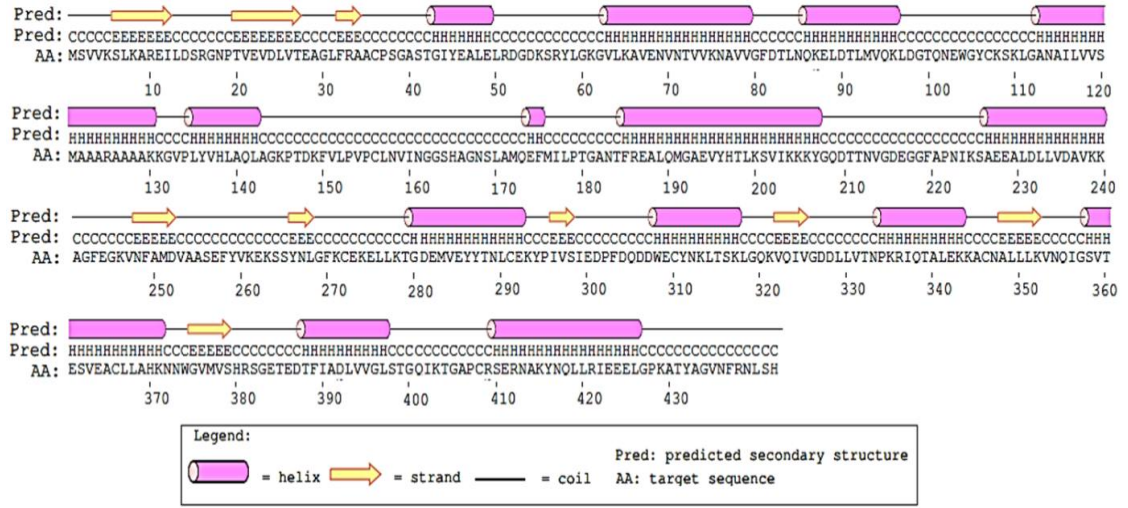
Validasyon aşamasında ilk olarak ERRAT programı geometri optimizasyonu sonrası modeldeki CC, CN, CO, NN, NO ve OO atomlarının arasındaki bağılı olmayan atomik etkileşimleri tahmin etmede kullanılmıştır [67]. Yapılan analize göre açık ve kapalı konformasyonlarının sırasıyla genel kalite faktörleri 92,308 ve 82,949 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçların yüksek çıkması atomlar arasındaki etkileşimin iyi olduğunu ve proteinin üç boyutlu yapısının doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. RAMPAGE programı ile proteinin birincil yapısında bulunan amino asitlerin ikincil yapı içerisinde hangi pozisyonda bulunduklarını belirlemek amacıyla kullanılan Ramachandran diyagramı oluşturulmuştur [68]. Açık ve kapalı konformasyonlarının modellerinin Ramachandran diyagramındaki asıl bölge, kabul edilebilir bölge ve dış bölgede rezidüleri sırasıyla % 96, % 3, % 0,2 ve % 90, % 8,4, % 1,6'dır. Elde edilen sonuçlara göre amino asit rezidülerinin en az % 90'ının asıl bölgede bulunması ile proteinin üç boyutlu yapısının kabul edilebilir doğrulukta modellenmiş olduğu görülmektedir. ProSA programı protein modellerinin yapısal kalitesini tespit etmekte kullanılmıştır. Z-skoru toplam model kalitesini ifade etmekte ve yapısı çözümlenmiş diğer proteinlerin Z-skoru değerleriyle birlikte verilmektedir [69]. Oluşturulan açık ve kapalı konformasyon modellerinin Z-skorları sırasıyla -10,36 ve -9,56'dır. Ayrıca, her iki model de yapısı X-ışını kristalografisinde çözülmüş proteinler arasında yer almaktadır (Şekil 3. 31). ProQ; elde edilen protein modellerinin kalitesinin belirlenmesi için kullanılan web tabanlı bir yazılımdır. Protein modelleri için belirlenen LGscore'ları, açık konformasyon için 6,443 ve kapalı konformasyon için 6,425'tir. Bu skorların 4'ten yüksek olması protein modellerin büyük ölçüde doğru olduğunu göstermektedir [70].



Şekil 3. 31 *TaENO*'nun açık (a) ve kapalı (b) konformasyon modellerinin Ramachandran plot diyagramları ve *TaENO*'nun açık (c) ve kapalı (d) konformasyon modellerinin siyah nokta ile belirlenmiş Z-skorlarının grafikleri.

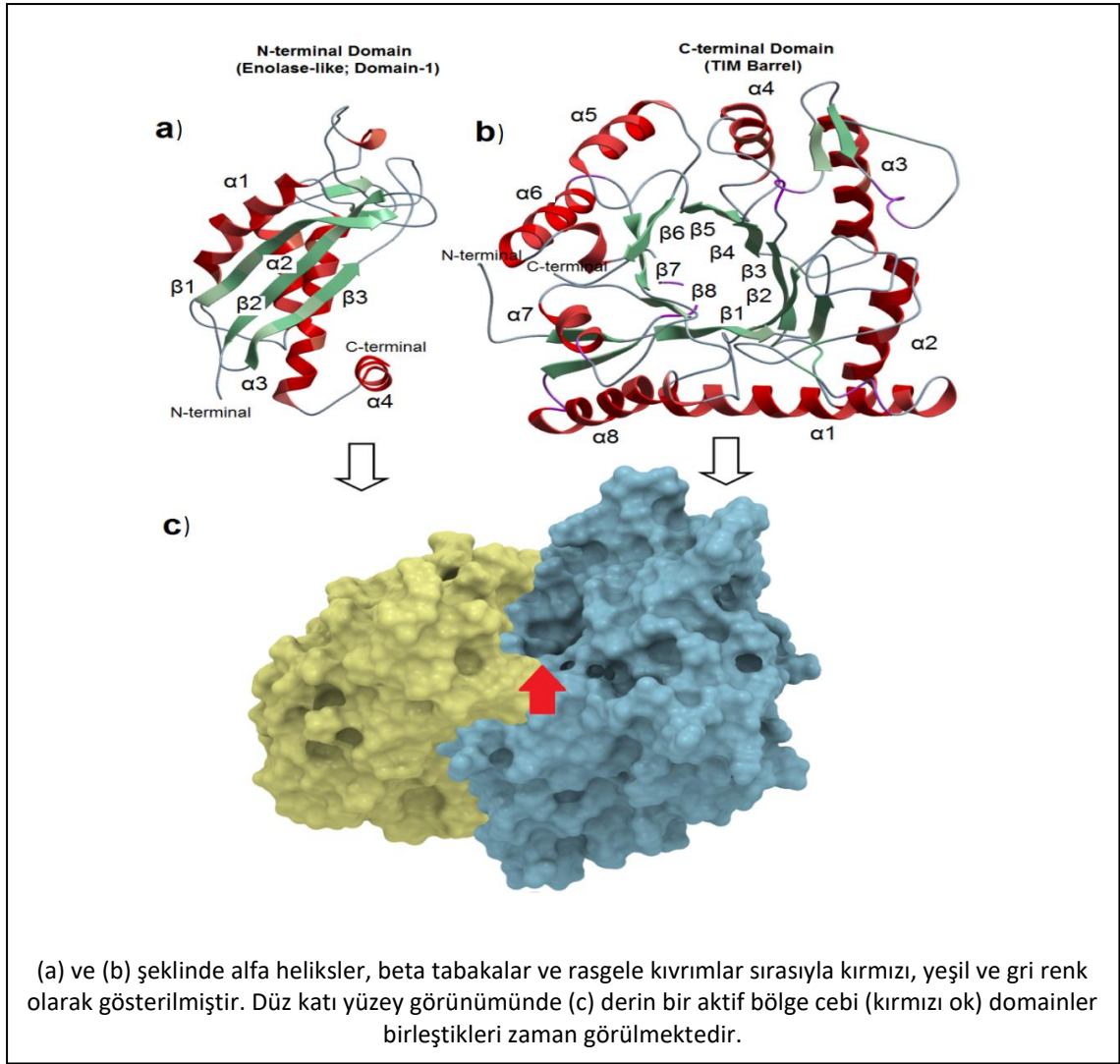
3.8.3 *T. annulata* Enolazının Yapısal Özellikleri: İkincil ve Üçüncül Yapısı

T. annulata enolazının ikincil yapı özellikleri, PSIPRED Protein Dizi Analizi Yöntemi ile PSI-BLAST matrislerine dayalı ağlarının iki adımı kullanılarak değerlendirilmiştir [101], [102]. N- terminal domaini ayrı beta-tabakalar ve alfa helikslerini ($\beta+\alpha$) içermektedir. Ancak, C-terminal domaini beta tabakalarına bağlı alfa helikslere (β/α) sahiptir. Domain belirleyici sunucuya göre, N- ve C- terminal bölgelerinde iki farklı domain bulunmuştur (Şekil 3. 32). N-terminal domain (4-131 rezidüleri) “enolaz-benzeri, N terminal domain” enolaz süperailisi altında 3.30.390.10 CATH kodu, E-değeri 4.7e-52 (sırasıyla Sınıf, Yapı, Topoloji, Homoloji) ve PF03952 Pfam domain numarası ile sınıflandırılmıştır. C-terminal domaini 133 ve 439 rezidüleri arasında yer almaktadır. C-terminal bölgesi enolaz süperailisi altında 3.20.20.120 CATH kodu (E-değeri: 1.5e-121), ve PF00113 Pfam domain numarası ile sınıflandırılmıştır.



Şekil 3. 32 *TaENO* amino asit dizisinin ikincil yapı analizi

Modellenmiş yapının detaylı analizi Şekil 3. 33’te gösterilmiştir. N-terminal bölgesinin Asp148 rezidüsü ile sonlandığı belirtilmiştir. Domain üç anti-paralel beta tabakalar ile başlamakta ve dört heliks ile devam etmektedir. C- terminal bölgesi ise bir TIM (Trio fosfat izomeras)-fıçı (Lys149-Gly427) ve 15 amino asitlik uzun bir C- terminal kuyruğu (Pro428-His442) içermektedir. C- terminal’de birbirine bağlı sekiz alfa heliks ve sekiz beta tabaka bulunmaktadır. Bu beta tabakalar alfa heliksler tarafından çevrelenmiştir ve birlikte enzimlerin % 10’unda yaygın olarak bulunan, korunmuş alfa/beta TIM-fıçı yapısını oluşturmaktadır [136]. Enolaz süperailisi hariç diğer TIM-fıçı yapılarında oluşturulan model ($\beta\alpha$)₈ topolojisine sahiptir. Ancak enolazlarda TIM-fıçı topolojisi farklıdır, çünkü $\beta\beta\alpha(\beta\alpha)$ ₆ topolojisine sahip olan bu yapılar iki anti paralel beta tabaka ile başlayarak iki alfa heliks ile devam eder. Bu fıçı yapısı ilk olarak maya enolazında belirlenmiş olup [45] daha sonra diğer organizmaların enolazlarında gösterilmiştir [14], [48], [133], [137].



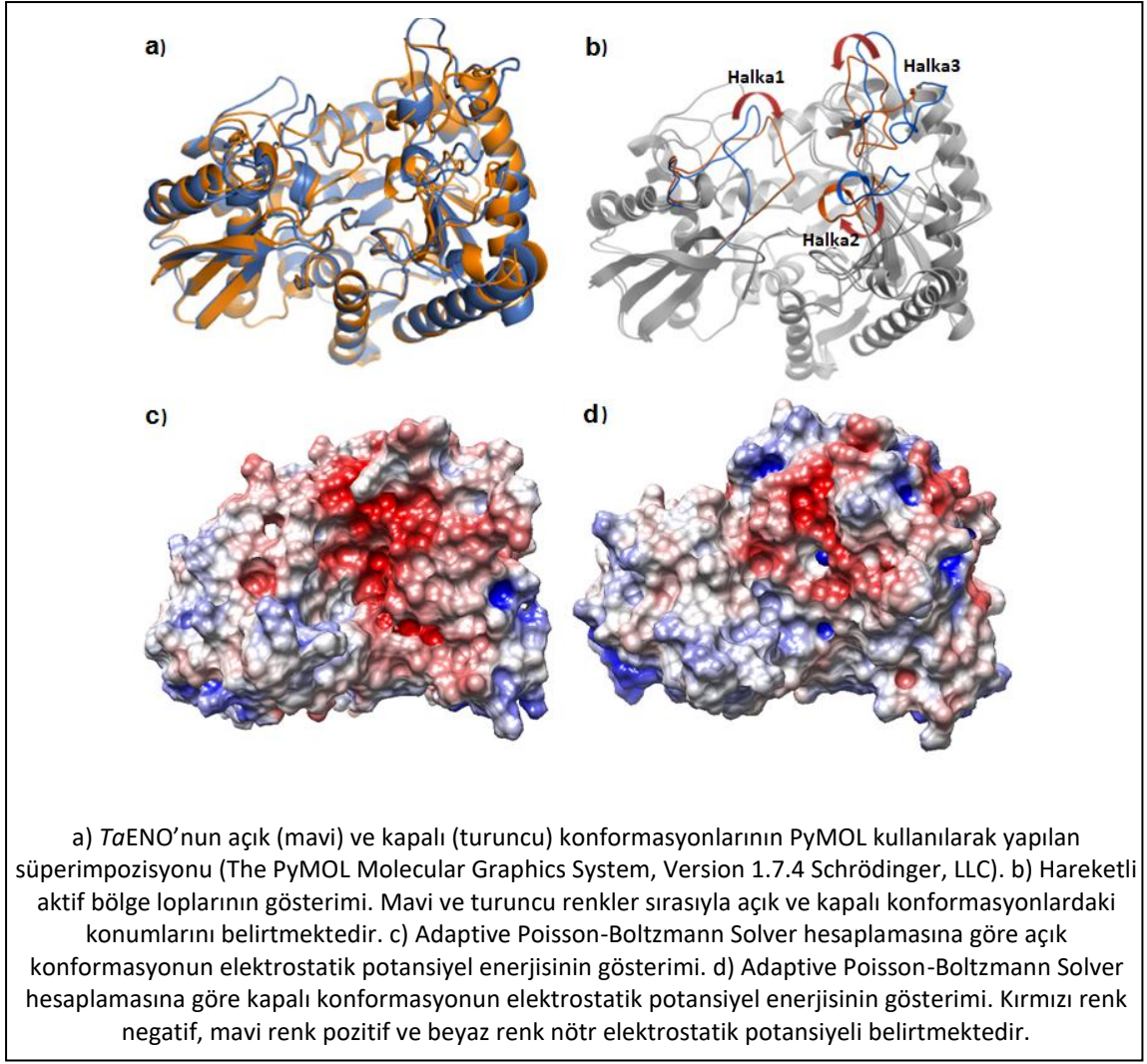
Şekil 3. 33 *TaENO*'nun N-terminal domaini (a) ve TIM-fıçı ile C-terminal domainin (b) görüntüsü ve bu domainlerin düz katı yüzey görüntüsü (c).

