

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

***BOS TAURUS ENOLAZ* ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN YAPIYA DAYALI İLAÇ
TASARIMI YÖNÜNDE MOLEKÜLER VE ENZİMATİK ANALİZLERİNİN
YAPILMASI**

EMRAH SARIYER

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

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

**EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÖZKAN DANIŞ**

İSTANBUL, 2018

T.C.YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BOS TAURUS ENOLAZ* ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN YAPIYA DAYALI İLAÇ
TASARIMI YÖNÜNDE MOLEKÜLER VE ENZİMATİK ANALİZLERİNİN
YAPILMASI**

Emrah SARIYER tarafından hazırlanan tez çalışması 13/11/2018 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. Ayşe OGAN

Marmara Üniversitesi

Prof Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İmer OKAR

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Prof Dr. Adil ALLAHVERDİYEY

Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2015-07-04-KAP07 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu araştırmada yer alan tüm/kısmi nümerik hesaplamalar TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarımlar ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik hayattaki ilk tecrübelerimi edinmemi sağlayan, laboratuvar ve tez aşamamda bilgi, deneyim ve tecrübesiyle bana yol gösteren, karşılaştığım tüm sorunlar için sabırla çözüm üreten, akademik çalışma hayatım dışında da her konuda fikir ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Dilek Turgut-Balık'a,

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana her türlü desteği sağlayan eş danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Özkan Danış'a,

Tez izleme komitesi üyeleri saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Barbaros Nalbantoğlu, Prof. Dr. Ayşe Ogan'a ve jüri üyeleri Prof. Dr. İmer Okar ve Prof Dr. Adil Allahverdiyev'e,

Tez çalışmasının yürütülmesine maddi destek sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na (YÖK), Yıldız Teknik Üniversitesi ÖYP ve BAP koordinatörlüğüne, TÜBİTAK ULAKBİM Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'ne, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne, Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'ne ve her iki bölümdeki hocalarıma,

Grup içi çalışmaları ile bu tez çalışmasının yürütülmesine katkı sağlayan Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım Dr. Sinem Yakarsönmez, Araş. Gör. Osman Uğurel, Erennur Uğurel, Tuğba Gül İnci, Anıl Ata ve Gizem Doğan'a

Bölümde yer alan diğer yüksek lisans, doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca olduğu gibi doktora süresince her türlü desteğini esirgemeyen değerli ağabeyim Abdulkadir SARIYER'e ve aileme çok teşekkür ederim.

Kasım, 2018

Emrah SARIYER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Tropikal Theileriosis.....	1
1.1.2 Theileriosis'e Karşı Kullanılan Tedavi Yöntemleri ve İlaç Direnci	3
1.1.3 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı.....	4
1.1.4 <i>In silico</i> İlaç Tasarımı	7
1.1.4.1 Homoloji Modelleme	7
1.1.4.2 Moleküler Yanaştırma Metodu	10
1.1.4.3 Moleküler Dinamik Yöntemler İle Simulasyon.....	13
1.1.4.4 MM-GB(PB)SA Metodu İle Tahmini Serbest Bağlanma Enerji Hesaplamaları	17
1.1.5 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı Hedefi Olarak Enolaz	19
1.1.5.1 Enolazın yapısı ve izoformları.....	19
1.1.5.2 Enolazın mekanizması	20
1.1.5.3 <i>Theileria annulata</i> Enolazı.....	22
1.1.6 Enzim Kinetiği	23
1.1.6.1 Michaelis-Menten Kinetiği	23
1.1.7 Kumarin Türevleri	26
1.2 Tezin Amacı	29
1.3 Hipotez	29

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM	30
2.1 MATERYAL.....	30
2.1.1 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler	30
2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar	31
2.1.3 Plasmid DNA ve Vektörler	32
2.1.4 Mikroorganizmaların Gelişimi İçin Gerekli Besiyerleri	35
2.1.5 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	36
2.1.6 Primerler	40
2.2 YÖNTEM	40
2.2.1 Plasmid DNA'dan <i>Bos taurus</i> kas enolazını (<i>BtENO3</i>) ifade eden genin Amplifikasyonu	40
2.2.2 Agaroz Jel Elektroforezi	42
2.2.3 <i>Bos taurus</i> Kas Enolazını Kodlayan Genin (<i>BtENO3</i>) İfade Vektörüne (pLATE31) Aktarılması	42
2.2.3.1 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant DNA Plazmidinin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu	42
2.2.3.2 Kalsiyum Klorür Muamelesi ile Kompetant <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerinin Hazırlanması	43
2.2.3.3 Rekombinant DNA Plazmidinin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu	44
2.2.3.4 Gen Klonlamasının koloni PCR ve dizileme ile kontrolü	44
2.2.4 <i>Bos taurus</i> Kas Enolazını Kodlayan Genin (<i>BtENO3</i>) Dizi Analizi	45
2.2.5 <i>Bos taurus</i> Kas Enolazını Kodlayan Genin İfadesi, Enzimin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu	45
2.2.5.1 <i>Bos taurus</i> Kas Enolazını Kodlayan Genin İfadesi.....	45
2.2.5.2 <i>Bos taurus</i> Kas Enolazının Saflaştırılması	46
2.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elktfrz (SDS-PAGE)	47
2.2.5.4 Protein Konsantrasyon Tayini	48
2.2.5.5 Spektrofotometrik Yöntemle Enzim Aktivitesi Tayini ve Karakterizasyonu.....	48
2.2.6 İnhibitör etkinliğinin <i>Bos taurus</i> kas enolaz enzimi kullanılarak taranması ve enzim kinetiği çalışmaları.....	49
2.2.7 <i>Bos taurus</i> Kas Enolazını Homoloji Modellemesi ve Optimizasyonu	50
2.2.8 <i>Bos taurus</i> kas enolaz enziminin moleküler docking çalışmaları ve moleküler dinamik simülasyonu.....	50
2.2.8.1 <i>Bos taurus</i> enolaz enziminin moleküler dinamik simülasyonu	50
2.2.8.2 Moleküler yanaştırma yöntemiyle <i>Bos taurus</i> kas enolazına substratının (2-Fosfoglisarat) yanaştırılması ve enzim-substrat kompleksinin moleküler dinamik yöntemler ile simulasyonu	53
2.2.8.3 Moleküler docking yöntemiyle <i>Bos taurus</i> kas enolaz enzimine kumarin türevlerinin yanaştırılması ve moleküler dinamik simulasyonu	54
2.2.9 MM-GB(PB)SA Metodu İle Kumarin Türevlerinin ve Substratın (2PG) Serbest Bağlanma Enerji Hesaplamaları.....	56

BÖLÜM 3

SONUÇ VE ÖNERİLER	58
3.1 <i>Bos taurus</i> kas enolaz geninin (<i>BtENO3</i>) klonlanması	58
3.2 <i>Bos taurus</i> Kas Enolaz (<i>BtENO3</i>) Dizi analizi	61
3.3 <i>Bos taurus</i> kas enolazını kodlayan genin ifadesi, enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu	63
3.4 <i>Bos taurus</i> Kas Enolazının (<i>BtENO3</i>) Karakterizasyonu	67
3.5 <i>Bos taurus</i> enolaz enziminin homoloji modellemesi ve optimizasyonu...	71
3.6 <i>Bos taurus</i> kas enolaz enziminin moleküler docking çalışmaları ve moleküler dinamik simülasyonu	74
3.6.1 <i>Bos taurus</i> kas enolaz enziminin moleküler dinamik simülasyonu ..	74
3.6.2 Moleküler docking yöntemiyle <i>Bos taurus</i> kas enolaz enzime substratının (2-Fosfoglisarat) yanaştırılması ve enzim-substrat kompleksinin moleküler dinamik yöntemler ile simulasyonu.....	75
3.6.3 Kumarin türevleri- <i>Bos taurus</i> kas enolaz enzim komplekslerinin <i>in siliko</i> analizleri	78
3.6.3.1 Moleküler docking yöntemiyle <i>Bos taurus</i> kas enolazına kumarin türevlerinin yanaştırılması	78
3.6.3.2 Moleküler dinamik yöntemlerle <i>Bos taurus</i> kas enolaz enzim-kumarin türevleri komplekslerinin simulasyonları	82
3.7 İnhibitör etkinliğinin <i>Bos taurus</i> kas enolaz enzimi kullanılarak taranması ve enzim kinetiği çalışmaları	96
3.8 MM-GB(PB)SA Metodu İle Kumarin Türevlerinin ve Substratın (2PG) Serbest Bağlanma Enerji Hesaplamaları	98
3.9 Tartışma	104
3.10 Öneriler	107
KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ	116

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
bç	Baz çifti
g	Gram
kDa	KiloDalton
l	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mA	Miliamper
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
ε	Molar absorbsiyon katsayısı
Mw	Moleküler ağırlık
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
OD	Optik dansite
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
EtBr	Etidyum bromür
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogaltopyranoside
LDH	Laktat Dehidrogenaz Enzimi
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
mRNA	Mesajcı RNA
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
Ni-NTA	Nikel nitrilotriasetik asit agaroz
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleikasit
Rpm	Revolution per minute
SAB	Sample Amplification Buffer
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilmit jel elektroforezi
TAE	Tris-Asetat-EDTA
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1	<i>Theileria annulata</i> 'nın yaşam döngüsü [8] 2
Şekil 1. 2	Yapıya dayalı ilaç tasarımı yolağı..... 7
Şekil 1. 3	Moleküler yanaştırma metodu temel basamakları 11
Şekil 1. 4	Atomları arası etkileşime katkıda bulunan bağların gösterimi 16
Şekil 1. 5	Biomoleküler hareketlerin gerçekleştiği zaman aralıkları 16
Şekil 1. 6	MD simülasyon protokolü..... 17
Şekil 1. 7	Glikoliz yolağı [52] 20
Şekil 1. 8	Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi [54] 25
Şekil 1. 9	Lineweaver-Burk grafiği [54] 26
Şekil 1. 10	Kumarin ana iskeleti 27
Şekil 2. 1	a) O'GeneRuler DNA Ladder Mix b) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder 31
Şekil 2. 2	pcDNA3.1+N-DYK vektörü haritası..... 33
Şekil 2. 3	pLATE31 ifade vektörü 34
Şekil 2. 4	2-Fosfoglisarat..... 53
Şekil 3. 1	a) Transformasyon sonucu pozitif olduğu düşünülen koloniler b) Klonlanan genin amplifikasyonu 1:Marker, 2: <i>BtENO3</i> 60
Şekil 3. 2	<i>BtENO3</i> forward dizileme 60
Şekil 3. 3	<i>BtENO3</i> reverse dizileme 60
Şekil 3. 4	<i>Bos taurus</i> enolazının karşılaştırmalı analizi 62
Şekil 3. 5	<i>BtENO3</i> SDS-PAGE jel 64
Şekil 3. 6	<i>BtENO3</i> saflaştırma SDS-PAGE jel 64
Şekil 3. 7	<i>BtENO3</i> saflaştırma SDS-PAGE jel 65
Şekil 3. 8	<i>BtENO3</i> saflaştırma SDS-PAGE jel 65
Şekil 3. 9	<i>BtENO3</i> saflaştırma SDS-PAGE jel 66
Şekil 3. 10	<i>BtENO3</i> saflaştırma SDS-PAGE jel 67
Şekil 3. 11	<i>BtENO3</i> saflaştırma SDS-PAGE jel 67
Şekil 3. 12	<i>Bos taurus</i> kas enolazının (<i>BtENO3</i>) gün içindeki aktivite değişimi..... 68
Şekil 3. 13	<i>Bos taurus</i> kas enolaz (<i>BtENO3</i>) hafta içindeki aktivite değişimi..... 68
Şekil 3. 14	<i>BtENO3</i> optimum pH grafiği (25 °C) 69
Şekil 3. 15	<i>BtENO3</i> optimum sıcaklık grafiği (pH 6.5) 69
Şekil 3. 16	Farklı substrat konsantrasyonlarda alınan enzim (% 35 seyreltmeli) aktivite ($\Delta A/dk$) grafiği 70

Şekil 3. 17	<i>Bos taurus</i> Kas Enolaz (<i>BtENO3</i>) Michaelis-Menten Eğrisi	71
Şekil 3. 18	<i>BtENO3</i> enziminin kristalografik olarak 3 boyutlu yapısı bilinen proteinleri ile karşılaştırılması sonucu benzerlik oranları	72
Şekil 3. 19	<i>BtENO3</i> homoloji model	72
Şekil 3. 20	<i>BtENO3</i> RAMPAGE ile oluşturulan Ramahandran grafiği	73
Şekil 3. 21	<i>BtENO3</i> ERRAT program çıktısı	74
Şekil 3. 22	ProSA ile gösterilen enerji grafiği.....	74
Şekil 3. 23	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> homoloji modelinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> homoloji modelindeki her bir residünün atomik salınımı	75
Şekil 3. 24	Moleküler yanaştırma sonrası <i>Bos taurus</i> kas enolaz enzimi-substrat (2-Fosfoglisarik asit) etkileşimleri.....	77
Şekil 3. 25	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -2pg kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -2pg kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı	77
Şekil 3. 26	100 ns simülasyon sonrası <i>Bos taurus</i> kas enolaz-substrat (2-fosfoglisarat) etkileşimleri.....	78
Şekil 3. 27	K8- <i>Bos taurus</i> kas enolazı etkileşiminin tahmini 2D diyagramı a) Pozisyon 1 b) Pozisyon 2	79
Şekil 3. 28	K9- <i>Bos taurus</i> kas enolazı etkileşiminin tahmini 2D diyagramı a) Pozisyon 1 b) Pozisyon 2	80
Şekil 3. 29	K21- <i>Bos taurus</i> kas enolazı etkileşiminin tahmini 2D diyagramı a) Pozisyon 1 b) Pozisyon 2	80
Şekil 3. 30	Enolase-kumarin-2PG komplekslerindeki substrat-enolase etkileşimlerinin 2D diagram gösterimi.....	82
Şekil 3. 31	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-1 (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-1 kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	83
Şekil 3. 32	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3</i> -K8-1 (1 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-1 etkileşimi	83
Şekil 3. 33	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-1-2pg (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-1-2pg kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	84
Şekil 3. 34	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3</i> -K8-1-2pg (1 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-1-2pg etkileşimi.....	84
Şekil 3. 35	100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-1-2pg etkileşiminin 2D diagram gösterimi	85
Şekil 3. 36	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-2 (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-2 kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	86
Şekil 3. 37	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3</i> -K8-2 (2 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-2 etkileşimi	86
Şekil 3. 38	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-2-2pg (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3</i> -K8-2-2pg kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	87
Şekil 3. 39	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3</i> -K8-2-2pg (2 numaralı konum) b) 100 ns	

	MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K8-2-2pg</i> etkileşimi.....	87
Şekil 3. 40	100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K8-2-2pg</i> etkileşiminin 2D diagram gösterimi	88
Şekil 3. 41	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-1</i> (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-1</i> kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	88
Şekil 3. 42	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3-K9-1</i> (1 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-1</i> etkileşimi.....	89
Şekil 3. 43	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-1-2pg</i> (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-1-2pg</i> kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	89
Şekil 3. 44	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3-K9-1-2pg</i> (1 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-1-2pg</i> etkileşimi.....	90
Şekil 3. 45	100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-1-2pg</i> etkileşiminin 2D diagram gösterimi	90
Şekil 3. 46	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-2</i> (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-2</i> kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	91
Şekil 3. 47	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3-K9-2</i> (2 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K9-2</i> etkileşimi.....	91
Şekil 3. 48	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-1</i> (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-1</i> kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	92
Şekil 3. 49	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3-K21-1</i> (1 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-1</i> etkileşimi.....	92
Şekil 3. 50	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-1-2pg</i> (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) 100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-1-2pg</i> kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı	93
Şekil 3. 51	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3-K21-1-2pg</i> (1 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-1-2pg</i> etkileşimi.....	93
Şekil 3. 52	100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-1-2pg</i> etkileşiminin 2D diagram gösterimi	94
Şekil 3. 53	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-2</i> (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-2</i> kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı.....	94
Şekil 3. 54	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3-K21-2</i> (2 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-2</i> etkileşimi	95
Şekil 3. 55	a) MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-2-2pg</i> (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) 100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-2-2pg</i> kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı	95
Şekil 3. 56	a) MD simülasyon öncesi <i>Bteno3-K21-2-2pg</i> (2 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-2-2pg</i> etkileşimi.....	96
Şekil 3. 57	100 ns MD simülasyon boyunca <i>Bteno3-K21-2-2pg</i> etkileşiminin 2D diagram gösterimi	96

Şekil 3. 58	K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevlerine göre logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı reaksiyon sonucunda meydana gelen % inhibisyon grafikleri	97
Şekil 3. 59	<i>BtEno3</i> -2PG ve <i>BtEno3</i> -2PG-inhibitör komplekslerindeki substratın serbest bağlanma enerjisi grafiği.....	100
Şekil 3. 60	<i>BtEno3</i> -inhibitör komplekslerindeki kumarinlerin serbest bağlanma enerjisi grafiği	101
Şekil 3. 61	<i>BtEno3</i> -2PG-inhibitör komplekslerindeki kumarinlerin serbest bağlanma enerjisi grafiği.....	103

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1	Kumain türevleri ve terapötik rolleri.....28
Çizelge 2.1	<i>Bos taurus</i> kas enolazını (<i>BtEno3</i>) ifade eden genin amplifikasyonunda kullanılan primerler 40
Çizelge 2. 2	Birinci aşama PCR; pcDNA3.1 ekspresyon vektöründen <i>Bos taurus</i> kas enolazını (<i>BtENO3</i>) kodlayan genin amplifikasyonu için PCR bileşenleri 41
Çizelge 2. 3	İkinci aşama PCR; <i>Bos taurus</i> kas enolazını (<i>BtENO3</i>) kodlayan genin pLATE31 vektörüne ligasyonu amacıyla yapılan amplifikasyon için PCR bileşenleri 42
Çizelge 2.4	pLATE31 ekspresyon vektörü ve <i>BtENO3</i> geni ligasyon reaksiyonu bileşenleri 43
Çizelge 2.5	Koloni PCR bileşenleri..... 45
Çizelge 2. 6	<i>Bos taurus</i> enolazının (<i>BtENO3</i>) enerji minimizasyon koşulları 51
Çizelge 2. 7	<i>Bos taurus</i> kas enolaz (<i>BtENO3</i>) sisteminin ısıtılması koşulları 51
Çizelge 2. 8	<i>Bos taurus</i> kas enolaz (<i>BtENO3</i>) sisteminin MD simulasyon koşulları .. 52
Çizelge 2. 9	<i>Bos taurus</i> enolazı-substratının (2-Fosfoglisarat) kompleksinin enerji minimizasyon koşulları 54
Çizelge 2. 10	a) <i>Bos taurus</i> enolazı-substratının (2-Fosfoglisarat) kompleks sistemin ısıtılması b) Simülasyon koşulları 54
Çizelge 2. 11	Kumarin türevleri 55
Çizelge 2. 12	MM-GB/PBSA parametleri 57
Çizelge 3. 1	Klonlanmış olan <i>BtENO3</i> geninin nükleotit dizisi 58
Çizelge 3. 2	Dizileme sonucu <i>BtENO3</i> geninin 5' dizisi 59
Çizelge 3. 3	Enolazların fiziksel özellikleri 63
Çizelge 3. 4	Farklı kaynaklardan enolazın kinetik özellikleri..... 71
Çizelge 3. 5	On farklı yanaştırma konformasyonu arasında bağlanma afinitesi en yüksek olan substratın moleküler yanaştırma temelli serbest bağlanma enerji değerleri 76
Çizelge 3. 6	Moleküler yanaştırma sonrası K8, K9 and K21 bileşiklerinin serbest bağlanma enerjisi 79
Çizelge 3. 7	Substratın (2PG) enzim-kumarin komplekslerine tahmini bağlanma enerjileri 81
Çizelge 3. 8	Kumarin türenlerinin IC ₅₀ değerleri. *100 µM konsantrasyonda % inhibisyon değeri 97

Çizelge 3. 9	Kumarin türevlerinin <i>Theileria annulata</i> ve <i>Bos taurus</i> enolazlarının aktivitelerine etkisi	98
Çizelge 3. 10	<i>BtEno3</i> -2PG ve <i>BtEno3</i> -2PG-inhibitör komplekslerindeki substratın (2PG) serbest bağlanma enerji hesap bileşenleri.....	99
Çizelge 3. 11	<i>BtEno3</i> -inhibitör komplekslerindeki kumarinlerin (K8, K9 ve K21) serbest bağlanma enerji hesap bileşenleri (50 ns boyunca).....	101
Çizelge 3. 12	<i>BtEno3</i> -2PG-inhibitör kompleksindeki kumarinlerin (K8, K9 ve K21) serbest bağlanma enerji hesap bileşenleri (100 ns boyunca).....	102

**BOS TAURUS ENOLAZ ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN YAPIYA DAYALI İLAÇ
TASARIMI YÖNÜNDE MOLEKÜLER VE ENZİMATİK ANALİZLERİNİN
YAPILMASI**

Emrah SARIYER

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Eş Danışman: Doç. Dr. Özkan DANIŞ

Tropikal theileriosis, *Theileria annulata* parazitinin neden olduğu vektör kaynaklı vakalar arasında en yaygın görülen hastalıklardan biridir ve küresel ölçekte hayvancılık üretiminde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Theileria annulata*, Hyalomma cinsi kene vektörleri tarafından aktarılan ve özellikle *Bos taurus* ve *Bos indicus* olmak üzere ruminant hayvanlarda hastalığa neden olan bir zorunlu hücre içi protozoon parazitidir. Son yıllarda tropikal theileriosis tedavisinde başarı oranları düşüktür ve buparvaquona'a karşı direnç rapor edilmiştir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda *Theileria annulata*'nın Buparvaquona'a karşı direnç gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sebeple Tropikal theileriosis ile mücadele alanında yeni tedavi yöntemi ve ilaç çalışmalarının artırılması gerekmektedir. Bu kapsamda 2017 yılında grubumuzda gerçekleştirilen bir tez çalışmasında bu hastalığa sebep olan *Theileria annulata* enolazına karşı yapıya dayalı ilaç tasarım çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve *Theileria annulata*'nın temel enerji metabolizmasındaki glikoliz yolağında önemli bir enzim olan enolaz hedef alınarak bu enzimi inhibe eden kumarin türevleri taranmıştır. Bu tez çalışmasında 38 kumarin türevi arasında yüksek *T. annulata* enolazın inhibisyon aktivitesine sahip ($IC_{50} < 15 \mu M$) kumarin türevleri; K8 (6,7-dihidroksi-4-(3,4-dimetoksifenil)-kumarin), K9 (7,8-dihidroksi-4-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin), K21 (6,7-dihidroksi-4-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin) ve K23 (7,8-dihidroksi-3-(3,4-dihidroksifenil)-

kumarin) olarak belirlenmiştir. Bir etken maddenin ilaç olarak kullanılabilmesi için söz konusu bileşiğin parazit hedef molekülünü inhibe etmesi ama konak organizmadaki eşdeğer molekülü inhibe etmemesi gerekmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen bu tez çalışmasında parazitin konağı *Bos taurus*'ta eşdeğer enzim olan enolazın yapıya dayalı ilaç tasarımı yönünde yapısal, moleküler ve enzimatik analizleri yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında *Bos taurus* enolazını (*BtEno3*) ifade eden gen klonlanmış, eksprese edilmiş ve protein % 95 saflıkta afinite kromatografisi ile başarıyla saflaştırılmıştır. Sıcaklığın ve pH değişimlerinin enzim aktivitesine etkisi analiz edilmiş ve optimum koşullar 40 °C, pH 6.5 olarak belirlenmiştir. *BtEno3*'ün biyokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir ve literatürde ilk defa enzimin kinetik parametreleri *V_{max}* ve *K_m* sırasıyla 0,01305 µmol/dk ve 0.514 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, *in siliko* analizlerde kullanılmak üzere *Bos taurus* enolazının 3 boyutlu yapısı homoloji modellemesi ile oluşturulup kumarinler ve substrat moleküler yanaştırma metodları ile enolaza yanaştırılmıştır. Enzim-substrat, enzim-kumarin ve enzim-kumarin-substrat komplekslerindeki etkileşimler 100 ns boyunca moleküler dinamik yöntemler ile simule edilerek analiz edilmiştir. Enzim-substrat arasındaki etkileşimlerin, mayada deneysel olarak belirlenen etkileşimler ile aynı olduğu belirlenmiştir. Substratın ve kumarin türevlerinin enzime tahmini serbest bağlanma enerjileri MM-GB(PB)SA metodları ile hesaplanmıştır.