T. annulata enolazının yapısal özelliklerinden biri, üç bağlantılı halka bölgesinin bulunmasıdır [14], [45], [48], [133], [137]. Halka1 N-terminal domaini üzerinde yer almaktadır ve Cys36- Arg57 rezidülerini içermektedir. Diğer iki halka, halka2 ve halka3 C-terminal TIM fıçı domaininin bir parçasıdır ve sırasıyla His165-Gln173 ve Phe258-Thr279 rezidülerinin arasında yer almaktadır.

TaENO'nun kapalı ve açık konformasyonlarının süperimpozisyonu Şekil 3. 34a'da gösterilmiştir. Açık ve kapalı konformasyon yapılarının süperimpozisyonu incelendiğinde, bu üç farklı halka enzim merkezine doğru hareket etmektedir ve kapalı bir aktif bölge cebi oluşturmaktadırlar. Halka1 proteinin açık veya kapalı konformasyonda olup olmadığını belirleyen en önemli halka bölgesidir (Şekil 3. 34b). Halka1, Mg^{+2} iyonu ve 2-PG substratını bağlayan Ser41 (maya ve insanda Ser39,

Entamoeba histolytica'da Ser40 olarak bulunmaktadır.) rezidüsünü ve diğer aktif bölge cebi rezidülerini (Ala40 and Gly39) taşımaktadır [46], [47], [48]. Halka1'in başı aktif bölge cebinin üstüne yönelmektedir ve Ser41 (mayada Ser39) etkileşmesi meydana gelmektedir [46]. Bu konformasyonel değişim sırasında, Ser41 (mayada Ser39) *T. annulata* enolaz modelinde yaklaşık 11.4 Å hareket etmektedir. Halka2, fıçı yapısının anti-paralel $\beta 1$ ve $\beta 2$ zincirleri arasında yer almaktadır ve proton donör His165 (maya enolazında His159) rezidüsünü tutmaktadır. Substrat yokluğunda yani açık konformasyonda His165 aktif bölgeden uzakta bulunmaktadır. 2-PG substratı ve Mg^{+2} iyonu aktif bölge boşluğuna bağlandığı zaman, halka2 aktif bölgeye yakınlaşmaktadır ve His165 amino asidinin substrat ile etkileşime girmesine izin vermektedir [47]. *T. annulata* enolazının homoloji modeline göre, His165'in yer değiştirmesi C-alfa atomlarına dayalı olarak 3.69 Å'dur. $\beta 3$ -zinciri ve $\alpha 4$ heliksi arasındaki çok uzun bir halka olan halka3 bulunmaktadır (Şekil 3. 34b). Dizi eşleştirmesinde de görüldüğü gibi bu halka, hayvan enolazlarında bulunmayan bitkilere özgü dipeptid insersiyonunu içermektedir [137].

APBS ile toplam elektrostatik potansiyeli *TaENO*'nun açık ve kapalı konformasyonları için sırasıyla $3.939E + 04$ kJ/mol ve $4.067E + 04$ kJ/mol olarak hesaplanmıştır (Şekil 3. 34c ve 3. 34d). Açık ve kapalı konformasyonların her ikisinde de, aktif bölge cebi etrafındaki negatif elektrostatik potansiyeli gösteren belirli bir kırmızı bölge bulunmaktadır. Bu kırmızı bölge *Entamoeba histolytica* enolazı ile yapılan önceki çalışmalarda belirlenmiştir ve aynı zamanda insan enolazlarının üç formunda (α , β ve γ) da bulunmaktadır [138].



Şekil 3. 34 *Ta*ENO'nun süperimpozisyonunun, halka bölgelerinin ve elektrostatik potansiyel enerjisinin model üzerinde gösterimi.

3.9 *T. annulata* Enolazının Kapalı Konformasyon Modeli ile Yapılan Moleküler Yanaştırma Analizleri

3.9.1 *T. annulata* Enolaz Modelinin Aktif Bölgesinin Belirlenmesi ve 2-Fosfoglisarik Asit ile Bağlanması GÖsterimi

Moleküler yanaştırma analizlerine geçildiğinde enzimin 2-PG ile ilişkili aminoasitlerinin doğru analiz edilebilmesi için substrat bağlandıktan sonra oluşan *Ta*ENO'nun kapalı konformasyon modeli üzerinden çalışmalar gerçekleştirilmiştir. *Ta*ENO modelinin aktif bölge ve muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri DoGSiteScorer ve 3DLigandSite programları ile belirlenmiştir [107], [108]. DoGSiteScorer ile *Ta*ENO üzerinde 105,66 – 522,24 Å³ hacim aralığında ve 0.82 den 0.21'e kadar (0-1 aralığında) değişen ilaç skorlarında 14 farklı bölge olabileceği öngörülmüştür (Şekil 3. 35).

Name	Volume [Å³]	Surface [Å²]	Lipo surface [Å²]	Depth [Å]	Drug Score
P0	522.24	771.50	503.45	20.20	0.82
P1	329.98	384.47	174.96	22.75	0.81
P2	305.60	611.40	512.69	16.71	0.69
P3	239.36	433.74	255.53	13.49	0.49
P4	199.87	368.64	209.24	11.46	0.44
P5	199.81	449.21	261.59	9.84	0.36
P6	180.54	356.95	173.24	8.54	0.28
P7	172.29	318.87	158.13	9.64	0.30
P8	151.10	121.73	93.75	11.36	0.39
P9	148.48	245.06	164.38	7.19	0.15
P10	143.94	374.62	278.69	7.47	0.21
P11	142.46	279.23	229.30	9.17	0.29
P12	111.74	247.00	170.09	7.00	0.19
P13	109.76	236.26	125.42	7.59	0.18
P14	105.66	262.82	153.61	7.26	0.21

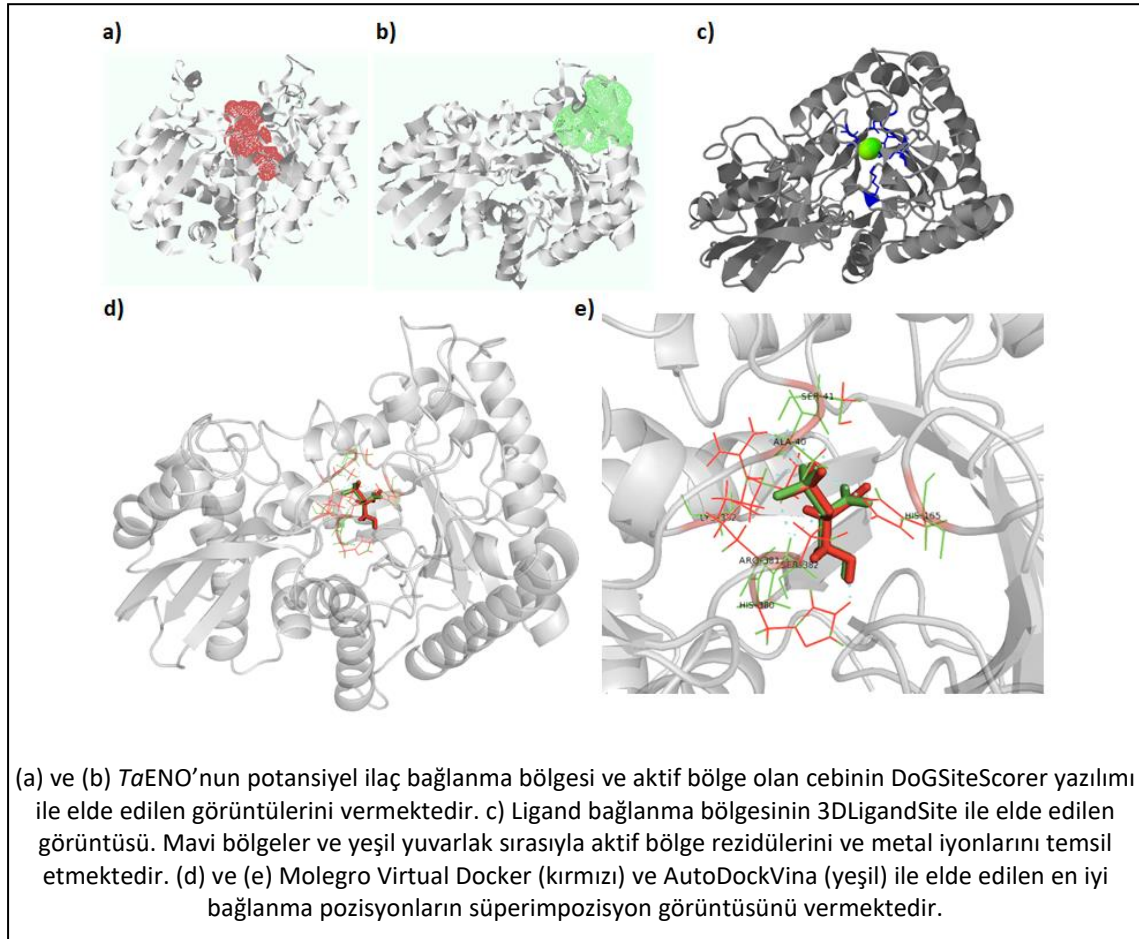
Skorlarda görülen yeşil renk en yüksek, sarı ve turuncu renk orta derece ve kırmızı renk en düşük seviyede bağlanma potansiyeline sahip bölgeleri göstermektedir.

Şekil 3. 35 *Ta*ENO'nun potansiyel ilaç bağlanma bölgelerinin ilaç skorları.

Yüksek ilaç skorlarına sahip bölgeler, aktif bölge cebini (DrugScore: 0.81) ve aktif bölge yakınındaki halka3 bölgesini (DrugScore: 0.69) içermektedir (Şekil 3. 36a ve 3. 36b). 3DLigandSite sunucusundan elde edilen sonuçlara göre, 17, 7 ve 1 evrimsel homolog yapıları sırasıyla Mg^{+2} , Zn^{+2} ve Ca^{+2} kofaktörleri ile öngörülmüştür (Şekil 3. 36c). Potansiyel ligand bağlanma bölgesi 2-PG'nin PEP'e dönüşümünde önemli olan rezidüleri (Gln173, Asp252, Glu300, Asp301, Asp327 ve Lys403) içermektedir.

Molegro Virtual Docker ve AutoDockVina yazılımları 2-PG'nin aktif bölge boşluğuna bağlanma modunu belirlemek için kullanılmıştır [82], [109] (Şekil 3. 36d ve 3. 36e). Elde edilen en iyi bağlanma pozisyonları kıyaslanmış ve amino asit etkileşimleri protein dizi analizi ile karşılaştırılmıştır. En düşük bağlanma enerjilerine sahip en iyi pozisyonların çok benzer bağlanma modlarına ve ligand geometrilerine sahip oldukları görülmektedir. Molegro Virtual Docker programından elde edilen MolDock skora göre en iyi yanaştırma skoruna sahip pozisyon -71,76 kcal/mol'dür. Bu pozisyon H-bağı (-23,55 kcal/mol), sterik (-73,28 kcal/mol), elektrostatik (-13,57 kcal/mol) ve iç ligand etkileşimleri (17,28 kcal/mol) olarak tanımlanan protein ligand etkileşimlerini içermektedir. AutoDockVina programı ile de 2-PG için sekiz farklı bağlanma modu öngörülmüştür. Bunlardan yedi tanesi aktif bölge cebi içerisindeyken,

bir tanesi aktif bölge dışında yer almaktadır. Molegro Virtual Docker ve AutoDockVina yazılımlarının bağlanma skoru formülasyonları farklıdır. AutoDockVina yazılımında elde edilen sonuçlara göre en yüksek bağlanma skoruna sahip en iyi pozisyon -5,5 kcal/mol'dür. İki yazılım sonucunda da elde edilen en iyi pozisyonların birbirine çok yakın olduğu Şekil 3. 36d ve 3. 36e'de de görülmektedir.



Şekil 3. 36 *TaENO*'nun DoGSiteScorer yazılımı ile elde edilen görüntüleri ve moleküler yanaştırma sonuçları.

Moleküler yanaştırma sonuçlarına göre Ala40, Ser41, His165, Lys352, His380, Arg381 ve Ser382 rezidüleri 2-PG ile hidrojen bağlanma sağladığı görülmektedir (Şekil 3. 36e). Ayrıca bu sonuçlar, karşılaştırmalı dizi analizinde de tespit edilmiştir. Lys403 ve Gln173 dizi analizi ile hidrojen bağlanma rezidüsü olarak belirlenmiştir, ancak moleküler yanaştırma sonuçlarında substrat ile elektrostatik ve sterik etkileşimler içerisinde olduğu görülmektedir (Çizelge 3. 14). 2-PG'nin fosfat grubu Ala40, Ser41, Arg381, Ser382, Lys352 ve His165 rezidüleri ile çevrelenmektedir. Burada deprotonlanmış rezidü olan Lys352 ayrıca substratın C-2 atomuna yakın bir pozisyonda bulunmaktadır.

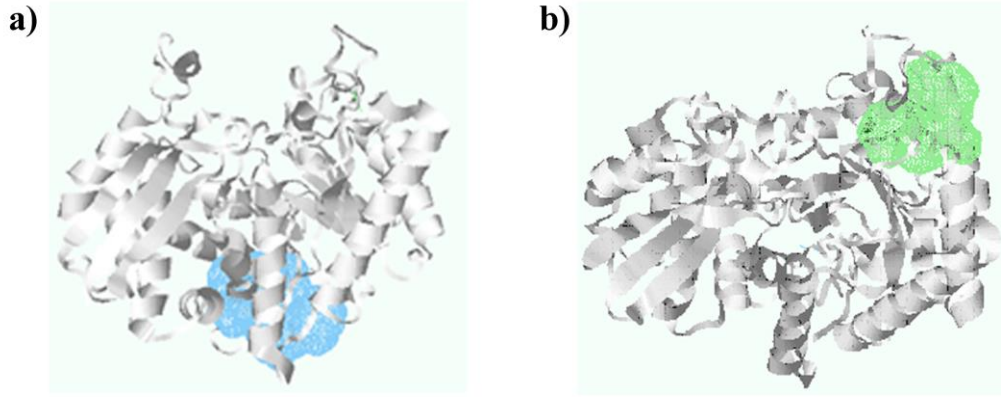
*Ta*ENO'da Glu174, Glu217 ve His380 rezidüleri, Lys352 rezidüsünün karşı bölgesinde yer alarak dehidrasyon reaksiyonunda önemli bir rol oynadığı görülmektedir.

Çizelge 3. 14 Protein dizi analizi ve moleküler yanaştırma analizleri kullanılarak 2-PG ile potansiyel hidrojen bağı etkileşimleri belirlenen *Ta*ENO'nun aktif bölge amino asit rezidüleri

Protein Dizi Analizi	Molegro Virtual Docker Analizi	AutoDockVina Analizi
Rezidü	Rezidülerin atomları	Rezidülerin atomları
Ala40	Ala40 N-H	Ala40 N-H
-	Ser41 N-H	Ser41 N-H
His165	His165 NE2	His165 NE2
Gln173	-	-
Lys352	Lys352 HZ3 Lys352 HZ1	Lys352 HZ3 Lys352 HZ1
His380	His380 He2	His380 He2
Arg381	Arg381 HE Arg381 HH21	Arg381 HE Arg381 HH21
Ser382	Ser382 N-H	Ser382 N-H
Lys403	-	-

3.9.2 *T. annulata* Enolaz Modelinin Belirlenen Dört Farklı Kumarin Türevi ile Moleküler Yanaştırmasının Yapılması

*Ta*ENO'nun kumarin ile inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu tespit edilmiştir. Bu inhibisyon mekanizmasında inhibitörün enzim-substrat kompleksinde aktif bölgesinin dışında bir bölgeye bağlandığı bilinmektedir [17]. Ayrıca, moleküler modelleme ve 2-PG ile yapılan yanaştırma analizleri sonucunda enzimin substrat bağlandıktan sonra aktif bölgesinin tamamen kapandığı gözlenmiştir. Bu nedenle, kumarin türevleri ile moleküler yanaştırma analizleri *T. annulata* enolazının kapalı konformasyon modeli ile gerçekleştirilmiştir ve bu model üzerindeki potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri DogSiteScorer yazılımı [107] ile öngörülmüştür. Potansiyel ilaç bağlanma bölgelerinden P0, P1 ve P2'nin sırasıyla 0,82; 0,81; 0,69 olmak üzere en yüksek ilaç skorlarına sahip oldukları belirlenmiştir. Şekil 3. 37'de gösterildiği gibi aktif bölge dışındaki P0 ve P2 bölgelerine en yüksek inhibisyonun görüldüğü kumarin türevleri ile yanaştırma yapılmıştır.



Şekil 3. 37 *TaENO*'nun potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri (a) P0 bölgesi mavi renk ile gösterilmiştir. (b) P2 bölgesi yeşil renk ile gösterilmiştir.

Yapılan tez çalışmasındaki moleküler yanaştırma analizlerinde kullanılan her bir programın (Molegro Virtual Docker, AutoDockVina, Schrödinger Glide) farklı skarlama yöntemlerinin olduğu görülmektedir. Maestro Molecular Modeling Interface 11. 1 (Schrödinger Release 2017-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) içerisinde protein hazırlama, reseptör alanı belirleme, ligand hazırlama, yanaştırma analizleri (Schrödinger Glide) ve skarlama fonksiyonlarının birleştirilmiş olması büyük bir kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Bu program ile sabit bir skor değerinin dışında MM/GBSA yöntemi ile ΔG bağlanma enerjisi skoru da hesaplanabilmektedir. Bağlanma enerjisi değerleri dikkate alınarak belirlenen skorların kumarin türevleri ile yapılan inhibisyon analizi sonuçlarına benzer olabileceği öngörülmüştür. Bu nedenle, tez çalışmasının kumarin türevleri ile yanaştırma analizi aşamasında Schrödinger Glide programı kullanılmıştır.

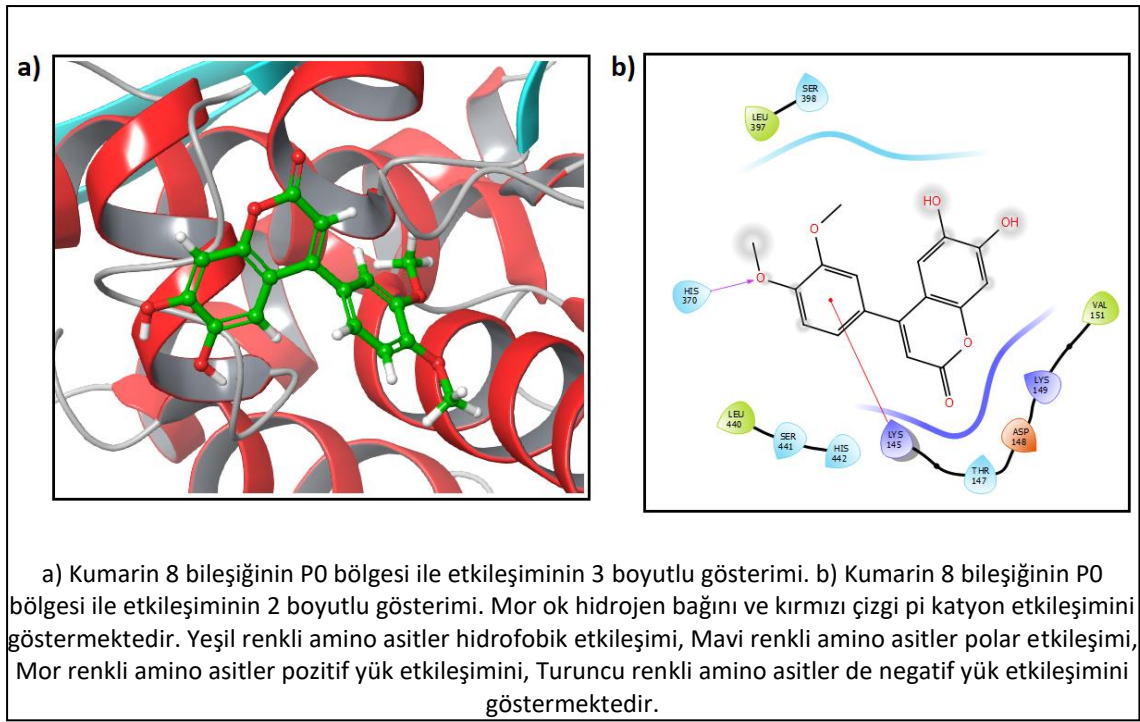
Yüksek inhibisyonun görüldüğü dört farklı kumarin türevinin (K8, K9, K21, K23) P0 bölgesi ile yanaştırması yapılmıştır. Bütün kumarin türevleri için XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi belirlenmiştir. Çizelge 3. 15'te görüldüğü gibi K9 kumarin türevi ($IC_{50} = 13,170 \mu M$) P0 bölgesinde -4.362 kcal/mol XP-Gskoru ile en iyi bağlanma skoruna sahiptir. Ancak, en düşük ikinci IC_{50} değerine ($10,450 \mu M$) sahip olan K8 kumarin türevi, $-29,373$ kcal/mol ile en yüksek ΔG bağlanma enerji değerine sahiptir. ΔG bağlanma enerjisi değeri, bu çalışmada *in vitro* analizlere benzer olması nedeniyle *TaENO*'nun P0 bölgesine yanaştırma analizlerini doğrulamıştır. XP-Hidrojen bağı skoruna göre bu bileşikler kıyaslandığında en yüksek potansiyel hidrojen bağı

etkileşimin K21 (-1,807 kcal/mol) bileşiğinde olduğu görülmektedir. K8 bileşiğinin XP-Hidrojen bağı skorunun -1,589 kcal/mol olması yapısında metoksi grubundan kaynaklı olabileceğinin yanı sıra K9 (-1,342 kcal/mol) ve K23 (-1,440 kcal/mol) kumarin türevlerine göre hidrojen bağı yapma potansiyelinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum K21 kumarin türevi ile kıyaslandığında K8 bileşiğinin enzimin bu bölgesinde yaptığı E_{coul} ve E_{vdw} etkileşimlerin hidrojen bağından daha fazla olduğunu göstermektedir.

K8 kumarin türevinin bu bölge ile etkileşimi incelendiğinde His370 amino asidi ile hidrojen bağı ve Lys145 amino asidi ile pi katyon etkileşimi yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca Thr147, His370, Ser398, Ser441, His442 amino asitleri ile polar etkileşimi; Lys145, Lys 149 amino asitleri ile pozitif yük, Asp148 amino asidi ile negatif yük etkileşimi; Val151, Leu397, Leu440 amino asitleri ile hidrofobik etkileşim içerisinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 3. 38).

Çizelge 3. 15 Belirlenen kumarin türevlerinin P0 bölgesi ile yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi

Kumarin Numarası	XP-Gscore (kcal/mol)	XP-Hidrojen bağı skoru (kcal/mol)	MM/GBSA ΔG bağlanma enerjisi (kcal/mol)
K8	-3,017	-1,589	-29,373
K9	-4,362	-1,342	-24,643
K21	-3,685	-1,807	-22,008
K23	-4,102	-1,440	-26,932



Şekil 3. 38 Kumarin 8 bileşiğinin *TaENO*'nun P0 bölgesi ile etkileşimi.

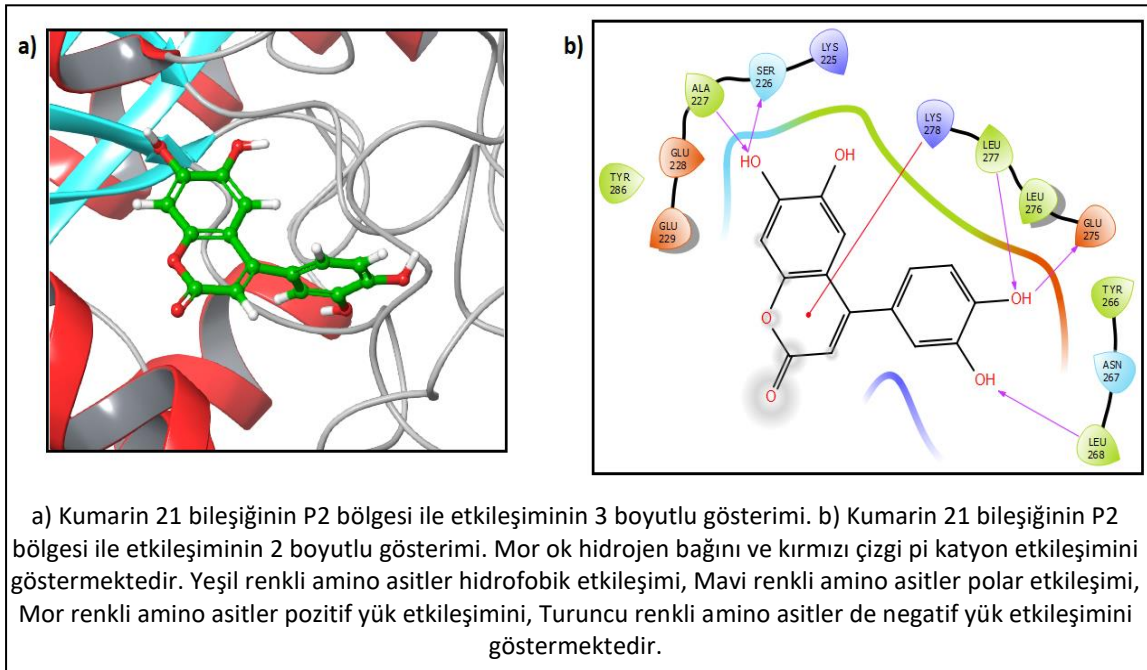
Dört farklı kumarin türevinin yabancı tip *TaENO*'da P2 bölgesi ile moleküler yanaştırması da yapılmıştır. Çizelge 3. 16'da görüldüğü gibi, *in vitro* analizler sonucunda en düşük IC_{50} değerine (8,871 μ M) sahip K21 kumarin türevi, P2 bölgesindeki yanaştırma analizleri sonucunda en yüksek XP-Gscore (-6,847 kcal/mol) ve ΔG bağlanma enerjisi değerine (-42,535 kcal/mol) sahiptir (Şekil 3. 39). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, P2 bölgesinin *TaENO* üzerinde güçlü bir bağlanma yeri olduğu görülmektedir. XP-Hidrojen bağı skoruna göre bu bileşikler kıyaslandığında en yüksek potansiyel hidrojen bağı etkileşimin K8 (-2,686 kcal/mol) ve K23 (-1,642 kcal/mol) bileşiğinde olduğu görülmektedir. Bu durum K8 ve K23 kumarin türevi ile kıyaslandığında K21 (-0,960 kcal/mol) bileşiğinin enzimin bu bölgesinde yaptığı E_{coul} ve E_{vdW} etkileşimlerin hidrojen bağından daha fazla olduğunu ve bu etkileşimlerin sonucunda hesaplanan ΔG bağlanma enerjisi ile daha yüksek bağlanma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 3. 39'da görüldüğü gibi bu bölgede K21 kumarin türevinin bu bölge ile etkileşimi incelendiğinde Ser226, Ala227, Leu268, Glu275, Leu277 amino asidi ile hidrojen bağı ve Lys278 amino asidi ile pi katyon etkileşimi yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca Ser226, Asn267 amino asitleri ile polar etkileşimi; Lys225, Lys 278 amino asitleri ile pozitif yük, Glu228,

Glu229, Glu275 amino asidi ile negatif yük etkileşimi; Ala227, Tyr266, Leu268, Leu276, Leu277, Tyr286 amino asitleri ile hidrofobik etkileşim içerisinde olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3. 16 Belirlenen kumarin türevlerinin P2 bölgesi ile yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi

Kumarin Numarası	XP-Gscore (kcal/mol)	XP-Hidrojen bağı skoru (kcal/mol)	MM/GBSA ΔG bağlanma enerjisi (kcal/mol)
K8	-5,871	-2,686	-36,001
K9	-5,774	-0,960	-40,454
K21	-6,847	-0,960	-42,535
K23	-5,157	-1,642	-35,907



Şekil 3. 39 Kumarin 21 bileşiğinin *TaENO*'nun P2 bölgesi ile etkileşimi.