T. annulata parazitin enolazını yüksek etkili olarak inhibe eden K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevlerinin *Bos taurus* enolazının aktivitesine etkisi *in vitro* olarak çalışılmıştır ve bu kumarin türevlerinin *Bos taurus* enolazını *T. annulata* enolazına kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği belirlenmiştir (K8 100 µM konsantrasyonda %36,87, K9 100 µM konsantrasyonunda %8,13 inhibisyon, K21 IC₅₀: 77,69 µM ve K23 IC₅₀:84,42 µM).

In vitro ve *in siliko* çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde parazit enolazını inhibe eden K8, K9, K21 ve K23 türevlerinin parazit konağındaki eşdeğer enolazını daha yüksek kumarin türevi konsantrasyonlarda inhibe ettiği görülmüştür. Bu kumarin türevlerinin inhibisyon oranları K21>K23>K8>K9 olarak sıralanmıştır. Kumarin türevleri *BtEno3*'a bağlandıktan sonraki enzimin aktif bölgesindeki konformasyon değişiklikleri, enzim-substrat ve enzim-kumarin etkileşimleri *in siliko* analiz edilmiştir. Kumarinlerin enzimin aktif bölgesine bağlanmadığı, bağlandığı oyuklarda sıkı bağlar oluşturmadağı ve aktif bölgede herhangi bir konformasyon değişikliğine sebep olmadığı belirlenmiştir. Enzim-substrat etkileşiminde koordinasyon eksikliğine sebep olmadığı *in siliko* çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen *in vitro* ve *in siliko* çalışmaların sonucunda K8 ve K9 kumarin türevlerinin parazit enolazını konak enolazına kıyasla çok daha etkili olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Belirlenen bu türevler ile Theileriosis tedavisine yönelik yeni ilaç adayı geliştirme yönünde hücre kültürü ve pre-klinik çalışmaların önün açacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Bos taurus* enolazı, gen klonlama, Theileriosis, yapıya dayalı ilaç tasarımı, moleküler dinamik simulasyon

ABSTRACT

STRUCTURAL, MOLECULAR AND ENZYMATIC ANALYSIS OF *BOS TAURUS* ENOLASE TOWARDS STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN

Emrah SARIYER

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

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

Tropical theileriosis is one of the among most common vector-born diseases caused by *Theileria annulata* parasites and causes serious economic losses in livestock production on a global scale. *Theileria annulata* is an obligate intracellular protozoan parasite that is transmitted by Hyalomma tick vectors and causes disease in ruminant animals, especially *Bos taurus* and *Bos indicus*. The success rates of tropical theileriosis treatment are low and resistance to buparvaquona has increased in the last decades. Recent studies have shown that *Theileria annulata* reveals resistance to Buparvaquona. For this reason, new treatment methods and drug studies should be increased in the combat against tropical theileriosis. Structrue-based drug design studies were studied for the first time against *Theileria annulata* enolase in a thesis study performed at research group in 2017 and coumarin derivatives were screened for their inhibitory activity on *T. annulata* enolase is an crucial enzyme in the glycolysis pathway of *T. annulata* essential energy metabolism. Of the 38 coumarin derivatives studied those who have potent inhibitory activity ($IC_{50} < 15 \mu M$) were reported as K8 (4-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one), K9 (4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one), K21 (4-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one) and K23 (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one). In order for an active substance to be used as a drug, the compound must inhibit the parasite target molecule but not the equivalent molecule in the host

organism. In the direction of the structure-based drug design studies; structural, molecular and enzymatic analyzes of the enolase, which is the counterpart of *Bos taurus*, were performed in this thesis study.

The gene encoding *Bos taurus* enolase (*BtEno3*) was cloned, expressed and the protein was successfully purified by affinity chromatography with 95% purity. The effect of temperature and pH changes on enzyme activity was analyzed and optimum conditions were determined as 40 °C, pH 6,5. Biochemical properties of enolase have been characterized for the first time in the literature, the kinetic parameters of the enzyme, *V_{max}* and *K_m* values, were calculated as 0,01305 µmol/min and 0.514 mM, respectively. In addition, in order to be used *in silico* analysis, 3D structure of *Bos taurus* enolase was built by homology modeling and coumarins and substrate were docked into enolase by molecular docking methods. Interactions in the enzyme-substrate, enzyme-coumarin and enzyme-coumarin-substrate complexes were analyzed by simulating molecular dynamics for 100 ns. Interactions between enolase-substrate have been reported to be the same as experimentally determined interactions in yeast. Estimated free binding energies of the substrate and coumarin derivatives to the enzyme were calculated by MM-GB(PB)SA methods. The effects of K8, K9, K21 and K23 coumarin derivatives, which highly inhibit enolase of *T. annulata* parasite, on the activity of *Bos taurus* enolase were studied *in vitro* and it was determined that these coumarin derivatives inhibited *Bos taurus* enolase at lower concentrations compared to *T. annulata* enolase (at 100 µM concentration of K8 %36,87, at 100 µM concentration of K9 %8,13 inhibition, K21 IC₅₀: 77,69 µM and K23 IC₅₀:84,42 µM).

When the *in vitro* and *in silico* studies were evaluated together, K8, K9, K21 and K23 derivatives were reported to inhibit the parasite host *Bos taurus* enolase at higher coumarin derivative concentrations than the parasite enolase. The inhibition rates of these coumarin derivatives can be sorted as K21> K23> K8> K9. The conformational changes in the active site of the enzyme, the enzyme-substrate and enzyme-coumarin interactions were analyzed *in silico* after coumarin derivatives were docked to *BtEno3*. It has been determined that coumarins do not bind to the active site of the enzyme, not form tight bonds in the pockets and did not cause any conformation changes in the active site. It was revealed *in silico* studies that there is no lack of coordination in enzyme-substrate interaction.

In the thesis study, *in vitro* and *in silico* studies showed that K8 and K9 coumarin derivatives inhibit parasite enolase much more effectively than host *Bos taurus* enolase. The proposed ligand will enlight the cell culture and pre-clinical studies to develop new drug candidates for the theileriosis treatment.

Keywords: *Bos taurus* enolase, gene cloning, Theileriosis, structure-based drug design, molecular dynamics simulation

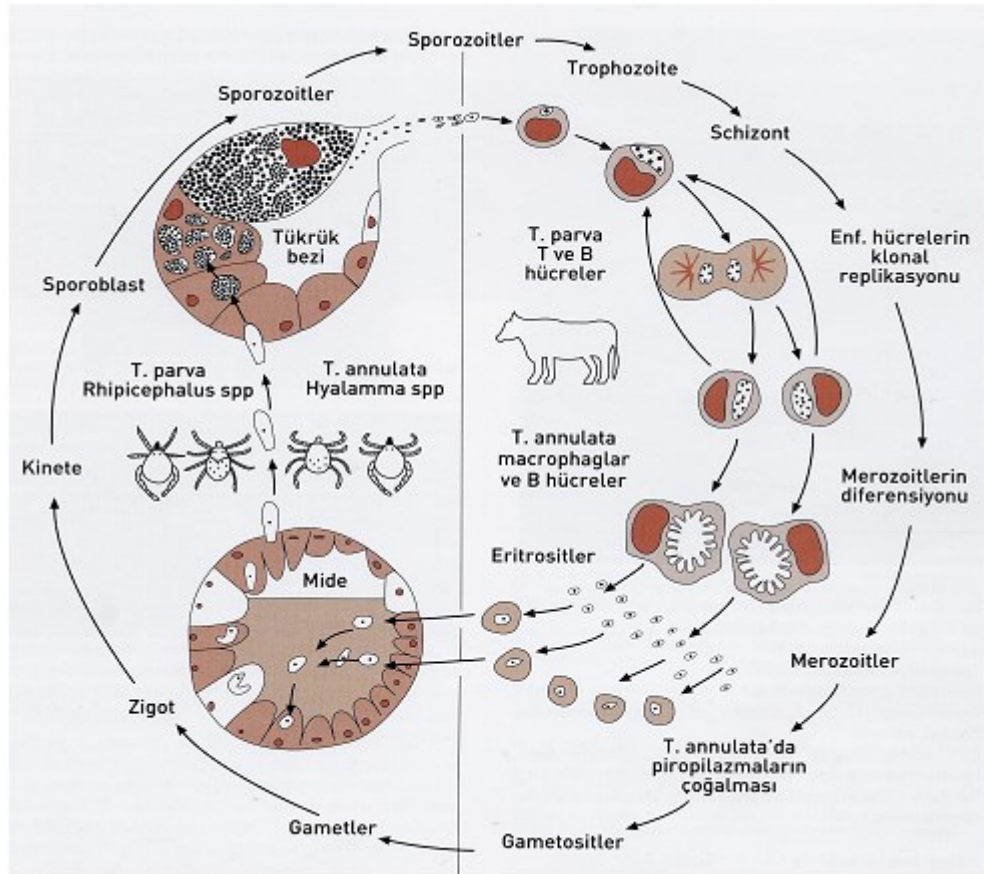
1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Tropikal Theileriosis

Tropikal theileriosis, taşıyıcı kaynaklı olan, tropikal ve sıcak bölgelerde yıllık yüzlerce milyon dolarlık kayıplara neden olan bir hastalıktır. Bu kayıplar çoğunlukla besi hayvanları arasında neden olmaktadır [1], [2]. Tropikal theileriosis ateş, genişlemiş periferik lenf nodları, hızlı kilo kaybı (emasiyasyon), progresif anemi ve sarılık ile karakterize bulaşıcı olmayan bir sığır hastalığıdır. Avrupa ve Afrika'nın Akdeniz kıyı bölgelerinden Yakın ve Orta Doğu'ya, Hindistan ve Çin'den Asya'ya uzanan geniş bir coğrafi dağılımda, ithal yüksek ekonomik değerleri olan sığırlarda ve melezlerde görülen ölümcül hastalıktır [2], [3].

Bu hastalığa çoğunlukla protozoan bir parazit olan *Theileria annulata* sebep olmaktadır ve bu parazit cinsi apicomplexan filumuna aittir. Apicomplexa ailesi, omurgalıların ve omurgasızların zorunlu parazitleri olarak bilinen geniş bir grup olan ökaryotik organizmaları içerir [4]. Bu organizmalar, memeli veya omurgasız konakçıda parazitin oluşumunda ya da invazyonda rol oynadığı düşünülen sekretuar organelleri içeren bir apikal kompleksi olan ortak bir özelliği paylaşırlar. Filum dört ana gruba ayrılmıştır; Coccidia, Gregarinasina (gregarinler), Haemospororida (haemosporidians) ve Piroplasmorida (piroplazmitler). Piroplasmorida, Babesia ve Theileria cinslerini içermektedir. Bu sınıflandırma, parazitlerin morfolojisine, şizogrinin meydana geldiği konakçı hücrelere, hastalık belirtisi ve konak-vektör özgüllüğü ile ilişkili kırmızı kan

hücrelerindeki piroplazmların gözlemine dayanarak sınıflandırılmaktadır [5], [6]. Theileria cinsi, lökositlerin sporozoitlerle enfeksiyonu, şizoidlerin merozoitlere olgunlaşması ve ardından piroplazmalar oluşturmak için kırmızı kan hücrelerinin enfeksiyonu ile ayırt edilmektedir. Altı adet tanımlanmış Theileria spp bilinmektedir ve en patojenik ve ekonomik açıdan önemli olan iki tanesi *T. parva* ve *T. annulata*'dır. *T. parva* Doğu ve Güney Afrika'da ortaya çıkmaktadır. *T. lestoquardi* (*T. hirci*) küçükbaş hayvanları enfekte eden tek ekonomik öneme sahip türdür ve Akdeniz havzasında, Kuzey Afrika ve Asya'da görülür. Çoğu theileria türü patojenik *T. buffeli*'nin dünya çapında dağılımı dışında, vektör kenelerinin coğrafi dağılımına karşılık gelen Asya veya Afrika ile sınırlıdır [6], [7].