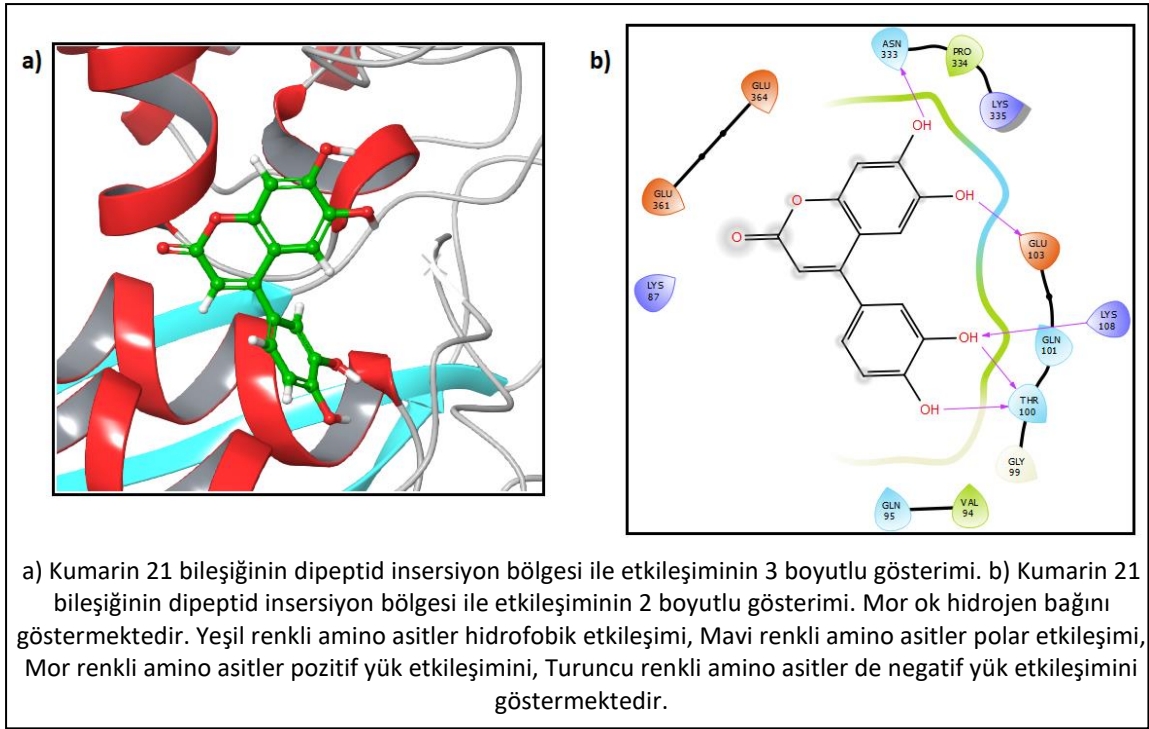
P0 ve P2 bölgeleri dışında karşılaştırmalı protein dizi analizi ile tespit edilen dipeptid (₂₆₂EK₂₆₃) ve pentapeptid (₁₀₃EWGYC₁₀₇) insersiyonun bulunduğu bölgeler de *TaENO* üzerindeki potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri olarak belirlenmiştir. Konak *Bos taurus* enolazında bu dizilerin yer almaması nedeniyle bileşiklerin bu bölgelerle etkileşime girmesinin ilacın parazite yönelik spesifikliğini arttıracakları öngörülmektedir. Bu amaçla; belirlenen kumarin türevleri ile bu bölgelerin moleküler yanaştırması yapılarak bileşiklerin bağlanma potansiyelleri belirlenmiştir. Dipeptid insersiyon bölgesi üzerinde

yapılan analizlere göre; -31,606 kcal/mol ΔG bağlanma enerjisi ve -4,801 kcal/mol XP-Gscore ile bu bölgeye en iyi bağlanma potansiyeli bulunan bileşiğin K21 kumarin türevi ($IC_{50} = 8,871 \mu M$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3. 17). Elde edilen bu sonuçlar *in vitro* analizlerle kıyaslandığında dipeptid insersiyonun bulunduğu bölgenin TaENO üzerindeki diğer bir güçlü muhtemel bağlanma bölgesi olduğu görülmektedir. XP-Hidrojen bağı skoruna göre bu bileşikler kıyaslandığında en yüksek potansiyel hidrojen bağı etkileşimin K9 (-2,252 kcal/mol) ve K21 (-2,036 kcal/mol) bileşiğinde olduğu görülmektedir. Bu durum K21 kumarin türevinin enzimin bu bölgesinde yaptığı hidrojen bağı, E_{coul} ve E_{vdw} etkileşimlerin yüksek olduğunu ve hesaplanan ΔG bağlanma enerjisi ile diğer kumarin türevlerine göre dipeptid insersiyonun bulunduğu cep bölgesine daha yüksek bağlanma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

Dipeptid insersiyon bölgesinde K21 kumarin türevinin etkileşimi incelendiğinde Thr100, Glu103, Lys108, Asn333 amino asitleri ile hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Bu bileşiğin Gln95, Thr100, Gln101, Asn333 amino asitleri ile polar, Val94 ve Pro334 ile hidrofobik etkileşim içerisinde olduğu gösterilmektedir. Ayrıca, bu bölgede K21 kumarin türevinin Glu103, Glu361, Glu364 amino asitleri ile negatif yük, Lys87, Lys108, Lys335 amino asitleri ile pozitif yük etkileşimi içerisinde olduğu gösterilmiştir (Şekil 3. 40).

Çizelge 3. 17 Belirlenen kumarin türevlerinin dipeptid insersiyonun bulunduğu cep bölgesi ile yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi

Kumarin Numarası	XP-Gscore (kcal/mol)	XP-Hidrojen bağı skoru (kcal/mol)	MM/GBSA ΔG bağlanma enerjisi (kcal/mol)
K8	-3,532	-0,960	-20,667
K9	-4,665	-2,252	-25,513
K21	-4,801	-2,036	-31,606
K23	-3,157	-0,283	-25,537



Şekil 3. 40 Kumarin 21 bileşiğinin *TaENO* üzerindeki dipeptid insersiyon bölgesi ile etkileşimi.

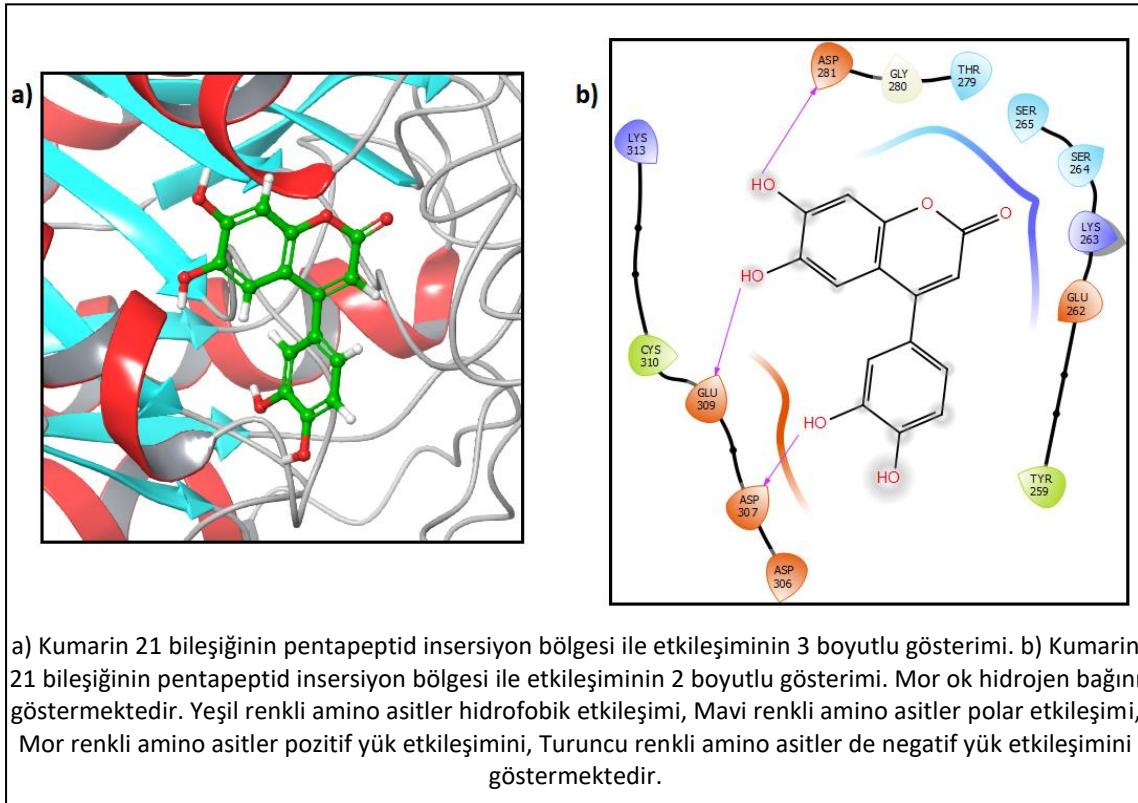
Belirlenen kumarin türevlerinin yabancı tip *TaENO*'da pentapeptid insersiyonun bulunduğu cep bölgesi ile moleküler yanaştırması da yapılmıştır. Çizelge 3. 18'de görüldüğü gibi -5,226 kcal/mol XP-Gscore ile K9 kumarin türevinin ($IC_{50} = 13.170 \mu M$) ve -34,563 kcal/mol ΔG bağlanma enerjisi ile de K21 kumarin türevinin ($IC_{50} = 8,871 \mu M$) bu bölgede en iyi bağlanma skorlarına sahip olduğu belirlenmiştir. ΔG bağlanma enerji değerleri göz önüne alındığında *in vitro* analizlerde olduğu gibi K21 kumarin türevinde en iyi skor gözlendiğinden bu bölgenin muhtemel potansiyel bölgesi olduğu doğrulanmıştır. XP-Hidrojen bağı skoruna göre bu bileşikler kıyaslandığında en yüksek potansiyel hidrojen bağı etkileşimin K9 (-2,516 kcal/mol) ve K23 (-2,036 kcal/mol) bileşiğinde olduğu görülmektedir. Bu durum K9 ve K23 kumarin türevi ile kıyaslandığında K21 bileşiğinin enzimin bu bölgesinde yaptığı E_{coul} ve E_{vdw} etkileşimlerin hidrojen bağından daha fazla olduğunu görülmektedir.

Pentapeptid insersiyon bölgesinde K21 kumarin türevi Asp281, Asp307, Glu309 amino asitleri ile hidrojen bağı yapmaktadır. Bu bileşiğin Ser264, Ser265, Thr279 amino asitleri ile polar, Tyr259 ve Cys310 ile hidrofobik etkileşim içerisinde olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu bölgede K21 kumarin türevinin Glu262, Asp281, Asp306, Asp307, Glu309

amino asitleri ile negatif yük, Lys263 ve Lys313 amino asitleri ile pozitif yük etkileşimi içerisinde olduğu gösterilmiştir (Şekil 3. 41).

Çizelge 3. 18 Belirlenen kumarin türevlerinin pentapeptid insersiyonun bulunduğu cep bölgesi ile yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore, XP-Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerjisi

Kumarin Numarası	XP-Gscore (kcal/mol)	XP-Hidrojen bağı skoru (kcal/mol)	MM/GBSA ΔG bağlanma enerjisi (kcal/mol)
K8	-2,964	-0,000	-28,702
K9	-5,226	-2,516	-31,568
K21	-3,360	-0,960	-34,563
K23	-5,130	-2,036	-29,165



Şekil 3. 41 Kumarin 21 bileşiğinin *Ta*ENO üzerindeki pentapeptid insersiyon bölgesi ile etkileşimi.

Moleküler yanaştırma analizleri sonucunda her bir kumarin türevi için XP-Gscore'ları ve ΔG bağlanma enerjileri gösterilmiştir (Çizelge 3. 19 ve Çizelge 3. 20). Bu skorlar ile her bir kumarin türevinin kendi içerisinde belirlenen bağlanma bölgeleri ile etkileşimi

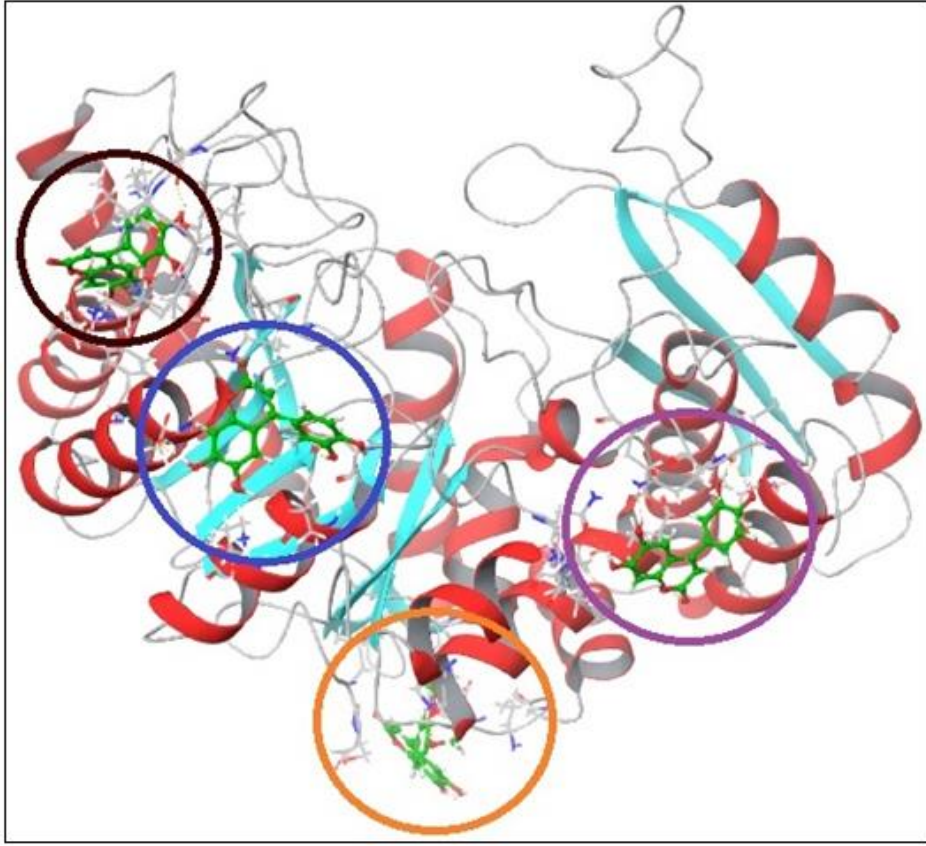
kıyaslanmıştır. Şekil 3. 42’de *Ta*ENO üzerinde belirlenen tüm bölgelerin en iyi ΔG bağlanma enerjisi olan kumarin türevleri ile etkileşimi gösterilmiştir. Bölge bazında incelendiğinde XP-Gscore’larına göre K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevleri için sırasıyla -5,871, -5,774, -6,847 ve -5,157 kcal/mol ile tüm kumarin türevlerinin P2 bölgesine en yüksek bağlanma olasılığının olduğu görülmektedir. Aynı şekilde ΔG bağlanma enerjilerine göre incelendiğinde ise K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevleri için sırasıyla -36,001, -40,454, -42,535 ve -35,907 kcal/mol ile tüm kumarin türevlerinin yine P2 bölgesine bağlanma olasılığının en yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan *in vitro* analizler ile birlikte ilaç adayı olan bu kumarin türevleri için P2 bölgesinin ilaç bağlanma bölgesi olarak önemli olduğu ve sonraki çalışmalarda daha ileri düzeyde analiz edilmesi gerektiği öngörülmektedir.

Çizelge 3. 19 Kumarin türevlerinin belirlenen bölgelere yanaştırma sonucu elde edilen XP-Gscore skorları

XP-Gscore (kcal/mol)				
Kumarin Türevi	P0 bölgesi	P2 bölgesi	Dipeptid insersiyonunun bulunduğu bölgeler	Pentapeptid insersiyonunun bulunduğu bölgeler
K8	-3,017	-5,871	-3,532	-2,964
K9	-4,362	-5,774	-4,665	-5,226
K21	-3,685	-6,847	-4,801	-3,360
K23	-4,102	-5,157	-3,157	-5,130

Çizelge 3. 20 Kumarin türevlerinin belirlenen bölgelere yanaştırma sonucu elde edilen ΔG bağlanma enerjileri

MM/GBSA ΔG bağlanma enerjisi (kcal/mol)				
Kumarin Türevi	P0 bölgesi	P2 bölgesi	Dipeptid insersiyonunun bulunduğu bölgeler	Pentapeptid insersiyonunun bulunduğu bölgeler
K8	-29,373	-36,001	-20,667	-28,702
K9	-24,643	-40,454	-25,513	-31,568
K21	-22,008	-42,535	-31,606	-34,563
K23	-26,932	-35,907	-25,537	-29,165



Turuncu bölge: P0 bölgesi (K8 kumarin türev ile), Kahverengi bölge: P2 bölgesi (K21 kumarin türev ile), Mor bölge: dipeptid insersiyon bölgesi (K21 kumarin türev ile), Lacivert bölge: Pentapeptid insersiyon bölgesi (K21 kumarin türev ile).

Şekil 3. 42 *Ta*ENO üzerinde belirlenen tüm bölgelerin seçilen kumarin türevleri ile gösterimi.

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar ve İleri Çalışmalara Yönelik Öneriler

T. annulata enfeksiyonunun tedavisinde yeni bir ilaç adayı belirlemek amacıyla, literatürde ilk defa gerçekleştirilen bu çalışmada 38 adet kumarin türevinin *Ta*ENO aktivitesini inhibisyon potansiyelleri araştırılmıştır. İlk olarak bu enzim Ni-NTA agaroz kolon dolgu maddesi kullanılarak yapılan afinite kromatografisi ile *Ta*ENO genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden yaklaşık % 95 saflık oranında elde edilmiştir. Daha sonra inhibisyon çalışmalarının doğru bir şekilde yürütülebilmesi için saflaştırılan *Ta*ENO'nun stabilizasyon analizleri yapılmıştır. Stabilizatör olarak gliserol ve BSA kullanılan stabilizasyon analizinde belirli günlerde tek ölçüm aralığı (üçlü tekrar) ile yapılan enzim aktivite tayini sonucunda -20 °C'de % 10 gliserol eklenerek hazırlanan enzim çözeltisinin aktivitesinin stabil kaldığı gözlenmiştir. Ancak, yapılan ön inhibisyon çalışmalarda enzimin -20 °C'den çıkarılarak +4 °C'de bekletilmesi ile zaman içerisinde tekrarlanan reaksiyonlarda enzim aktivitesinin arttığı ve bu değişimin IC₅₀ değerlerinde sapmalara yol açtığı görülmüştür. Bu nedenle farklı stabilizatörler ile *Ta*ENO'nun stabilizasyon çalışmaları tekrarlanmıştır. Gliserol ve BSA'dan farklı stabilizatörler kullanılarak yapılan analizler sonucunda inhibisyon çalışmaları için bu enzimi saklamanın en uygun koşulunun +4 °C'de 6 M etilen glikol eklenmesi ile olduğu tespit edilmiştir.

İleri inhibisyon analizlerine geçildiğinde belirlenen saflaştırma protokolü ile yapılan afinite kromatografisi deneyleri sonucunda SDS-PAGE jelinde sebebi tespit edilemeyen ek bir bant gözlenmiştir. Böylece saflaştırma protokolünün optimizasyonu için çok farklı uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma koşullarında, solüsyonlardaki tuz konsantrasyonu, kolon dolgu maddesi miktarı, kimyasal ilaveleri, gliserol ilaveleri gibi değişkenler belirli ölçülerde değiştirilerek yapılan 12 farklı saflaştırma analizi sonucunda enzim saf olarak elde edilememiştir ve % 95 saflık oranına ulaşan en uygun saflaştırma protokolünün ticari TALON® kolonu ile gerçekleştirilen afinite kromatografisi olduğu tespit edilmiştir. Daha sonraki *Ta*ENO'nun kumarin türevleri ile inhibisyon analizlerinde bu protokol ile saflaştırılan enzim kullanılmıştır.

Kumarin türevlerinin saf olarak elde edilen *Ta*ENO aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve 100 µM kumarin konsantrasyonundaki yüzde inhibisyon değerlerine göre %90 ve üzeri inhibisyonun gözlemlendiği 5 farklı (K5, K8, K9, K21 ve K23) kumarin türevi aktif bileşikler olarak tespit edilmiştir. Belirlenen bileşikler ile en az 5 farklı konsantrasyonda yapılan analizler sonucunda IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. *Ta*ENO üzerinde K5, K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 27,910 µM, 10,450 µM, 13,170 µM, 8,871 µM ve 10,863 µM olduğu tespit edilmiştir. Literatürde parazit enolazları üzerinde düşük inhibisyonun görüldüğü çok fazla çalışma yer almamaktadır. 2016 yılında yayımlanan sıtma paraziti *Plasmodium falciparum*'un enolazı ile yapılan bir çalışmada, biliverdin bileşiğinin 27±4 µM IC₅₀ değerinde enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir [139]. Yapılan çalışmada belirlenen K8, K9, K21 ve K23 kumarinin türevlerinin *T. annulata* enolazını diğer parazit enolazına kıyasla çok daha düşük IC₅₀ değerlerinde inhibe ettiği görülmektedir.

İlaç adayı olma yönünde düşük IC₅₀ değerlerinin görüldüğü bileşiklerin *Ta*ENO üzerinde enzim inhibisyon mekanizmaları çalışılmıştır. Yapılan analizler sonucunda dört farklı kumarin türevinin (K8, K9, K21 ve K23) de *Ta*ENO üzerinde yarışmasız inhibisyon mekanizmasına sahip olduğu görülmüştür. Hesaplanan inhibisyon sabiti, AlphaK_i değerleri K8, K9, K21, K23 kumarin türevleri için sırasıyla 0,5978 µM, 3,551 µM, 0,4235 µM ve 0,3224 µM olarak belirlenmiştir. Böylece bu bileşiklerin *Ta*ENO'yu yarışmasız inhibisyon mekanizması ile enzim-substrat kompleksine bağlanarak inhibe ettiği görülmüştür. İlaç adayı olarak incelendiğinde yarışmasız inhibitörler, hedef enzimlerin

fizyolojik koşullarındaki deneylerinde bazı durumlarda klinik avantajlar sunabilmektedir. Yarışmasız inhibisyon yüksek substrat konsantrasyonları ile aşılamamaktadır ve bu özelliğinden dolayı yarışmasız inhibitörler doygun substrat konsantrasyonlarında uygulanabilecek en iyi inhibitörler olarak görülmektedir [140]. Klinik amaçla kullanılan UDP-glukuronil transferaz enzimini inhibe eden valproik asit, kanser uygulamalarında kullanılan topoizomeras 1 enzimini inhibe eden kamptotesin yarışmasız inhibitörlere örnek olarak gösterilebilmektedir [140]. İlaç tasarımı doğrultusunda yarışmasız inhibitör olarak belirlenen kumarin türevlerinin prelinik ve klinik uygulamalarının gerçekleştirilmesiyle ileriki dönemlerde bu hastalığın tedavisi için kullanılabileceği öngörülmektedir.

Ticari bir enolaz inhibitörü olan ENOblock® bileşiği ile *Ta*ENO üzerinde enzim inhibisyon potansiyeli analizleri de gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 100 µM ENOblock® konsantrasyonu ile yapılan analizde dahi %inhibisyon değeri % 15,04 olarak tespit edilmiştir. Böylece bu bileşiğin *Ta*ENO üzerinde çok düşük bir inhibisyon potansiyelinin olduğu görülmüştür. Ayrıca, 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada insan hücre enolazları (ENO1 ve ENO2) üzerinde ENOblock® bileşiği inhibitör olarak analiz edilmiştir ve 500 µM'lık konsantrasyona kadar analiz edilen bu bileşiğin ENO1 ve ENO2 enzimlerini inhibe etmediği gösterilmiştir [141]. Bu bilgiler doğrultusunda literatürdekine benzer şekilde *Ta*ENO üzerinde de bu bileşiğin inhibitör özelliğinin olmadığı belirlenmiştir.

Kumarin ile *Ta*ENO'nun bağlanma potansiyelinin tespit edilmesi amacıyla MALDI-TOF kütle spektroskopisi analizleri yapılmıştır. İlk olarak afinite kromatografisi ile saflaştırılan *Ta*ENO'nun kütle spektroskopisi analizi yapılmış ve saf enzimin molekül kütlelerinin 48,8 kDa olduğu belirlenmiştir. *Ta*ENO üzerinde en iyi inhibisyon potansiyelinin tespit edildiği K21 kumarin türevi ile bu enzim etkileştirilerek de kütle spektroskopisi analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda, 100 ve 200 µM K21 kumarin türevini içeren enzim çözeltilerinin kütle spektrumları +1 iyonları baz alınarak hesaplandığında; 100 µM'lık çözeltide 2 adet K21 kumarinin enzime bağlandığı ve 200 µM çözeltide de yaklaşık 5 adet K21 kumarinin enzime bağlandığı görülebilmektedir. Böylece, bu kumarin türevinin *Ta*ENO'ya yüksek afinite ile bağlandığı doğrulanmıştır. İleriki çalışmalarda da MALDI-TOF/TOF ikili kütle spektroskopisi analizleri yapılarak K21

kumarin türevinin hangi peptid dizisine bağlandığının da belirlenebileceği öngörülmektedir.