Şekil 1. 1 *Theileria annulata*'nın yaşam döngüsü [8]

Parazit, Hyalomma cinsi keneleri tarafından aktarılmaktadır ve bu vektörler nemli ve yarı kurak ortamlarda, yarı çöl veya çöl habitatlarında, bozkırlarda ve kuru otlaklarda bulunmaktadır. En önemli vektörler *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Hyalomma detritum* olarak bilinmektedir. Bu tür vektörler sığırların tüm hayat şartlarına uygun

olarak hareket edebilir. *H. scupense*, hayvanlar yakın temas halinde yaşadıklarında bir alan vektörü olarak görev yapabilirler [9], [10].

T. annulata taşıyıcısı bazı vektör türlerinin hayvanların yaşam alanlarında devamlı bulunabileceği bilinmektedir. Kene beslenmesi sırasında, *Theileria annulata* sporozoitler sığır konakçıya girer ve hızla miyeloid soyunun hücrelerini istila eder. *T. annulata*, konak duyarlılığına göre akut, hafif, alt akut, akut veya kronik bir hastalığa neden olmaktadır. Akut ölümcül hastalıkta sığırlar, enfeksiyon bölgesini boşaltan lenf nodunda şizoidler saptanabilir hale geldiğinde, enfeksiyondan beş ila yedi gün sonra artan belirgin semptomlar sergilediği görülmüştür (Şekil 1. 1) [10], [11].

Tropikal theileriosis birçok ülkede sığır endüstrisinin gelişiminde büyük bir kısıtlamaya neden olmaktadır. Çünkü, parazit tarafından indüklenen hastalık, süt veriminde ve günlük kilo alımında azalma, düşükler, ölüm oranı ve tedavi maliyetleri gibi önemli üretim kayıplarına neden olmaktadır. Akdeniz'de Tropikal theileriosisin ekonomik etkisi üzerinde sınırlı çalışmalar yapılmıştır [12]. Türkiye'nin bazı epidemiyolojik yönlerini değerlendirmek, aşılamanın etkinliği ve ayrıca klinik theileriosise bağlı ekonomik kayıpların belirlenmesi amacıyla Kapadokya'dan bir çalışma mevcuttur. İki yıl boyunca, 346 aşılanmış ve 208 aşılanmamış dahil olmak üzere 554 hayvan ile çalışılmıştır. Akut tropikal theileriosis olguları, 86'sının hastalıktan öldüğü 153 hayvanda teşhis edilmiştir. Mortalite, hem sığır hem de süt hayvanı üretim hayvanlarının zararlarından ve % 6.8'inin buzağı ölümlerinden, tüm maliyetlerin yaklaşık % 75'ine katkıda bulunmuştur. İyileştirilmiş hayvanlardan, et ve süt üretimininde 7.000 ABD \$ maliyetinin (Şubat 2006) düşürülmesi öngörülmüştür. Buparvaquone gibi çeşitli ilaçların kullanımı da dahil olmak üzere 153 hayvanın tedavisine harcanan maliyet 23.715 ABD \$ olarak hesaplanmıştır [13].

1.1.2 Theileriosise Karşı Kullanılan Tedavi Yöntemleri ve İlaç Direnci

Sığır theileriosis genellikle kene ile mücadele edilerek akarisitlerin kullanımı ile kontrol edilir, ancak bu yöntem sürdürülebilir değildir. Akarisitler pahalı olması, çevresel hasara neden olması dezavantaj olarak görülmektedir ve zamanla keneler yeni akarisitlerin geliştirilmesini gerektiren direnç geliştirirler. Stratejik kene kontrolü ve aşılamanın bir kombinasyonunu uygulayan theileriosisin kontrolü için daha

sürdürülebilir bir uygulamadı ancak bunlar henüz endemik bölgelerde geniş çapta başarıyla uygulanamamıştır. Sanitasyon ve dezenfeksiyon önlemleri genellikle, insizyonun bulaşmasını önlemede etkili değildir [14].

1970'li yıllardan beri menoctone ve hydroxynaphtoquinone bileşikleri kullanılmıştır ve takip eden yıllarda Buparvaquone ve parvaquone gibi kemoterapötik ajanlar *T. parva* ve *T. annulata*'yı tedavi etmek için kullanılmıştır. Bu ajanlarla yapılan tedaviler, enfeksiyonlarını tamamen ortadan kaldırmaz ve konakçılarda taşıyıcı durumların gelişmesine yol açabilmektedir. *T. annulata*'nın bir türünün geri kazanımı, diğer suşların çoğuna karşı çapraz koruma sağlar[15].

Buparvaquone şu anda hem *T.parva* hem de *T.annulata* enfekte hayvanların tedavisinde en etkili maddedir. Kas içine 2.5 mg / kg veya 5 mg / kg'lık tek bir doz deneysel olarak enfekte olmuş buzağılarda şizoidleri ve piroplazmaları hızlı bir şekilde ortadan kaldırır. Bu madde, 1980'lerden bu yana Tunus ve Türkiye'de büyük bir başarı ile kullanılmış olup, tedaviden sonra ölüm oranı% 10-12'ye kadar düşmektedir.

T. annulata veya *T. parva*'nın naftokinonlara direnci bugüne kadar literatürde hiç bildirilmemiştir. Bununla birlikte, esas olarak sıtmanın tedavisi için kullanılan bir naftokinon olan atovakuona karşı ilaç direnci, *Plasmodium falciparum* ve *Toxoplasma gondii* gibi birçok protozoa için tanımlanmıştır. Bu protozoada, mitokondriyal sitokrom b genindeki bir mutasyonun atovakuon direncini belirlediği gösterilmiştir [16], [17].

Son yıllarda tropikal theileriosisin tedavi başarısızlık oranlarında bir artış görülmüş ve buparvaquona karşı direnç olasılığı artmıştır. Son bilimsel raporlar, buparvaquona dirençli *Theileria annulata* popülasyonlarının varlığını göstermiştir [18].

1.1.3 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı

Yapıya dayalı ilaç tasarımı çalışmaları, son yıllarda birçok önemli başarıların olduğu ve hızla gelişen bir alandır. Genomik, proteomik ve yapısal bilgilerin dramatik artışı gelecekteki ilaç keşifleri için yüzlerce yeni hedef ve fırsat sağlayacaktır. İnsan genom projesinin tamamlanması, hem proteomiklerin hem de yapısal genomik devrimlerin başlangıcı ve bilgi teknolojisindeki gelişmeler, yeni ilaç yollarının keşfedilmesindeki başarı öyküsünün bir parçası olmak için yapıya dayalı ilaç tasarımı için daha büyük bir

fırsat yaratmaktadır. Biyoenformatikteki gelişmeleri kullanarak ilaç hedefleri hızlıca tanımlanmaktadır ve bu hedefler için genler hızlı bir şekilde klonlanabilir, protein ifade edilir ve saflaştırılır[19].

İlaç endüstrisi, moleküler modelleme de dâhil olmak üzere modern tıbbi kimya yöntemlerini, yapı-aktivite ilişkilerini incelemek için güçlü araçlar olarak kullanmaya başlamıştır. Farmakodinamik verilere ek olarak (güç, afinite, etkinlik, seçicilik) farmakokinetik özellikler (ADMET: absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite) bu metodolojilerde uygulanmaktadır. Yapı temelli ilaç tasarımı yöntemleri (biyolojik hedeflerden toplanan üç boyutlu yapısal bilginin kullanımı), modern tıbbi kimyanın önemli bir bileşenidir. Moleküler yerleştirme, yapı temelli sanal tarama ve moleküler dinamik (MD), bağlanma enerjisi hesaplama, moleküler etkileşimler ve indüklenmiş konformasyonel değişiklikler gibi moleküler tanıma olaylarının analizindeki geniş uygulama alanları nedeniyle en sık kullanılan stratejileri arasındadır [20].

Küçük moleküller olan ligandların makromoleküllerle etkileşime girdiği prensipleri anlamak, farmasötik araştırma ve geliştirmede çok önemlidir. Yapıya dayalı ilaç tasarımı genellikle deneysel olarak ya da hesaplamalı homoloji modellemesi yoluyla elde edilen yapısal verilerin sistematik kullanımını ifade eder. Amaç, yüksek reseptör bağlanma afinitesi elde etmek için ligandları spesifik elektrostatik ve stereokimyasal niteliklerini kavramaktır. Üç boyutlu makromoleküler yapıların mevcudiyeti, yarıkların, oyukların ve alt ceplerin mevcudiyeti de dâhil olmak üzere, bağlama bölgesi topolojisinin titiz bir incelemesini mümkün kılar. Yük dağılımı gibi elektrostatik özellikler de dikkatle incelenebilir. Mevcut yapıya dayalı ilaç tasarımı yöntemleri, hedef reseptörün etkin modülasyonu için gerekli özellikleri içeren ligandların tasarımına izin vermektedir [21].

Mevcut ilaçların çoğunun hedef molekül olarak proteinler olduğu bilinmektedir. Nükleik asitler de hedef molekül olarak alınabilir fakat keşfi ve yapıya dayalı ilaç tasarımında ilaç hedefi olarak kullanımı, toksisite, yüksek özgüllük elde etmede zorluk, vb. gibi çeşitli etkiler nedeniyle sınırlı kalmıştır. En modern ilaç keşif projeleri, “doğrulanmış bir ilaç hedefi” elde etmek için protein hedef tanımlaması ve doğrulaması ile başlar. Yapı temelli ilaç tasarımı için söz konusu proteinin üç boyutlu yapısının

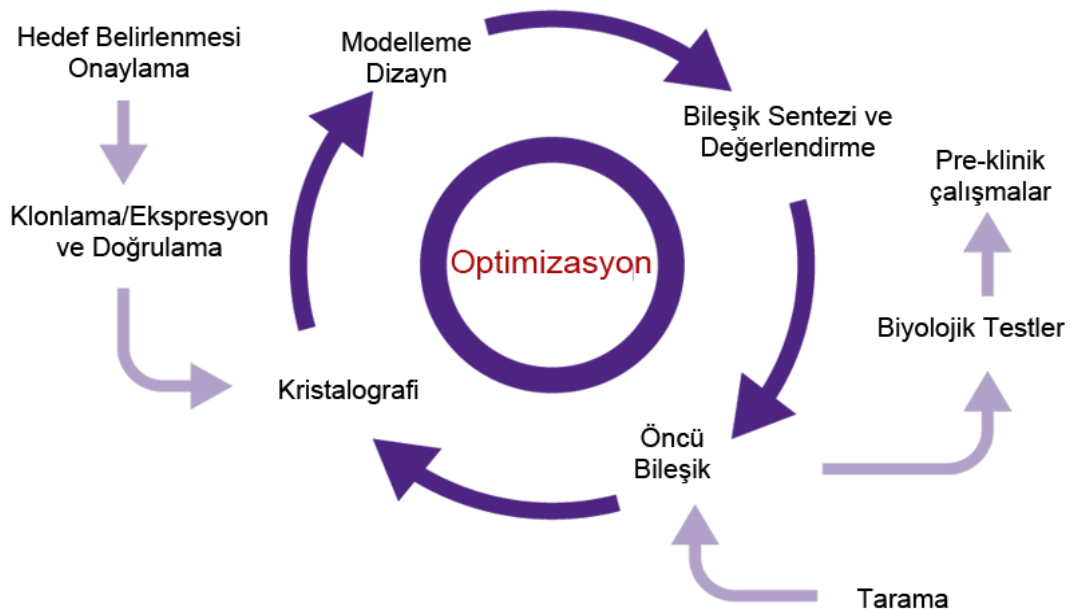
mevcut yüksek çözünürlüklü deney yöntemlerinden protein kristalografisi veya NMR yöntemler ile belirlenmesi gerekir [22].