*Ta*ENO'nun yapısal özelliklerinin tahmin edilebilmesi için öncelikle protein dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda literatür çalışmaları temel alınarak belirlenen Ala40, Ser41, His165, Gln173, Glu174, Glu217, Asp252, Glu300, Asp327, Lys352, His380, Arg381, Ser382, Lys403 amino asit rezidülerinin reaksiyonun gerçekleşmesinde, 2-PG substratının ve Mg^{+2} iyonlarının bağlanmasında etkin olan katalitik rezidüler olduğu belirlenmiştir. Ayrıca potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri olduğu öngörülen pentapeptid (₁₀₃EWGYC₁₀₇) ve dipeptid (₂₆₂EK₂₆₃) insersiyon bölgeleri belirlenmiştir. Daha sonra *Ta*ENO'nun üç boyutlu protein modelinin tahmin edilmesi için açık ve kapalı konformasyonlarının literatürde ilk defa homoloji modellemesi yapılmıştır. Elde edilen açık ve kapalı konformasyon modellerinin süperimpozisyonu incelendiğinde substrat bağlanması sonucunda üç farklı hareketli halka bölgesinin enzimin merkezine doğru hareket etmekte olduğu ve kapalı bir aktif bölge cebi oluşturduğu görülmektedir. *T. annulata* enolazının bu katalitik halka bölgelerinin halka1 için Cys36-Arg57, halka2 için His165-Gln173 ve halka3 için Phe258-Thr279 amino asitleri arasında olduğu tespit edilmiş ve Mg^{+2} iyonu ve 2-PG substratının bağlanmasında önemli rolleri olduğu belirlenmiştir.

Moleküler yanaştırma analizlerinde ilk olarak *Ta*ENO'nun kapalı konformasyonunda belirlenen aktif bölge cebine 2-PG substratının yanaştırması yapılmıştır. Molegro Virtual Docker programından elde edilen MolDock skortlama fonksiyonuna göre 2-PG'nin bu bölgede en iyi yanaştırma skoruna sahip pozisyonu -71.76 kcal/mol'dür. AutoDockVina programı ile de 2-PG için sekiz farklı bağlanma modu öngörülmüştür ve en yüksek bağlanma skoruna sahip en iyi pozisyon -5.5 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Ayrıca yapılan her iki analizde de Ala40, Ser41, His165, Lys352, His380, Arg381 ve Ser382 amino asit rezidülerinin 2-PG substratına potansiyel olarak hidrojen bağı ile bağlandığı öngörülmüştür.

Kumarin türevleri ile yapılan analizler sonucunda bu bileşiklerin *Ta*ENO üzerindeki inhibisyon mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle *Ta*ENO'nun kapalı konformasyon modelinde aktif bölge dışındaki potansiyel ilaç

bağlanma bölgeleri DogSiteScorer yazılımı analizleri sonucunda 0,82 ilaç skoru ile P0 ve 0,69 ilaç skoru ile P2 bölgeleri olarak belirlenmiştir. Bu bölgeler dışında protein dizi analizi ile dipeptid ve pentapeptid insersiyonun bulunduğu bölgeler de muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri olarak öngörülmüştür. Schrödinger Glide XP-Gscore yöntemi kullanılarak belirlenen dört kumarin türevinin (K8,K9,K21,K23) bu bölgelere yanaştırma analizleri gerçekleştirilmiştir. XP-Gscore, XP- Hidrojen bağı ve ΔG bağlanma enerji değerleri belirlenmiştir. *In vitro* analizler ile kıyaslanarak yapılan çalışma doğrultusunda P0 bölgesine -29.373 kcal/mol ΔG bağlanma enerji değeri ile K8 kumarin türevinin, -42.535 kcal/mol, -31.606 kcal/mol, -34.563 kcal/mol ΔG bağlanma enerji değerleri ile sırasıyla P2, dipeptid ve pentapeptid insersiyon bölgelerine ise K21 kumarin türevinin en iyi bağlanma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir. XP-Gscore değerine göre kıyaslandığında ise P2 bölgesinin en iyi muhtemel bağlanma bölgesi olduğu öngörülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar ile belirlenen bölgelerin *Ta*ENO üzerinde güçlü birer potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri olduğunu doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, yapılan tez çalışmasında literatürde ilk defa *Ta*ENO aktivitesinin inhibisyonu için yüksek inhibisyon potansiyeline sahip (IC_{50} : 10,450 μM , 13,170 μM , 8,871 μM ve 10,863 μM), substrat analogu olmayan yarışmasız inhibitörler olarak K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevleri belirlenmiştir. Yapıya dayalı ilaç tasarımı doğrultusunda güçlü *Ta*ENO inhibitörleri olarak bu kumarin türevlerinin belirlenmesi ileriki *in vitro* ve *in vivo* analizlerin önünü açmıştır.

Öneriler:

- *Ta*ENO'nun 3 boyutlu yapısı X-ışınları kristalografisi yöntemi ile belirlenmelidir.
- *Ta*ENO inhibitörleri olarak belirlenen kumarin türevlerinin bağlanma bölgelerinin peptid dizileri MALDI-MALDI-TOF analizi ile gösterilmelidir.
- X-ışınları kristalografisi yöntemi ile belirlenen kumarin türevlerinin enzimin yapısı ile etkileşimi gösterilmelidir.
- K8, K9, K21, K23 kumarin türevlerinin yapılan çalışma ile literatürde ilk defa *Ta*ENO inhibitörleri olarak belirlenmesine rağmen daha düşük IC_{50} değerinde inhibitörlerin tespit edilmesi için yapı aktivite çalışmaları yapılarak kumarin türevleri sentezlenebilir.

- *Ta*ENO üzerinde belirlenen insersiyon bölgelerinin mutasyon analizleri yapılarak enzim aktivitesi üzerindeki önemi belirlenmelidir.
- *Ta*ENO inhibitörleri olarak belirlenen kumarin türevleri ile hücre kültürü çalışmaları yapılarak prelinik ve sitotoksik analizleri gerçekleştirilmelidir.
- Prelinik çalışmaların başarılı olması halinde deney hayvanları üzerinde bu inhibitörler denenerek *in vivo* analizleri gerçekleştirilmelidir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Abdela, N. ve Bekele, T., (2016). "Bovine theileriosis and its control: a review", *Advances in Biological Research*, 10: 200-212.
 - [2] Echebli, N. Mhadhbi, M. Chaussepied, M. Vayssettes, C. Di Santo, J.P. Darghouth, M.A. ve Langsley, G., (2014). "Engineering Attenuated Virulence of a *Theileria annulata*-Infected Macrophage", *PLoS neglected tropical diseases*, 8: e3183.
 - [3] Li, Y. Liu, Z. Yang, J. Chen, Z. Guan, G. Niu, Q. Zhang, X. Luo, J. ve Yin, H., (2014). "Infection of small ruminants and their red blood cells with *Theileria annulata* schizonts", *Experimental parasitology*, 137: 21-24.
 - [4] Aysul, N. Karagenç, T. Eren, H. Aypak, S. ve Bakırcı, S., (2008). "Aydın ili sığırlarında tropikal theileriosisin yaygınlığı ve *Theileria annulata* şizont aşısının sahada etkinliğinin değerlendirilmesi", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32: 322-327.
 - [5] Cicek, H. Cicek, H. Eser, M. ve Tandogan, M., (2009). "Current status of ruminant theileriosis and its economical impact in Turkey", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33: 273-279.
 - [6] Paşa, S., (2008). "Theileriosisli Sığırlarda Buparvaquone (Buparvon)'un Terapotik Etkinliği", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32: 317-321.
 - [7] Mhadhbi, M. Naouach, A. Boumiza, A. Chaabani, M.F. BenAbderazzak, S. ve Darghouth, M.A., (2010). "In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone", *Veterinary parasitology*, 169: 241-247.
 - [8] Sharifiyazdi, H. Namazi, F. Oryan, A. Shahriari, R. ve Razavi, M., (2012). "Point mutations in the *Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure", *Veterinary parasitology*, 187: 431-435.
 - [9] Marsolier, J. Perichon, M. DeBarry, J. Villoutreix, B. Chluba, J. Lopez, T. Garrido, C. Zhou, X. Lu, K. ve Fritsch, L., (2015). "*Theileria* parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte transformation", *Nature*, 520: 378-382.
 - [10] Anderson, A.C., (2003). "The process of structure-based drug design", *Chemistry & biology*, 10: 787-797.

- [11] Díaz-Ramos, À. Roig-Borrellas, A. García-Melero, A. ve López-Aleman, R., (2012). "α-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations", BioMed Research International, 2012.
- [12] Avilán, L. Gualdrón-López, M. Quiñones, W. González-González, L. Hannaert, V. Michels, P.A. ve Concepción, J.-L., (2011). "Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites—perspectives for its use as a therapeutic target", Enzyme research, 2011.
- [13] Paludo, G.P. Lorenzatto, K.R. Bonatto, D. ve Ferreira, H.B., (2015). "Systems biology approach reveals possible evolutionarily conserved moonlighting functions for enolase", Computational biology and chemistry, 58: 1-8.
- [14] Ruan, J. Mouveaux, T. Light, S.H. Minasov, G. Anderson, W.F. Tomavo, S. ve Ngô, H.M., (2015). "The structure of bradyzoite-specific enolase from *Toxoplasma gondii* reveals insights into its dual cytoplasmic and nuclear functions", Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 71: 417-426.
- [15] Kiama, T. Kiara, J. Konji, V. ve Musoke, A., (1999). "Enzymes of glucose and glycerol catabolism in in vitro-propagated *Theileria parva* schizonts", The Veterinary Journal, 158: 221-227.
- [16] Witschi, M. Xia, D. Sanderson, S. Baumgartner, M. Wastling, J. ve Dobbelaere, D., (2013). "Proteomic analysis of the *Theileria annulata* schizont", International journal for parasitology, 43: 173-180.
- [17] Nelson, D.L. ve Cox, M.M., (2008). Lehninger Principles of Biochemistry: Fifth Edition, W. H. Freeman and Company, New York.
- [18] Abenavoli, M. Cacco, G. Sorgona, A. Marabottini, R. Paolacci, A. Ciaffi, M. ve Badiani, M., (2006). "The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*, cv. *Simeto*) seeds", Journal of chemical ecology, 32: 489.
- [19] Brühlmann, C. Ooms, F. Carrupt, P.-A. Testa, B. Catto, M. Leonetti, F. Altomare, C. ve Carotti, A., (2001). "Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase", Journal of medicinal chemistry, 44: 3195-3198.
- [20] Belluti, F. Fontana, G. Dal Bo, L. Carenini, N. Giommarelli, C. ve Zunino, F., (2010). "Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents", Bioorganic & medicinal chemistry, 18: 3543-3550.
- [21] Felter, S. Vassallo, J. Carlton, B. ve Daston, G., (2006). "A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics", Food and Chemical Toxicology, 44: 462-475.
- [22] Mans, B.J. Pienaar, R. ve Latif, A.A., (2015). "A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology", International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 4: 104-118.

- [23] Bishop, R. Musoke, A. Morzaria, S. Gardner, M. ve Nene, V., (2004). "*Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks", *Parasitology*, 129: S271-S283.
- [24] Wilkie, G. Brown, C. Kirvar, E. Thomas, M. Williamson, S. Bell-Sakyi, L. ve Sparagano, O., (1998). "Chemoprophylaxis of *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of calves with buparvaquone", *Veterinary parasitology*, 78: 1-12.
- [25] Darghouth, M. Bouattour, A. ve Kilan, M., (1999). "Tropical theileriosis in Tunisia: epidemiology and control", *Parassitologia*, 41: 33-36.
- [26] Wang, J. Yang, X. Wang, Y. Jing, Z. Meng, K. Liu, J. Guo, H. Xu, R. ve Cheng, Z., (2014). "Genetic diversity and phylogenetic analysis of Tams1 of *Theileria annulata* isolates from three continents between 2000 and 2012", *Central-European journal of immunology*, 39: 476.
- [27] Aktas, M. Altay, K. ve Dumanli, N., (2006). "A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey", *Veterinary parasitology*, 138: 179-185.
- [28] Sayin, F. Dincer, S. Karaer, Z. Cakmak, A. Inci, A. Yukari, B. Eren, H. Vatansever, Z. ve Nalbantoglu, S., (2003). "Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle in Central Anatolia, Turkey", *Tropical animal health and production*, 35: 521-539.
- [29] Inci, A. Ica, A. Yildirim, A. Vatansever, Z. Çakmak, A. Albasan, H. Çam, Y. Atasever, A. ve Düzl ,  ., (2008). "Epidemiology of tropical theileriosis in the Cappadocia region", *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32: 57-64.
- [30] Schein, E. ve Voigt, W., (1979). "Chemotherapy of bovine theileriosis with Halofuginone", *Acta tropica*, 36: 391-394.
- [31] Dolan, T., (1989). "Theileriasis: a comprehensive review", *Revue Scientifique et Technique, Office International des  pizooties*, 8: 11-78.
- [32] Mbwambo, H. Mkonyi, P. ve Chua, R., (1987). "Field evaluation of parvaquone against naturally occurring East Coast fever", *Veterinary parasitology*, 23: 161-168.
- [33] Chema, S. Waghela, S. James, A. Dolan, T. Young, A. Masiga, W. Irvin, A. Mulela, G. ve Wekesa, L., (1986). "Clinical trial of parvaquone for the treatment of East Coast fever in Kenya", *Veterinary Record*, 118: 588-589.
- [34] Kinabo, L. ve Bogan, J., (1988). "Parvaquone and buparvaquone: HPLC analysis and comparative pharmacokinetics in cattle", *Acta tropica*, 45: 87-94.
- [35] Fry, M. Hudson, A. Randall, A. ve Williams, R., (1984). "Potent and selective hydroxynaphthoquinone inhibitors of mitochondrial electron transport in *Eimeria tenella* (Apicomplexa: Coccidia)", *Biochemical pharmacology*, 33: 2115-2122.