Bir ilaç hedefini belirlerken öncelikle bazı sorulara cevap aranması gerekmektedir. Hedef protein, inhibe edilirse hücre tarafından atlanabilen bir biyokimyasal yola ait mi? Eğer bu yolak bypass edilebiliyorsa, hedef proteini inhibe etmek çok fazla bir fark yaratmayacaktır. Amacımız bir patojene ait bir proteini inhibe etmek ise insan konakçıda ilacın etkileyebilecek herhangi bir ilgili protein var mı sorusu sorulmalıdır. Eğer hedef molekül ile ilgili literatürde bilgiler yok ise, bu moleküle ilaç bağlanabilir mi ve ilaç bağlanma bölgeleri var mı sorguları yapılmalıdır. Aktif bölge içindeki mevcut etkileşimlerin eşleştirilmesine yardımcı olacaktır ve bu da yeni bileşiklerin tasarlanacağı sonraki adımda yardımcı olacaktır. Protein hedefi için mevcut üç boyutlu bir yapı yoksa, homolog bir proteinin bir yapısını bulmaya çalışabilir, bu daha sonra homoloji modellemesi için kullanılabilir. Hedef moleküle yönelik tasarlanmış ilaç adayının belirlenmiş olan bölgelere moleküler docking metodu ile yanaştırılıp etkileşimleri analiz edilmelidir [23].

İlaç keşfi ve yapı temelli ilaç tasarımı ile ilgili soruların çoğu yapısal biyoinformatik araçları kullanılarak cevaplandırılabilir. Örneğin, sekans hizalama ve analiz ile takip edilen bir dizi veri tabanları araştırması, belirli bir organizmada belirli bir hedefin özgüllüğü ile ilgili soruları kolayca cevaplayabilir.

Yeni bir ilaca giden yol zor ve sıkıcı bir süreçten geçmektedir. Modern bir bakış açısıyla farklı yöntemler ve disiplinler arasındaki etkileşimin iç içe geçmiş bir görünümü Şekil 1. 2'deki şemada gösterilmiştir. Sanal veya *in vitro* tarama ile öncül bileşiklerinin taranması, hedef molekülün üç boyutlu yapı eldesi (kristalografi yada moleküler modelleme), öncül bileşiklerin hedef moleküle yanaştırılması ve uygun bağlanma pozisyonunun belirlenmesi ve öncül bileşiğin modifikasyonu gibi tekrarlı bir süreçten geçerek ilaç adayları belirlenmektedir. Son birkaç yılda moleküler modelleme ve özellikle ligand-reseptör etkileşimlerinin modellenmesi önem kazanmıştır. Her ne kadar modelleme, esas olarak, öncül bileşiklerinin hedeflenen yapı modifikasyonu için kullanılsa da, aynı zamanda, ilaçların ve ligand yapısı keşfinin yapı-temelli ve bilgisayar destekli tasarımı için de uygundur [23].

Modelleme ve bilgisayar destekli tasarıma ek olarak, yapı-aktivite ilişkileri analizi, bileşiklerin kimyasal yapısı ile biyolojik etkileri arasındaki korelasyonun anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Bu yöntemleri kullanarak, biyolojik aktivitelerin biyolojik aktivitesi, taşınması ve dağılımı üzerine lipofilik, elektronik ve sterik faktörlerin etkisi, ilk kez istatistiksel olarak önemli temeller üzerinde sistematize edilebilir.



Şekil 1. 2 Yapıya dayalı ilaç tasarımı yolağı

1.1.4 *In silico* İlaç Tasarımı

1.1.4.1 Homoloji Modelleme

Karşılaştırmalı modelleme veya şablona dayalı modelleme olarak da adlandırılan "homoloji modelleme" terimi, bir homolog proteinin (şablon) bilinen bir deneysel yapısını kullanarak protein 3-boyutlu (3D) yapısının modellenmesi olarak bilinmektedir. Yapısal bilgi her zaman protein fonksiyonu, dinamikler, ligandlar ve diğer proteinler ile etkileşimler çalışmasında büyük yardım sağlamaktadır. Homoloji modellemesi ile sağlanan "düşük çözünürlüklü" yapı, protein oluşturan residülerin düzenlemesi hakkında yeterli bilgi içerir ve yeni deneylerin tasarımına yardımcı olabilmektedir. İlaç endüstrisinde homoloji modellemesi, yapıya dayalı ilaç keşfinde ve ilaç tasarımında değerli çalışmalar arasındadır [24]. Bir proteinin 3 boyutlu yapısının amino asit

dizisinden tahmin edilmesi temel bir bilimsel problem olmaya devam etmektedir. Homoloji modelleme yöntemleri, evrimsel olarak benzer proteinlerin yaklaşık aynı yapıyı paylaştıkları gerçeğini kullanırlar. X-ışını kristalografisi veya NMR spektroskopisi gibi deneysel yöntemlerle protein yapısının belirlenmesi zaman alıcıdır ve tüm proteinlerde, özellikle de membran proteinleri ile başarılı değildir. Halen, deneysel olarak çözülen yapıların sayısı yeni keşfedilen dizilerin sayısının çok gerisinde kalmaktadır [25]. Bir protein yapısının deneysel olarak aydınlatılması, yeterli miktarda malzeme (proteinlerin miligram miktarlarının klonlanması, ekspresyonu ve saflaştırılması) ve kristallenme ile ilgili zorluklarla çoğunlukla karşılaşılmaktadır. Bu bağlamda, protein yapısının tahmin edilmesiyle ilgili yöntemler giderek çoğalmaktadır. Bu yöntemler arasında, homoloji modelleme yöntemi genellikle en güvenilir sonucu sağlar. Bu yöntemin kullanılması, aynı familyaya ait olan iki proteinin (benzer bir amino asit dizilerinin paylaşılması) benzer üç boyutlu yapılara sahip olacağı gözlemine dayanmaktadır. Gerçekte, bir aile içindeki protein üç boyutlu yapının korunma derecesi, dizinin korunmasından çok daha yüksektir [26].

Homoloji modellemede temel olarak izlenen adımlar; şablon tanımlama-amino asit dizisi hizalaması-hizalamanın doğrulanması-molekül yapısının omurgasının oluşturulması-halkasal yapıların oluşturulması-yan zincir oluşturulması ve optimizasyonu-genel model optimizasyonu-model doğrulama, kalite kriterleri, model kalitesi olarak sıralanabilmektedir.

Deneysel olarak oluşturulmuş bir protein yapısı şablon olarak alınabilmesi için, hedef diziyle ~% 30 veya daha fazla yapısal benzerlikte olması gerekmektedir. Oluşturulan homoloji model soyut ve tahminidir dolayısıyla hata içerebilir. Dizi özdeşliği veya benzerliği derecesine ve hizalama kalitesine bağlı olarak, gerçek deneysel yapıya kıyasla homoloji modellerinin doğruluğu ~1–2 Å RMSD'ye kadar olabilir. Genel bir kural olarak,% 50'den fazla dizi özdeşliği ile oluşturulan modeller, ilaç keşif uygulamaları için yeterince hassastır. % 25 ile % 50 arasında olanlar, hedef uyumsuzluğunu ve tasarım mutagenез deneylerini değerlendirmek için kullanılabilir fakat % 10 ila % 25 arasındakiler güvenilir modeller değildir. Model kalitesi, şablon ve hedef diziler arasındaki benzerlik ile doğrudan ilişkili olsa da, bu kural her zaman geçerli değildir [26].

Sekans hizalama, doğru homoloji modellerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Çift yönlü hizalama araçları, bir dizi arasında optimum hizalamaları (yerel veya global) aramak için dinamik programlama yöntemlerini kullanır. Bu yaklaşım, homolog diziler için veritabanlarını aramak için yararlıdır. Çoklu dizi hizalama yöntemleri aynı zamanda korunmuş bölgeleri tanımlamak, fonksiyonel bölgeleri ve protein fonksiyonlarını ve aynı zamanda filogenetik analizleri desteklemek için birkaç diziyi aynı hizaya getirmektedir. Bu yaklaşım özellikle düşük (<40%) dizi özdeşliği olan proteinler için uygundur. Tek bir şablonun hedefin tam yapısal bilgisini sağlamadığı durumlarda, çoklu model yaklaşımı veya karıştırma ve eşleştirme teknikleri, genel model kalitesini iyileştirmek için birden fazla homolog şablondan yapısal bilgileri içerir [26], [27].

Kullanıcılar için açık kaynaklı, küçük ve kullanışlı programlar mevcuttur ve homoloji modelleme çalışmalarında yeni başlayanlar için web tabanlı programlar için yaygındır. Ancak, yazılım ve yöntem seçiminde açık kaynak ve müdahale edilebilir parametrelere sahip yazılımlar tercih edilmesi gerekmektedir. Programlar arasında en popüler olanları MODELLER [28], MOE-Homoloji [29], Prime (Schrödinger) [30], Rosetta [31] ve birçok web tabanlı küçük ölçekli programa ek olarak SWISS-MODEL, katı-gövde montaj yöntemini kullanan tam otomatik bir web tabanlı bir yazılımdır. Herhangi bir ek yazılım ve büyük veri olmaksızın 3 boyutlu bir model üretebilir. İstenen hedef dizinin tanımlanması, hedef dizi ile diğer diziler arasındaki evrimsel benzerliğin belirlenmesi, 3D şablon proteininin seçilmesi vb. tek bir sunucu üzerinde gerçekleştirilebilir. SWISS-MODEL yaklaşımında benzer omurgalar ve yan zincirler şablon yapısından hedef yapıya aktarılmaktadır [32].

MODELLER programında mekânsal kısıtlamaların uyumu yöntemi kullanılmaktadır. Yöntemde, hizalanmış pozisyonlar, bağ uzunlukları, bağ açıları, di-hedral açıları ve bağlanmamış atom-atom temasları arasındaki benzer mesafeler ve açılar kullanılmaktadır. MODELLER CHARMM format topolojisini kullanır ve parametre dosyaları tüm standart amino asitlerin özelliklerini içermektedir. MODELLER ile oluşturulan 3 boyutlu yapıların kalitesi DOPE (Ayrık Optimize Protein Enerjisi) skorlarına göre değerlendirilmektedir. DOPE bir atomik mesafeye bağlı istatistiksel potansiyel skorudur ve düşük DOPE skoru yüksek kaliteli bir modeli ifade etmektedir [33].

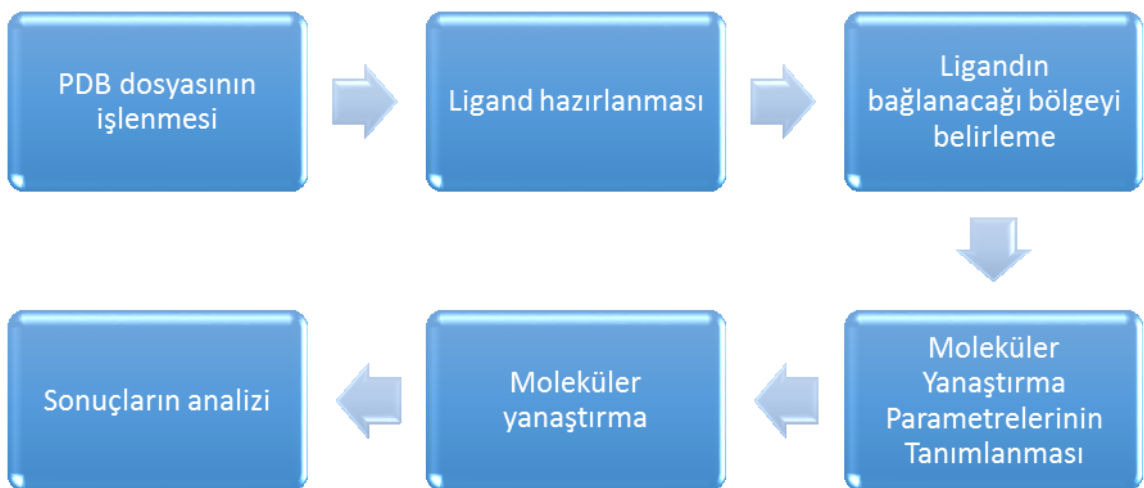
MOE-Homoloji, deneysel olarak belirlenen korunmuş omurga yapılarına, bir veya daha fazla şablon yapısından yan zincir uyumlarına dayanan bir segment eşleştirme yöntemini kullanarak aminoasit sekanslarının 3D modellerini oluşturur [34]. Tüm aday homoloji modelleri, AMBER kuvvet alanı kullanılarak en aza indirgenir ve enerjiye göre model kaliteleri sıralanmaktadır.

Prime (Schrödinger), protein üç boyutlu yapıların homolojisi veya karşılaştırmalı modellemesini kullanan bir yazılımdır. Homoloji modeli, bir hedef diziden ve bir şablon yapısından atom pozisyonu ve ikincil yapı kullanılarak oluşturulmuştur. Prime, ilk adımdan son adıma kadar tek bir sunucuda homoloji modellemesi yapan yazılım paketidir. Güçlü ve yenilikçi bir yazılım uyumu olan Prime, dizi hizalama, ikincil yapı tahmini, homoloji modellemesi, protein düzeltilmesi, döngü tahmini ve yan zincir öngörüsünü içermektedir [30].

1.1.4.2 Moleküler Yanaştırma Metodu

Moleküler yanaştırma ilaç keşif araçlarının önemli bir ortak bileşeni haline gelmiştir ve bunu nispeten düşük maliyetli, sonuçları algılamadaki kullanım kolaylığı nedeniyle yapıya dayalı ilaç tasarımı çalışmaları içinde büyük bir popülerlik kazanmıştır. İlaç keşif sürecinde hedefe spesifik protein ile bağlanan bir aday ilaç veya öncül bileşiği tasarlamaya yardımcı olur. Geleneksel ilaç keşif süreci hedef tanımlama ve doğrulama, öncül tanımlama ve potansiyel optimizasyon olmak üzere üç ana adımdan oluşmaktadır. Bu işlem pahalı ve ilacın tanımlanmasında çok uzun bir zaman almaktadır. Modern ilaç keşfi, ilaç-hedef etkileşimi, kararlılık ve aktiviteyi tahmin etmek için hesaplama yöntemlerinin etkili bir şekilde uygulanmasını içermektedir. Biyoinformatik yoluyla, çok sayıda ilaç seçimini sadece on ilaca veya hatta daha azına indirebilir. Sanal tarama, belirli bir hedef makromolekül ile potansiyel bağlanabilecek birçok bileşiğin taranmasıdır. Diğer bir ifade ile mevcut bir ilacın yerini tutabilecek veya ilaçsız hastalıklara ışık tutabilecek tek bir bileşik veya ilaç bulmak için milyonlarca bileşik veri tabanının yüksek verimli bir şekilde taranmasıdır. Milyonlarca bileşik, çok fazla zaman, çaba veya para harcamak zorunda kalmadan kolayca taranabilmektedir [35], [36]. Moleküler yanaştırma moleküler biyoloji, sayısal yapısal biyoloji, bilgisayar destekli ilaç tasarımı ve farmakogenomik alanında paha biçilemez bir araçtır. Docking

ayrıca büyük kütüphanelerin sanal taranmasında da hayati bir rol oynamaktadır. Sonraki sonuçlar buna göre sıralanır ve ligandların hedef makromolekülü nasıl inhibe / aktive ettiğinin yapısal hipotezi çıkarılabilir. Bu, ilaçların yapı optimizasyonunda paha biçilemez bir rol olduğunu kanıtlamaktadır. En önemlisi, geleneksel deneysel yöntemlerle çıkarılması zor olan belirli bilgileri sağlamaktadır. Moleküler yanaştırma prosedürü, iki alanda bir araya gelerek, 3D uzayda protein ve ligandlara uyarlanmaktadır. Bağlanma konformasyonu daha sonra değerlendirilir ve sonuçlar en uygun puanlar ile gösterilebilir. Bu yöntem, ilaçların öncül tanımlama ve yapı optimizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sadece moleküler yanaştırma, iki molekül arasındaki en uygun uyumu bulmaya çalışır. Bu çalışmalar bir protein-ligand, protein-protein ya da bir nükleik asit-makromolekül yanaştırması olabilir ve iki molekülün etkileşip etkileşmediğini öğrenmeyi amaçlamaktadır. Eğer etkileşim olmazsa etkileşimlerin maksimumda olduğu ve bağlanma enerjisinin minimumda olduğu bağlanma bölgesi araştırılması gerekmektedir. Bir ligand-protein yanaştırmasında, ana amaç birincil bağlanma cepleri öngörmektir. Yanaştırma amacı için kullanılan protein, daha önce homoloji modellemesi ile veya kristalografi ile 3B yapısının belirlenmiş olması gerekmektedir. Temel olarak, moleküler yanaştırma dört ana aşamadan oluşur: (a) ligand ve reseptörün hazırlanması, (b) aktif alanların tanımlanması, (c) varsayılan komplekslerin oluşturulması ve (d) puanlamalarla komplekslerin değerlendirilmesi olarak sıralanabilir [37], [38] (Şekil 1. 3).



Şekil 1. 3 Moleküler yanaştırma metodu temel basamakları

Moleküler yanaştırma prosedüründe, optimize edilmiş konformasyon ile ligand-reseptör kompleksini elde etmek ve daha az serbest baēlanma enerjisine sahip olan yapıyı elde etmek amaçlanmaktadır. Net öngörülen baēlanma enerjisi (ΔG_{bind}) hidrojen baēı (ΔG_{hbond}), elektrostatik (ΔG_{elec}), burulma serbest enerjisi (ΔG_{tor}), dispersiyon ve itme (ΔG_{vdw}), desolvasyon (ΔG_{desolv}), toplam iç enerji (ΔG_{total}) ve baēlanmamıř sistemin enerjisi (ΔG_{unb}) gibi parametreler dikkate alınarak toplam enerjisi hesaplanır. Bu nedenle, serbest enerjiyi (ΔG_{bind}) tahmini olarak hesaplama, moleküler yanaştırmadaki etkileşimlerin hakkında ek ipuçları saēlamaktadır [29], [38], [39].

Moleküler yanaştırma programları, ligand-reseptör komplekslerinin baēlanma enerjilerini tahmin etmek için skrolama fonksiyonlarını kullanmaktadır. Ligand-reseptör yapısının oluşumuna baēlı olarak enerji deēiřimi, baēlanma sabiti (K_d) ve Gibbs serbest enerjisi (ΔG_L) ile verilir. Baēlanma enerjisinin tahmini, moleküller arası etkileşimler, desolvasyon ve entropik etkiler dâhil olmak üzere, ligand-reseptör baēlanmasında rol oynayan en önemli fiziksel-kimyasal fenomenin deēerlendirilmesi ile gerçekteştirilir. Bu nedenle, deēerlendirilen fiziksel-kimyasal parametrelerin sayısı arttıka, puanlama fonksiyonunun doēruluēunu artırmaktadır. İdeal olarak, verimli skrolama fonksiyonları, geniş ligand setleri ile çalışırken kritik bir yönü olan doēruluk ve hız arasında bir denge sunması gerekmektedir [37], [38], [40].

Son yirmi yıl boyunca, 60'tan fazla farklı moleküler docking aracı ve programı, hem akademik hem de ticari amaçlı geliştirilmiştir; DOCK, AutoDock, FlexX, Surflex, GOLD, ICM, Glide, MOE-Dock ve AutoDock Vina bunlardan bazılarıdır. Bu programlar arasında, AutoDock Vina, GOLD ve MOE-Dock en iyi baēlanma pozisyonu ve skoru verecek programlardır. Glide (XP) ve GOLD, % 90.0'lık bir doērulukla tutarlı bir şekilde pozlar öngörmektedir. Ayrıca GOLD programının Glide'dan daha fazla zenginleştirme faktörleri ürettiēini, aynı zamanda Glide'ın benzer bir sanal taramasında GOLD'dan aynı hedefe karşı üstün performans gösterdiēini ortaya koymuştur. Genel olarak, bu yerleştirme programlarının, deneysel pozları 1.5 ila 2 Å arasında ortalama RMSD'ler ile tahmin edebildiēi belirtilmiştir. Bununla birlikte, esnek reseptör yerleştirme, özellikle de reseptörlerdeki omurga esnekliēi, mevcut yanaştırma yöntemleri için büyük bir zorluk oluşurmaktadır [41].

İndüklenmiş uyum paradigmasına uyan sistemlerde hem ligand hem de reseptörün esnekliklerini göz önünde bulundurmak hayati bir öneme sahiptir çünkü bu durumda hem ligand hem de reseptör uyumlarını değiştirerek minimum enerji mükemmel uyum kompleksi sağlaması gereklidir. Bununla birlikte, alıcı aynı zamanda esnek olduğunda işlem uzunluğu çok fazladır. Böylelikle, doğruluk ve hesaplama süresi arasındaki bir ortak nokta olan yaklaşım reseptör sabit tutulurken ligandı esnek olarak alınmaktadır. Hemen hemen tüm moleküler yanaştırma programları programları AutoDock , FlexX gibi bu metodolojiyi benimsemektedir [42].

AutoDock , reseptörü sabit tutarken ligand esnekliğini modellemek için Monte Carlo simüle edilmiş tavlama, evrimsel, genetik ve Lamarckian Genetik Algoritma yöntemlerini kullanmaktadır. Puanlama işlevi, van der Waals, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, konformasyonel entropi ve desolvasyon terimleri de dahil olmak üzere AMBER kuvvet alanına dayanmaktadır. Her bir terim, deneysel verilerden elde edilen ampirik bir ölçekleme faktörü kullanılarak hesaplanmaktadır. AutoDock yan zincirlerin hareket etmesine izin vererek reseptör esnekliğini de modelleyebilir. AutoDock Vina yakın zamanda moleküler yerleştirme ve sanal tarama için en son sürüm olarak piyasaya sürülmüştür. AutoDock için bir deneme seti olarak kullanılmış olan 190 reseptör-ligand kompleksinin yeniden düzenlenmesiyle, AutoDock Vina eşzamanlı olarak, bağlanma pozisyon tahmininin önemli ölçüde daha iyi olduğu belirtilmiştir [38], [39].

1.1.4.3 Moleküler Dinamik Yöntemler İle Simulasyon

1965 Nobel Fizik Ödülü'nün sahibi olan Richard Feynman ünlü bir ifadesi şöyledir; “Yaşamı anlamaya yönelik bir girişimde bulunarak herkesin en güçlü varsayımını adlandıırırsak, her şeyin atomlardan oluştuğu ve canlıların yaptığı her şeyin atomların salınımları ve kıpırdanmalarından (jiggling - wiggling) oluştuğu söylenebilir ”. Son 50 yıldaki biyofiziğin çoğu, bu atomik salınımların ve kıpırdanmaların doğasını daha iyi anlamaya adanmıştır. Mikroskobik dünyada hareketleri düzenleyen kuantum-mekanik yasaları şaşırtıcı bir şekilde makroskopik dinamiklere yabancısıdır. Hareketler deterministik yasalarla değil, olasılık fonksiyonları ile yönetilir. Kimyasal bağlar mekanik olarak değil, aynı anda dalgalar ve parçacıklar olan elektronların bulutlarını değiştirerek

oluşur [43]. 1950'lerin sonlarında ve 1960'ların başında, Alder, Wainwright ve Rahman ilk olarak sıvıların atomik hareketlerini anlamak için moleküler dinamikleri (MD) geliştirdiler. Bilgisayar biliminin ilerlemesiyle, MD birçok alanda çok değerli ve güçlü bir araç haline gelmiştir. 1970'lerden beri, MD hayatın kimyasal bileşenlerinin, özellikle proteinlerin veya nükleik asitlerin karmaşık yapısını ve dinamiklerini incelemek için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı bilgisayar biliminin gelişmesi nedeniyle daha fazla odak haline gelmiştir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımında yeni nesil araçların geliştirilmesinde bilgisayar bilimi ve algoritmasındaki gelişmeler önemli bir rol oynamıştır. Halen MD, nanosaniyeler gibi çok kısa bir zaman aralığında binlerce atom içeren biyomoleküler sistemlerin simülasyonları için kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu yöntem ilaç keşif ve gelişme gibi bir takım biyolojik problemleri çözmek için kullanılmaktadır [44]. Günümüzde simülasyon süresi sürekli olarak uzatılırken, mevcut çalışmalar deneysel verilerin rasyonelleştirilmesi için mikrosaniye aralığında simülasyonları yapılabilmektedir [45]. Klasik MD simülasyonları için en çok kullanılan hesaplama araçları, GROMACS, NAMD, CHARMM ve AMBER yazılımlarıdır. MD simülasyonları Newton'un hareket denklemlerinin sayısal denklemidir (1.1).

$$f_i = m_i a_i = - \frac{\delta V(r^N)}{\delta r_i} \quad (1.1)$$

Burada m_i i atomunun kütlesi, a_i i atomunun ivmesi ve f_i sistemdeki tüm parçacıkların $r^N = (r_1, r_2, \dots, r_N)$ ile ifade edilen pozisyonlarına bağlı olan potansiyel enerji fonksiyonunun V kısmi, uzamsal türevi tarafından verilen atom üzerinde etkili olan kuvettir. MD simülasyonları, dinamik süreçlerin incelenmesine izin veren bir sistem konfigürasyonları dizisi üretmektedir. Zaman serileri ayrıca, yapılandırmaların istatistiksel-mekanik topluluğu olarak da görülebilir. Bu topluluk üzerinde ortalama olarak, bir sistemin termodinamik özelliklerine erişilebilmektedir [45], [46].