- [36] McHardy, N., (1985). Recent Developments in the Research and Control of *Theileria annulata*. , D.T. T., ed. Proceeding of a Workshop Held at Irlad. Nairobi, Kenya.
- [37] Pines, M. ve Spector, I., (2015). "Halofuginone—the multifaceted molecule", *Molecules*, 20: 573-594.
- [38] Mhadhbi, M. Chaouch, M. Ajroud, K. Darghouth, M.A. ve BenAbderrazak, S., (2015). "Sequence polymorphism of cytochrome b gene in *Theileria annulata* Tunisian isolates and its association with buparvaquone treatment failure", *PloS one*, 10: e0129678.
- [39] Hacılarlıoğlu, S., (2013). *Theileria annulata* Sitokrom b Geninde Mutasyonların Belirlenerek Buparvaquone Direnciyle İlişkisinin Araştırılması ve Aydın Çevresindeki Enfekte Sığırlarda Direncin Yaygınlığının Saptanması., Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı. Türkiye.
- [40] Bergmann, S. Wild, D. Diekmann, O. Frank, R. Bracht, D. Chhatwal, G.S. ve Hammerschmidt, S., (2003). "Identification of a novel plasmin (ogen)-binding motif in surface displayed α -enolase of *Streptococcus pneumoniae*", *Molecular microbiology*, 49: 411-423.
- [41] Ghosh, A.K. Coppens, I. Gårdsvoll, H. Ploug, M. ve Jacobs-Lorena, M., (2011). "*Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 17153-17158.
- [42] Bhowmick, I.P. Kumar, N. Sharma, S. Coppens, I. ve Jarori, G.K., (2009). "*Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization", *Malaria journal*, 8: 179.
- [43] Dzierszinski, F. Popescu, O. Toursel, C. Slomianny, C. Yahiaoui, B. ve Tomavo, S., (1999). "The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes implications for evolutionary origin of apicomplexans", *Journal of Biological Chemistry*, 274: 24888-24895.
- [44] Ji, H. Wang, J. Guo, J. Li, Y. Lian, S. Guo, W. Yang, H. Kong, F. Zhen, L. ve Guo, L., (2016). "Progress in the biological function of alpha-enolase", *Animal Nutrition*, 2: 12-17.
- [45] Lebioda, L. Stec, B. ve Brewer, J., (1989). "The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta+ alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha) 6 topology", *Journal of Biological Chemistry*, 264: 3685-3693.
- [46] Larsen, T.M. Wedekind, J.E. Rayment, I. ve Reed, G.H., (1996). "A carboxylate oxygen of the substrate bridges the magnesium ions at the active site of enolase: structure of the yeast enzyme complexed with the equilibrium mixture of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate at 1.8 Å resolution", *Biochemistry*, 35: 4349-4358.
- [47] Zhang, E. Brewer, J.M. Minor, W. Carreira, L.A. ve Lebioda, L., (1997). "Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase– 2-

phospho-d-glycerate/enolase– phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution", *Biochemistry*, 36: 12526-12534.

- [48] Qin, J. Chai, G. Brewer, J.M. Lovelace, L.L. ve Lebioda, L., (2012). "Structures of asymmetric complexes of human neuron specific enolase with resolved substrate and product and an analogous complex with two inhibitors indicate subunit interaction and inhibitor cooperativity", *Journal of inorganic biochemistry*, 111: 187-194.
- [49] Bisswanger, H., (2008). *Enzyme kinetics: principles and methods*. : Second Edition, John Wiley & Sons, Weinheim.
- [50] Taylor, K.B., (2002). *Enzyme Kinetics and Mechanisms*. , Vol: 64, Kluwer Academic Publishers, USA.
- [51] Frey, P.A. ve Hegeman, A.D., (2007). *Enzymatic Reaction Mechanisms*. , First Edition, Oxford University Press, New York.
- [52] Jain, P. ve Joshi, H., (2012). "Coumarin: Chemical and pharmacological profile", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02: 236-240.
- [53] Gacche, R.N. ve Jadhav, S.G., (2012). "Antioxidant activities and cytotoxicity of selected coumarin derivatives: preliminary results of a structure–activity relationship study using computational tools", *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 4: 165-169.
- [54] Danis, O. Yuce-Dursun, B. Gunduz, C. Ogan, A. Sener, G. Bulut, M. ve Yarat, A., (2010). "Synthesis of 3-amino-4-hydroxy coumarin and dihydroxy-phenyl coumarins as novel anticoagulants", *Arzneimittelforschung*, 60: 617-620.
- [55] Yuce, B. Danis, O. Ogan, A. Sener, G. Bulut, M. ve Yarat, A., (2009). "Antioxidative and lipid lowering effects of 7, 8-dihydroxy-3-(4-methylphenyl) coumarin in hyperlipidemic rats", *Arzneimittelforschung*, 59: 129-134.
- [56] Keri, R.S. Hosamani, K.M. Shingalapuri, R.V. ve Hugar, M.H., (2010). "Analgesic, anti-pyretic and DNA cleavage studies of novel pyrimidine derivatives of coumarin moiety", *European journal of medicinal chemistry*, 45: 2597-2605.
- [57] Tosun, F. Kızılay, Ç.A. Erol, K. Kılıç, F.S. Kürkçüoğlu, M. ve Başer, K.H.C., (2008). "Anticonvulsant activity of furanocoumarins and the essential oil obtained from the fruits of *Heracleum crenatifolium*", *Food chemistry*, 107: 990-993.
- [58] Kirkiacharian, S. Thuy, D.T. Sicsic, S. Bakhchinian, R. Kurkjian, R. ve Tonnaire, T., (2002). "Structure–activity relationships of some 3-substituted-4-hydroxycoumarins as HIV-1 protease inhibitors", *Il Farmaco*, 57: 703-708.
- [59] Cavasotto, C.N. ve Phatak, S.S., (2009). "Homology modeling in drug discovery: current trends and applications", *Drug discovery today*, 14: 676-683.
- [60] Bishop, A. De Beer, T.A. ve Joubert, F., (2008). "Protein homology modelling and its use in South Africa", *South African Journal of Science*, 104: 2-6.

- [61] Hillisch, A. Pineda, L.F. ve Hilgenfeld, R., (2004). "Utility of homology models in the drug discovery process", *Drug discovery today*, 9: 659-669.
- [62] Brooks, B.R. Bruccoleri, R.E. Olafson, B.D. States, D.J. Swaminathan, S.a. ve Karplus, M., (1983). "CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations", *Journal of computational chemistry*, 4: 187-217.
- [63] Šali, A. ve Blundell, T.L., (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints", *Journal of molecular biology*, 234: 779-815.
- [64] Eswar, N. Webb, B. Marti-Renom, M. Madhusudhan, M. Eramian, D. Shen, M. Pieper, U. ve Sali, A., (2006). "Comparative protein structure modeling using Modeller.", *Current Protocols In Bioinformatics*, 5: 1-30.
- [65] Biasini, M. Bienert, S. Waterhouse, A. Arnold, K. Studer, G. Schmidt, T. Kiefer, F. Cassarino, T.G. Bertoni, M. ve Bordoli, L., (2014). "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information", *Nucleic acids research*, 42: W252-W258.
- [66] Zhang, Y., (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction", *BMC bioinformatics*, 9: 40.
- [67] Colovos, C. ve Yeates, T.O., (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions", *Protein science*, 2: 1511-1519.
- [68] Lovell, S.C. Davis, I.W. Arendall, W.B. de Bakker, P.I. Word, J.M. Prisant, M.G. Richardson, J.S. ve Richardson, D.C., (2003). "Structure validation by α geometry: ϕ , ψ and $C\beta$ deviation", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 50: 437-450.
- [69] Wiederstein, M. ve Sippl, M.J., (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", *Nucleic acids research*, 35: W407-W410.
- [70] Wallner, B. ve Elofsson, A., (2003). "Can correct protein models be identified?", *Protein science*, 12: 1073-1086.
- [71] Ferreira, L.G. dos Santos, R.N. Oliva, G. ve Andricopulo, A.D., (2015). "Molecular docking and structure-based drug design strategies", *Molecules*, 20: 13384-13421.
- [72] Taylor, R.D. Jewsbury, P.J. ve Essex, J.W., (2002). "A review of protein-small molecule docking methods", *Journal of computer-aided molecular design*, 16: 151-166.
- [73] Kitchen, D.B. Decornez, H. Furr, J.R. ve Bajorath, J., (2004). "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications", *Nature reviews Drug discovery*, 3: 935-949.
- [74] Kroemer, R.T., (2007). "Structure-based drug design: docking and scoring", *Current protein and peptide science*, 8: 312-328.

- [75] Kapetanovic, I., (2008). "Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach", *Chemico-biological interactions*, 171: 165-176.
- [76] Sousa, S.F. Fernandes, P.A. ve Ramos, M.J., (2006). "Protein–ligand docking: current status and future challenges", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65: 15-26.
- [77] Gorelik, B. ve Goldblum, A., (2008). "High quality binding modes in docking ligands to proteins", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71: 1373-1386.
- [78] McGann, M., (2012). "FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets", *Journal of computer-aided molecular design*, 26: 897-906.
- [79] Ewing, T.J. Makino, S. Skillman, A.G. ve Kuntz, I.D., (2001). "DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases", *Journal of computer-aided molecular design*, 15: 411-428.
- [80] Friesner, R.A. Banks, J.L. Murphy, R.B. Halgren, T.A. Klicic, J.J. Mainz, D.T. Repasky, M.P. Knoll, E.H. Shelley, M. ve Perry, J.K., (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy", *Journal of medicinal chemistry*, 47: 1739-1749.
- [81] Morris, G.M. Goodsell, D.S. Huey, R. ve Olson, A.J., (1996). "Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4", *Journal of computer-aided molecular design*, 10: 293-304.
- [82] Thomsen, R. ve Christensen, M.H., (2006). "MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking", *Journal of medicinal chemistry*, 49: 3315-3321.
- [83] Venkatachalam, C.M. Jiang, X. Oldfield, T. ve Waldman, M., (2003). "LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 21: 289-307.
- [84] Huang, S.-Y. Grinter, S.Z. ve Zou, X., (2010). "Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12: 12899-12908.
- [85] Danis, O. Demir, S. Gunduz, C. Alparslan, M.M. Altun, S. ve Yuce-Dursun, B., (2016). "Synthesis of selected 3-and 4-aryl coumarin derivatives and evaluation as potent antioxidants", *Research on Chemical Intermediates*, 42: 6061-6077.
- [86] Cayir, E. Erdemir, A. Ozkan, E. Topuzogullari, M. Bolat, Z.B. Akat, A. ve Turgut-Balik, D., (2014). "Cloning of intron-removed enolase gene and expression, purification, kinetic characterization of the enzyme from *Theileria annulata*", *Molecular biotechnology*, 56: 689-696.
- [87] Laemmli, U.K., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685.

- [88] Chang, B. ve Mahoney, R., (1995). "Enzyme thermostabilization by bovine serum albumin and other proteins: evidence for hydrophobic interactions", *Biotechnology and applied biochemistry*, 22: 203-214.
- [89] Ramaley, R. ve Vasantha, N., (1983). "Glycerol protection and purification of *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase", *Journal of Biological Chemistry*, 258: 12558-12565.
- [90] Wang, D. Lu, M. Wang, X. Jiao, Y. Fang, Y. Liu, Z. ve Wang, S., (2014). "Improving stability of a novel dextran-degrading enzyme from marine *Arthrobacter oxydans* KQ11", *Carbohydrate polymers*, 103: 294-299.
- [91] Shoemark, D.K. Cliff, M.J. Sessions, R.B. ve Clarke, A.R., (2007). "Enzymatic properties of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*", *The FEBS journal*, 274: 2738-2748.
- [92] Nita, M. Raducan, A. Puiu, M. ve Oancea, D., (2007). Stabilization of catalase in the presence of additives, Bucharest: ARS.
- [93] Bush, G.L. Tassin, A. Friden, H. ve Meyer, D.I., (1991). "Secretion in yeast. Purification and in vitro translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor", *Journal of Biological Chemistry*, 266: 13811-13814.
- [94] Yung-Chi, C. ve Prusoff, W.H., (1973). "Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction", *Biochemical pharmacology*, 22: 3099-3108.
- [95] Bradford, M.M., (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.
- [96] Pal-Bhowmick, I. Sadagopan, K. Vora, H.K. Sehgal, A. Sharma, S. ve Jarori, G.K., (2004). "Cloning, over-expression, purification and characterization of *Plasmodium falciparum* enolase", *The FEBS journal*, 271: 4845-4854.
- [97] Glish, G.L. ve Vachet, R.W., (2003). "The basics of mass spectrometry in the twenty-first century", *Nature reviews Drug discovery*, 2: 140-150.
- [98] Edgar, R.C., (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput", *Nucleic acids research*, 32: 1792-1797.
- [99] Krieger, E. Nabuurs, S.B. ve Vriend, G., (2003). "Homology modeling", *Methods of biochemical analysis*, 44: 509-524.
- [100] Pettersen, E.F. Goddard, T.D. Huang, C.C. Couch, G.S. Greenblatt, D.M. Meng, E.C. ve Ferrin, T.E., (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis", *Journal of computational chemistry*, 25: 1605-1612.
- [101] Buchan, D.W. Minneci, F. Nugent, T.C. Bryson, K. ve Jones, D.T., (2013). "Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench", *Nucleic acids research*, 41: W349-W357.

- [102] Jones, D.T., (1999). "Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices", *Journal of molecular biology*, 292: 195-202.
- [103] Sillitoe, I. Lewis, T.E. Cuff, A. Das, S. Ashford, P. Dawson, N.L. Furnham, N. Laskowski, R.A. Lee, D. ve Lees, J.G., (2014). "CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences", *Nucleic acids research*, 43: D376-D381.
- [104] Dolinsky, T.J. Nielsen, J.E. McCammon, J.A. ve Baker, N.A., (2004). "PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations", *Nucleic acids research*, 32: W665-W667.
- [105] Olsson, M.H. Søndergaard, C.R. Rostkowski, M. ve Jensen, J.H., (2011). "PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pK_a predictions", *Journal of chemical theory and computation*, 7: 525-537.
- [106] Baker, N.A. Sept, D. Joseph, S. Holst, M.J. ve McCammon, J.A., (2001). "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 10037-10041.
- [107] Volkamer, A. Kuhn, D. Grombacher, T. Rippmann, F. ve Rarey, M., (2012). "Combining global and local measures for structure-based druggability predictions", *Journal of chemical information and modeling*, 52: 360-372.
- [108] Wass, M.N. Kelley, L.A. ve Sternberg, M.J., (2010). "3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures", *Nucleic acids research*, 38: W469-W473.
- [109] Trott, O. ve Olson, A.J., (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading", *Journal of computational chemistry*, 31: 455-461.
- [110] Sastry, G.M. Adzhigirey, M. Day, T. Annabhimoju, R. ve Sherman, W., (2013). "Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments", *Journal of computer-aided molecular design*, 27: 221-234.
- [111] Harder, E. Damm, W. Maple, J. Wu, C. Reboul, M. Xiang, J.Y. Wang, L. Lupyan, D. Dahlgren, M.K. ve Knight, J.L., (2016). "OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins", *J. Chem. Theory Comput*, 12: 281-296.
- [112] Halgren, T.A. Murphy, R.B. Friesner, R.A. Beard, H.S. Frye, L.L. Pollard, W.T. ve Banks, J.L., (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening", *Journal of medicinal chemistry*, 47: 1750-1759.
- [113] Friesner, R.A. Murphy, R.B. Repasky, M.P. Frye, L.L. Greenwood, J.R. Halgren, T.A. Sanschagrin, P.C. ve Mainz, D.T., (2006). "Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes", *Journal of medicinal chemistry*, 49: 6177-6196.

- [114] Jacobson, M.P. Friesner, R.A. Xiang, Z. ve Honig, B., (2002). "On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations", *Journal of molecular biology*, 320: 597-608.
- [115] Jacobson, M.P. Pincus, D.L. Rapp, C.S. Day, T.J. Honig, B. Shaw, D.E. ve Friesner, R.A., (2004). "A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55: 351-367.
- [116] Hou, T. Wang, J. Li, Y. ve Wang, W., (2011). "Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods. II. The accuracy of ranking poses generated from docking", *Journal of computational chemistry*, 32: 866-877.
- [117] Hansen, L.H. Knudsen, S. ve Sørensen, S.J., (1998). "The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*", *Current microbiology*, 36: 341-347.
- [118] Qiagen, "QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins", http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf. 10 Kasım 2017.
- [119] Vagenende, V. Yap, M.G. ve Trout, B.L., (2009). "Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol", *Biochemistry*, 48: 11084-11096.
- [120] Janson, J.-C. ve Ryden, L., (1998). *Protein Purifications: Principles, High-Resolution Methods, and Applications*, Third Edition, Wiley -VCH, Canada.
- [121] Cleland, W.W., (1964). "Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups", *Biochemistry*, 3: 480-482.
- [122] Huang, P. Dong, A. ve Caughey, W.S., (1995). "Effects of dimethyl sulfoxide, glycerol, and ethylene glycol on secondary structures of cytochrome c and lysozyme as observed by infrared spectroscopy", *Journal of pharmaceutical sciences*, 84: 387-392.
- [123] Lee, J.C. ve Timasheff, S.N., (1981). "The stabilization of proteins by sucrose", *Journal of Biological Chemistry*, 256: 7193-7201.
- [124] Taylor, M.R., (2014). *The Role of Divalent Metal Ions in Enzymatic DNA Ligation.*, Doctoral dissertation, University of Michigan.
- [125] Jung, D.-W. Kim, W.-H. Park, S.-H. Lee, J. Kim, J. Su, D. Ha, H.-H. Chang, Y.-T. ve Williams, D.R., (2013). "A unique small molecule inhibitor of enolase clarifies its role in fundamental biological processes", *ACS chemical biology*, 8: 1271-1282.
- [126] Granchi, C. Fancelli, D. ve Minutolo, F., (2014). "An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24: 4915-4925.

- [127] Zehl, M. Leščić, I. Abramić, M. Rizzi, A. Kojić-Prodić, B. ve Allmaier, G., (2004). "Characterization of covalently inhibited extracellular lipase from *Streptomyces rimosus* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap reflectron time-of-flight mass spectrometry: localization of the active site serine", *Journal of mass spectrometry*, 39: 1474-1483.
- [128] Gabbiani, C. Mastrobuoni, G. Sorrentino, F. Dani, B. Rigobello, M.P. Bindoli, A. Cinellu, M.A. Pieraccini, G. Messori, L. ve Casini, A., (2011). "Thioredoxin reductase, an emerging target for anticancer metallodrugs. Enzyme inhibition by cytotoxic gold (III) compounds studied with combined mass spectrometry and biochemical assays", *MedChemComm*, 2: 50-54.
- [129] Mutlu, O. Yakarsonmez, S. Sariyer, E. Danis, O. Yuce-Dursun, B. Topuzogullari, M. Akbulut, E. ve Turgut-Balik, D., (2016). "Comprehensive structural analysis of the open and closed conformations of *Theileria annulata* enolase by molecular modelling and docking", *Computational biology and chemistry*, 64: 134-144.
- [130] Akat, A. Aktaş, M. Dumanli, N. ve Turgut-Balik, D., (2014). "Isolation, Cloning and Sequence Analysis of Enolase Enzyme Encoding Gene from *Theileria annulata* for Assessment of Important Residues of This Enzyme", *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 20.
- [131] Dzierszinski, F. Mortuaire, M. Dendouga, N. Popescu, O. ve Tomavo, S., (2001). "Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*", *Journal of molecular biology*, 309: 1017-1027.
- [132] Read, M. Hicks, K.E. Sims, P.F. ve Hyde, J.E., (1994). "Molecular characterisation of the enolase gene from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Evidence for ancestry within a photosynthetic lineage", *The FEBS journal*, 220: 513-520.
- [133] Schulz, E.C. Tietzel, M. Tovy, A. Ankri, S. ve Ficner, R., (2011). "Structure analysis of *Entamoeba histolytica* enolase", *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67: 619-627.
- [134] Vora, H.K. Shaik, F.R. Pal-Bhowmick, I. Mout, R. ve Jarori, G.K., (2009). "Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*", *Archives of biochemistry and biophysics*, 485: 128-138.
- [135] Maiti, R. Van Domselaar, G.H. Zhang, H. ve Wishart, D.S., (2004). "SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition", *Nucleic acids research*, 32: W590-W594.
- [136] Petsko, G.A. ve Ringe, D., (2004). *Protein structure and function*, New Science Press.
- [137] da Silva Giotto, M.T. Hannaert, V. Vertommen, D. Marcos, V. Rider, M.H. Michels, P.A. Garratt, R.C. ve Rigden, D.J., (2003). "The crystal structure of

Trypanosoma brucei enolase: visualisation of the inhibitory metal binding site III and potential as target for selective, irreversible inhibition", Journal of molecular biology, 331: 653-665.

- [138] Hidalgo, M.E. Sánchez, R. Pérez, D.G. Rodríguez, M.A. García, J. ve Orozco, E., (1997). "Molecular characterization of the *Entamoeba histolytica* enolase gene and modelling of the predicted protein", FEMS microbiology letters, 148: 123-129.
- [139] Alves, E. Maluf, F.V. Bueno, V.B. Guido, R.V. Oliva, G. Singh, M. Scarpelli, P. Costa, F. Sartorello, R. ve Catalani, L.H., (2016). "Biliverdin targets enolase and eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) to reduce the growth of intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*", Scientific reports, 6.
- [140] Copeland, R.A., (2005). Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- [141] Satani, N. Lin, Y.-H. Hammoudi, N. Raghavan, S. Georgiou, D.K. ve Muller, F.L., (2016). "ENOblock Does Not Inhibit the Activity of the Glycolytic Enzyme Enolase", PloS one, 11: e0168739.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sinem YAKARSÖNMEZ
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.12.1990-EMİNÖNÜ
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : sinem.ykrsnmz@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Fen Bilimleri	Gazi Anadolu Lisesi	2008

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
01.06.2016 - 31.07.2016	DONE Genetik ve Biyoinformatik A. Ş./ İSTANBUL	Ar-Ge Proje Uzmanı

YAYINLARI

Makale

1. **Yakarsonmez S**, Cayir E, Mutlu O, Nural B, Sariyer E, Topuzogullari M, Milward M. R. , Cooper P R., Aydemir A., Turgut-Balik D., " Cloning, expression and characterization of the gene encoding the enolase from *Fusobacterium*

- nucleatum*", Applied Biochemistry and Microbiology, 52 (1): 23-30, 2016.
2. Nural B, Erdemir A, Mutlu O, **Yakarsonmez S**, Danis O, Topuzogulları M, Turgut-Balik D. "Biochemical and *in silico* Characterization of Recombinant L-Lactate Dehydrogenase of *Theileria annulata*" Molecular Biotechnology, 58 (4): 256-267, 2016.
 3. Mutlu O, **Yakarsonmez S**, Sariyer E, Danis O, Yuce Dursun B, Topuzogulları M, Akbulut E, Turgut-Balik D. " Comprehensive Structural Analysis of the Open and Closed Conformations of *Theileria annulata* Enolase by Molecular Modelling and Docking", Computational Biology and Chemistry, 64: 134-144, 2016.

Bildiri

1. **Yakarsonmez S**, Cayir E, Sariyer E, Milward MR, Cooper PR, Turgut-Balik D. "Cloning and Sequence Analysis of Enolase Gene from *Fusobacterium nucleatum*." 2nd International Congress of Molecular Biology Association of Turkey, Istanbul, Turkey, 22-23 November 2013.
2. **Yakarsonmez S**, Cayir E, Sariyer E, Turgut-Balik D. "Kinetic Evaluation of Enolase Enzyme from *Fusobacterium nucleatum* Towards New Drug Design Studies", 2nd International BAU-Drug Design Congress, Istanbul, Turkey, 17-19 April 2014.
3. **Yakarsonmez S.**, Nural B., Sariyer E., Turgut-Balik D. "Optimum pH Determination and Thermostability Analysis of Recombinant *Fusobacterium nucleatum* Enolase Enzyme" International Symposium on Molecular Chemistry, Istanbul, Turkey, 19 December 2014.
4. Mutlu, O., **Yakarsonmez, S.**, Sariyer, E., Danis, O., Dursun, B., Topuzoğulları, M., Akbulut, E., Turgut Balık, D., "Comprehensive Computational Analysis of *Theileria annulata* Enolase by Comparative Modeling and Docking" 17th European Congress on Biotechnology, Krakow, Poland, 3-6 July 2016.
5. Spahi S., Erdemir A., **Yakarsonmez S.**, Sariyer E., Ugurel E., Aktas M., Turgut-Balik D. "Cloning of Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase from *Theileria annulata*" IVEK 3 rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, Istanbul, Turkey, 26-29 April 2017.
6. Inci T. G., Ugurel O. M., **Yakarsonmez S.**, Turgut-Balik D. "Using an Alternative System to Improve Expression Level of Recombinant Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium vivax*" IVEK 3 rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, Istanbul, Turkey, 26-29 April 2017.
7. Deveci G., **Yakarsonmez S.**, Turgut-Balik D., Kahveci M. U. "Preparation of Concanavalin A Decorated P(PEGMA-co-NMAS) Polymeric Surfaces and Utilization in Bacterial Cell Detection" APME 17 Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, Ghent, Belgium, 21-25 May 2017.

8. Sipahi S., Sariyer E., Mutlu O., **Yakarsonmez S.**, Turgut-Balik D., “*In silico* Analyses of both Wild Type and Mutant *TaPIN1* towards New Drug Discovery”, 5th International BAU-Drug Design Congress, Istanbul, Turkey, 19-21 October 2017.
9. **Yakarsonmez S.**, Mutlu O., Danis O., Turgut-Balik D., “Molecular Docking Analyses of Coumarin Derivatives as *Theileria annulata* Enolase Inhibitors”, 5th International BAU-Drug Design Congress, Istanbul, Turkey, 19-21 October 2017.
10. **Yakarsönmez S.**, Mutlu, Ö. Turgut-Balık, D. "Fusobacterium nucleatum Enolaz Enziminin Moleküler Modelinin Oluşturulması" 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi. Antalya, 21-23 Mart 2014.
11. **Yakarsönmez S.**, Çayır E, Sariyer E, Turgut-Balık D. "Fusobacterium nucleatum'un Enolaz Enziminin Yüksek Safılıkta Üretilmesi", 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.
12. **Yakarsönmez S.**, Danış Ö, Mutlu Ö, Yüce-Dursun B, Topuzoğulları M, Akbulut E, Sariyer E, Turgut-Balık D. “*Theileria annulata* Enolaz Enziminin Uygun Stabilizatörler Kullanılarak Depolama Koşullarının Belirlenmesi”, 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Afyon, 21-24 Ağustos 2015.
13. Nural B., **Yakarsönmez S.**, Erdemir A., Turgut-Balık D. “*Theileria annulata*’nın Laktat Dehidrogenaz Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi ve Termal Stabilité Analizi”, 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Afyon, 21-24 Ağustos 2015.
14. **Yakarsönmez S.**, Mutlu, Ö. Turgut-Balık, D. “*Trichomonas vaginalis* Tedavisinde *in silico* Analizlerle Yeni Aday İlaçların Belirlenmesi İçin 14-3-3 Proteininin Modellenmesi”, 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, 1-3 Aralık 2017

Proje

1. “Theileriosis’in tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilaç adayı tespit etmek için kumarin türevlerinin *Theileria annulata*’nın enolaz enzimini inhibisyon potansiyelinin araştırılması” T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) Projesi. Proje No: TAGEM-14/AR-GE/17, Araştırmacı, 2014-2016.
2. “*Bos taurus* Enolaz Enziminin Yapıya Dayandırılmış İlaç Tasarımı Yönünde Yapısal, Moleküler ve Enzimatik Analizlerinin Yapılması” Yıldız Teknik Üniversitesi BAP Projesi, Proje No: 2015-07-04-KAP07. Araştırmacı, 2015- 2017.

ÖDÜLLER ve BURSLAR

1. Yurt İçi Doktora Bursu, TÜBİTAK, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2014-2018.

2. Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Fakülte İkincisi, 2012.
3. Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü İkincisi, 2012.
4. Gazi Anadolu Lisesi, Okul Birincisi, 2008.