Klasik MD simülasyonlarında, genellikle "kuvvet alanı" olarak adlandırılan potansiyel enerji fonksiyonu, atomlar (veya genellikle parçacıklar) arasındaki etkileşimleri tarif etmektedir. Kovalent olarak bağlanmış atomlar (bonded atoms) (yani bağlar, açılar, burulmalar) ve bağlanmamış terimler (non-bonded) (yani van der Waals etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimler) arasında bağlanmış terimlerden oluşur. Kuvvet alanının

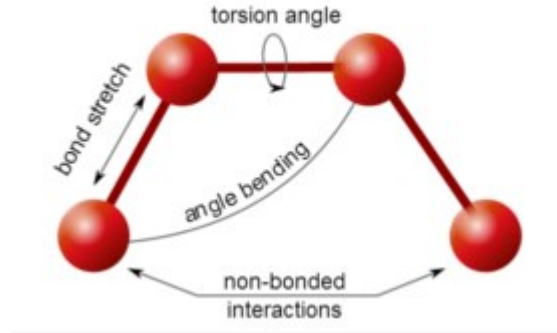
parametreleri tipik olarak daha yüksek seviyeli hesaplamalar ve / veya deneylerden veri üretmek için tasarlanmıştır. Proteinler, DNA, lipidler ve karbonhidratlar gibi biyomoleküllerin çoğunluğu için, sadece bir kez parametrelenmesi gereken nispeten az sayıda yapı bloğu kullanılabilir. AMBER , OPLS , CHARMM ve GROMOS gibi geleneksel biyomoleküler kuvvet alanları sürekli olarak iyileştirilmiş ve yıllar boyunca test edilmiştir. Buna karşılık, küçük organik moleküllerin çeşitliliği, yapı taşlarının kullanılmasını önler ve ligandların ayrı ayrı parametrelenmesi gerekir. Bağlanmış terimler ve van der Waals etkileşimleri için parametreler tipik olarak bir genelleştirilmiş kuvvet alanından alınır, oysa kısmi atomik yükler bir QM hesaplamasından türetilir. Bu amaçla en yaygın kullanılan kuvvet alanları genel AMBER kuvvet alanı (GAFF), OPLS all-atom kuvvet alanı (OPLS-AA) , CHARMM genel kuvvet alanı (CGenFF) ve GROMOS otomatik topoloji oluşturucu olarak sıralanabilmektedir [45], [46].

Moleküler dinamik hesaplarında sistemin faz uzayında minimum enerjili bir konuma yerleşmesi ve burada dengelenmesi amaçlanır. Faz uzayında denge durumuna yerleşen sistem, gerçek bir fiziksel iki sistemin pek çok özelliğini doğru olarak yansıtır. Moleküler dinamik yöntemde başlangıç olarak moleküllerin enerji toplamaları hesaplanır (1.2). Kuvvet alanı, parametrelerle birleşen bir dizi enerji fonksiyonudur. Belirli bir sistem için potansiyel enerjiyi tanımlar, böylece her atomdaki kuvvet simülasyonda hesaplanabilir. Bağlı olmayan ve bağlı olan terimlerden oluşmaktadır. Birincisi iki atom arasındaki elektrostatik ve van der Waals (vdW) etkileşimlerini içerir; ve ikincisi, sırasıyla bir, iki ve üç kovalent olarak bağlanmış atom tarafından tanımlanan bağ, açı ve dihedral açılarını içerir ve bir sistemin potansiyel enerjisi, bunların toplamıdır (Şekil 1. 4).

$$U(R) = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} (1 + \cos[\eta\phi - \gamma]) + \sum_{i < j}^{atoms} \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \sum_{i < j}^{atoms} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \quad (1.2)$$

Sistemdeki atomların toplam potansiyel enerjileri bulunduktan sonra parçacığa etki eden kuvvet bulunur. Potansiyel enerjinin yola göre türevi kuvveti verir ve ivme yardımıyla her bir atomun yaptığı hareketi Verlett algoritması ile hesaplanmaktadır (1.3).

$$\vec{r}_{t+1} = 2\vec{r}_t - \vec{r}_{t-1} + \vec{r}_t dt^2 \quad (1.3)$$



Şekil 1. 4 Atomları arası etkileşime katkıda bulunan bağların gösterimi

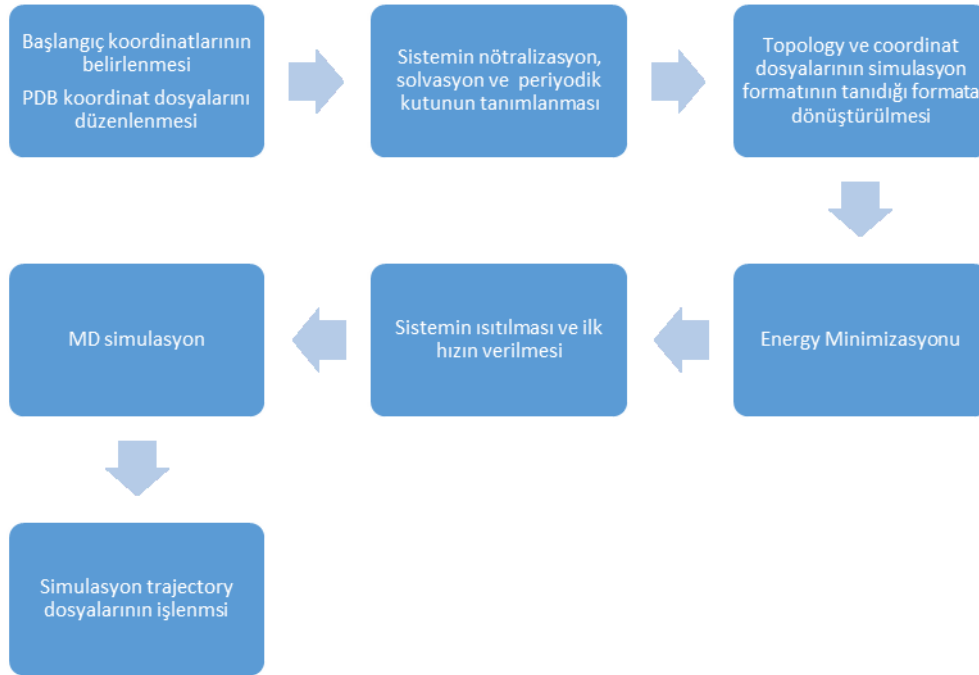
Enzim katalizi, sinyal transdüksiyonu ve protein-protein bağlanması dahil olmak üzere birçok biyolojik süreç, geniş bir zaman aralığında hareket etmektedir (Şekil 1. 5) [47].

fsec	psec	nsec	µsec	msec
Atomik alınımlar	Halkasal yapıların yer değiştirmesi	Sekonder yapıların hareketi	Membran hareketleri	
Titreşim hareketleri	Yan zincir dönüşümler	Protein katlanması	Konformasyon değişikliği	
			Molekülleri ayrılması	
			bağlanması	

Şekil 1. 5 Biomoleküler hareketlerin gerçekleştiği zaman aralıkları

Amber, kullanıcıların özellikle proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar için moleküler dinamik simülasyonlarını gerçekleştirmelerini ve analiz etmelerini sağlayan bir program paketinin ortak adıdır. Aynı zamanda biyomoleküllerin moleküler dinamiği için kuvvet alanları ailesinde adıdır. Amber yazılım paketi üç çeşit program içerir: hazırlık programları, simülasyon programları ve analiz programları (Şekil 1. 6). Ana hazırlık programları Antechamber ve LEaP'dır. Antechamber, çoğu organik molekül için kuvvet alanı geliştirme süreci için kullanılmaktadır. Yapıları (genellikle PDB formatında) ile başlar ve moleküler modellemede kullanılmak üzere LEaP'ye okunabilen dosyaları oluşturmaktadır. Üretilen kuvvet alanı tanımı, proteinler ve nükleik asitler için olağan Amber kuvvet alanları ile uyumlu olacak şekilde tasarlanmıştır. LEaP, temel model

oluşturma ve Amber koordinat ve parametre / topoloji giriş dosyası oluşturma sağlayan bir windows tabanlı bir programdır [48].



şekil 1. 6 MD simülasyon protokolü

1.1.4.4 MM-GB(PB)SA Metodu İle Tahmini Serbest Bağlanma Enerji Hesaplamaları

Moleküler yanaştırma hesaplamaları artık mevcut bileşik kütüphaneleri / veritabanlarından belirli hedeflere karşı yapısal olarak farklı moleküllerin yüksek performanslı sanal taramalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk "hedef" veya "öncül" molekülleri belirlendikten sonra (normalde düşük μM inhibitörleri), "öncül optimizasyon" fazında kimyasal özelliklerinin modifiye edilmesi, bağlanma afinitelerini ve diğer istenen ilaç benzeri özelliklerini iyileştirebilir. Bununla beraber, moleküler yanaştırma hesaplamaları ihtiyaç duyulan öncül tanımlama aşamasının ötesinde sınırlı bir başarıya sahiptir. Bu bağlamda Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area (MMGBSA) ve Molecular Mechanics / Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı (MM-PBSA) yöntemleri, moleküler mekaniği (forcefields) ve sürekli (implicit) solvasyon modelleri kullanarak bağlanma enerjileri hesaplar. Bu hesaplama teknikleri Amber ve Schrödinger gibi yazılım programları kullanılarak bir dizi hedefe başarıyla uygulanmıştır [49].

Yapıya dayalı ilaç tasarımının amacı, makromoleküler bir reseptöre bağlanan yeni bir farmasötik bileşik bulmaktır. Bağlanma gücü bağlanma serbest enerjisi, ΔG_{bind} ile belirlenmektedir. Geleneksel olarak, tasarım biçimleri deneysel olarak, hem zaman alıcı hem de maliyetli bir süreçtir. Bu nedenle, yeni ilaçların tasarlanması için zaman ve maliyetin azaltılması amacıyla hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Yöntemin seçimi, tasarımda hangi aşamada kullanılacağına bağlıdır ve tipik olarak doğruluk ve verimlilik arasında bir denge vardır. İlaç tasarımında en yaygın kullanılan hesaplama yöntemleri, bağlanma biçimi ve skorlamadır, böylece ilacın bağlanma biçimi tahmin edilir ve bunu takiben bağlanma afinitesi tahmin edilir. Bu yöntem bağlanma modlarını tahmin etmek ve bağlanan yada bağlanmayan arasında ayırım yapmak için kullanılabilirler ama hesaplanan değerler tek başına anlamlı olarak ifade edilemezler [49], [50].

Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM-GBSA) ve Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) metodları moleküler mekaniği ve implicit solvent modelini kullanarak serbest bağlanma enerjilerini hesaplamaktadır. Serbest bağlanma enerji hesap formülasyonunda kompleks (reseptör+ligand), apoprotein (reseptör) ve ligandın ayrı ayrı enerjiler hesaplanır (1.4).

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{complex} - (\Delta E_{reseptör} + \Delta E_{reseptör}) \quad (1.4)$$

MM-GB(PB)SA metodu ile enerji hesaplamalarında ortamdaki explicite su nedeniyle enerji değişimleri büyük dalgalanmalar şeklinde olur. Bu sebeple implicit solvent ile yer değiştirerek bu değişimler minimize edilmektedir. Herbir sistemin enerji hesabında E_{MM} gaz fazındaki sistemin moleküler mekanik enerjisini ve E_{solv} ise solvent içindeki serbest enerjiyi ifade etmektedir (1.5). Gaz fazındaki moleküler mekanik enerji kompleks, reseptör ve ligandın non-bonded bağlar olan electrostatik and van der Waals bağlarında oluşan enerjilerin toplamıdır. Yapılan simülasyon boyunca her bir sistemin moleküler mekanik enerji fonksiyonları (kuvvet alanları) kullanılarak sistem enerjisi hesaplanır. Solvent fazında hesaplanan enerji polar ve non-polar katkılar toplanarak hesaplanmaktadır. Polar enerji katkıları generalized Born (MMGBSA) ve Poisson-Boltzmann (MMPBSA) modellerine göre hesaplanabilmektedir. Ayrıca non-polar solvent etkisi de eklenmesi gerekmektedir (1.6) [50], [51].

$$\Delta E = \Delta E_{MM} + \Delta E_{solv} \quad (1.5)$$

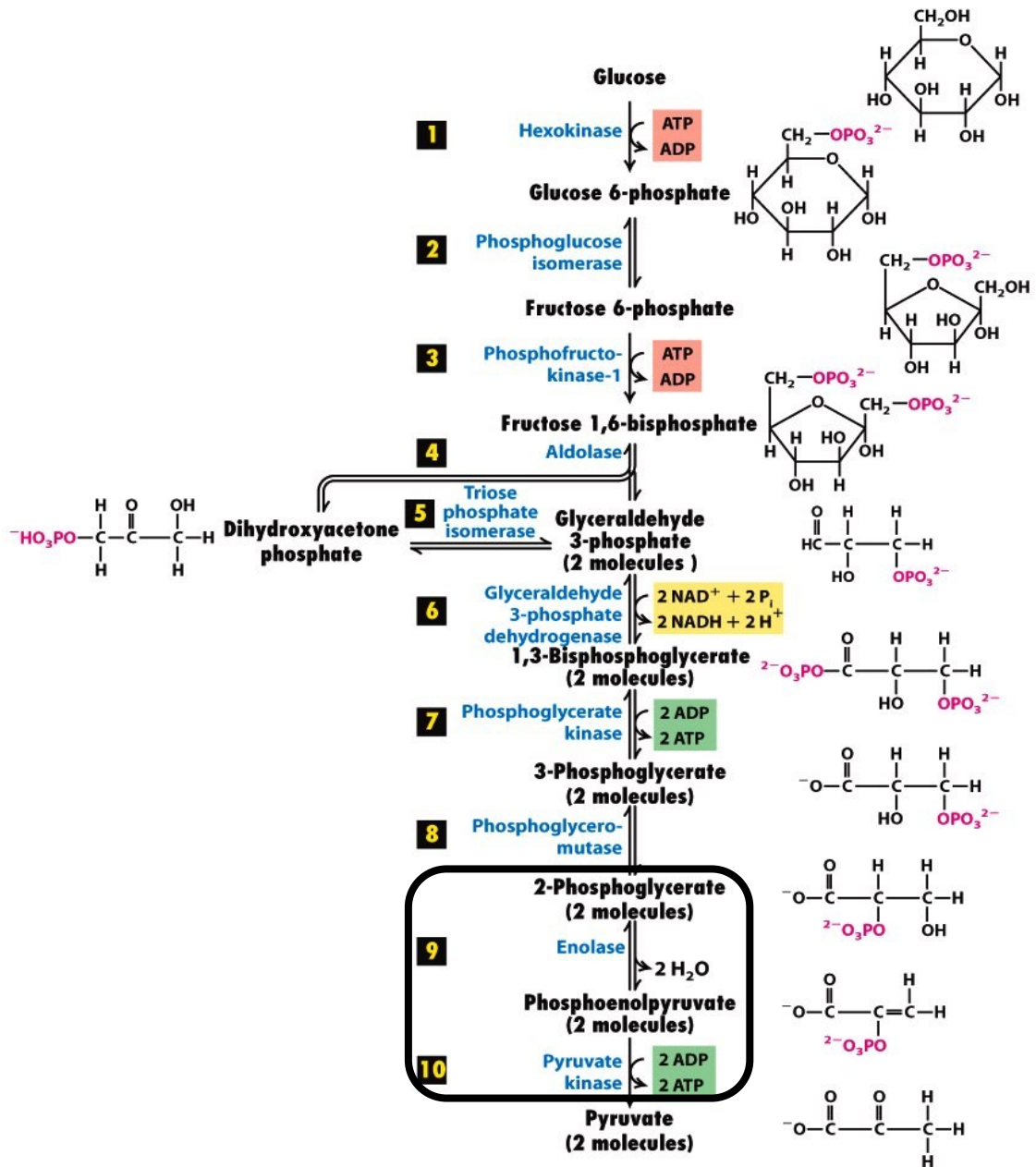
$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{gas}(\Delta VDW_{gas} + \Delta EEL_{gas}) + \Delta E_{solv}(\Delta EGB_{solv} + \Delta SURF_{solv}) \quad (1.6)$$

1.1.5 Yapiya Dayalı İlaç Tasarımı Hedefi Olarak Enolaz

Enolaz (2-fosfo-d-gliserat hidroliyz, EC 4.2.1.11), 2-fosfogliserat (2PG)'in fosfoenolpiruvat (PEP)'e glikoliz ve glukoneojenezde tersinir olarak katalize eder (Şekil 1. 7) [52]. Enolaz, magnezyum (Mg^{2+}) gibi bivalent metallerin katyonları tarafından aktive edilen bir metalloenzimdir. Bakterilerde, enolazlar yüksek ölçüde korunmuş enzimlerdir ve genellikle 80-100 kDa aralığında molekül ağırlıkları olan homodimerler olarak bulunurlar ve tek bir alt ünitenin moleküler ağırlığı 40 ila 50 kDa arasında değişir. Fakat termofilik bakteriler *Thermotoga maritima* ve *Thermus*'tan saflaştırılmış enolazın oktamer olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, anaerobik, hipertermofilik archaeon *Pyrococcus furiosus*'un enolazı bir homodimer olarak rapor edilmiştir [53].

1.1.5.1 Enolazın yapısı ve izoformları

Yüksek dereceli omurgalılarda bu glikolitik enzim her biri ayrı bir gen tarafından kodlanan üç alt birim (α , β ve γ) tarafından oluşturulan homodimerler ve heterodimerler olarak bulunur. Bu genlerin ekspresyonu, dokuya özel bir şekilde gelişimsel olarak düzenlenir. Embriyonik ve her yerde bulunan $\alpha\alpha$ izoformu, çoğu yetişkin hücre tipinde yaygın olarak dağılmış halde bulunur. $\alpha\alpha$ veya nöronal olmayan enolaz (NNE) olan ve ayrıca enolase 1 olarak da bilinen izoform karaciğer, beyin, böbrek, dalak, adipoz gibi çeşitli dokularda bulunur. Tüm normal insan hücrelerinde bir seviyede bulunur. $\beta\beta$ kas spesifik enolaz (MSE) ve enolase 3 olarak da bilinen izoform kasta çok yüksek seviyelerde bulunmaktadır. $\gamma\gamma$ veya nöron spesifik enolaz (NSE) ve enolaz 2 olarak da bilinen izoform nöral dokularda çok yüksek seviyelerde eksprese edilir, burada toplam çözünebilir proteinin% 3'ünü oluşturur. Çoğu memeli hücresinde çok daha düşük seviyelerde ifade edilir [54], [55].



Şekil 1. 7 Glikoliz yolağı [52]

1.1.5.2 Enolazın mekanizması

Enolaz, 2-fosfogliseratın fosfoenolpiruvat'a geri dönüşümlü dehidrasyonunu katalize eder. Enolaz reaksiyonu metal iyonu katalizini, ilave bir genel asit-baz katalizi ve geçiş halinin stabilizasyonu şeklinde gerçekleşir. Reaksiyon iki adımda gerçekleşir. İlk olarak Lys345, 2-fosfogliseratın C-2'sinden bir protonu soyutlayan genel bir baz katalizörü olarak işlev görür; daha sonra Glu211 OOH ayrılan gruba bir proton veren bir genel asit katalizörü olarak davranır. 2-fosfogliseratın C-2'sindeki proton çok asidik değildir ve bu

nedenle kolayca çıkarılmaz. Bununla birlikte, enzim aktif bölgesinde, 2-fosfoglisarat, iki bağlı Mg^{+2} iyonları ile güçlü iyonik etkileşimlere uğrar, bu da C-2 protonunu daha asidik hale getirir (pKa'yı düşürür) ve daha kolay soyutlanır. Diğer aktif bölge amino asitlere hidrojen bağlanması da genel mekanizmaya katkıda bulunur. Çeşitli etkileşimler hem enolalat ara maddesini hem de oluşumundan önceki geçiş durumunu etkili bir şekilde stabilize eder [56].

Enolaz hem bakteriler hem de ökaryotlarda glikolitik yolda görev alır ayrıca glikolitik olmayan fonksiyonları da bulunmaktadır. Enolaz esas olarak glikoliz ve glukoneogenezdeki fonksiyonunun yanı sıra hücre iskelet sistemi ile etkileşerek hücre morfolojisi ve madde alışverişini düzenlenmesinde rol oynayan tüm ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında yer alır. Enolaz ayrıca morfolojik transformasyon ve hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin transkripsiyonel regülasyonuna katıldığı memeli hücrelerinin çekirdeğinde de saptanmıştır. Bakteriyel enolazın mRNA stabilitesinin düzenlenmesinde işlev gördüğü ve degradozomun bir ana bileşeni olduğu bilinmektedir. Memeli α -enolazı aynı zamanda inaktif bir monomer olarak bulunduğu göz merceğinin ana yapısal bileşeni olarak bulunur. Ek olarak enolazın birçok patojenik olmayan ve patojenik organizmanın hücre yüzeyinde eksprese edilebildiğini açıklanmıştır. Enzim *S. cerevisiae*'nin hücre duvarında ve aynı zamanda invazyon sırasında bir immünodominant antijen oluşturan patojenik maya *Candida albicans*'ın yüzeyinde bulunmuştur. *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus mutans* gibi bazı bakteriyel patojenlerde yüzey enolazının önemli bir virülans faktörü olduğu vurgulanmıştır. *Plasmodium* spp. gibi Apicomplexan parazitlerinde, hücre yüzey enolazının doku invazyonu sürecinde rol aldığı bilinmektedir [57], [58].

Kanser hücrelerinin sınırsız büyümesi, geniş bir besin kaynağı gerektirir. Bu talebi karşılamak için, kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla glukoz alımını ve metabolizmasını büyük ölçüde yukarı doğru düzenler. Bu fark, bu hastalığın tedavisi için glikolizin engellenmesini büyüleyici bir strateji haline getirmiştir. α -enolaz, kanser hücrelerinde en fazla düzenlenmiş glikolitik enzimlerden sadece biri değildir, aynı zamanda hücre göçü, invazyon ve hipoksi gibi kanser hücresinin hayatta kalması için önemli olan birçok hücresel süreç veya durumla da ilişkilidir. Hedeflenen α -enolaz,

kanser hücrelerinde aynı anda birden fazla şekilde yolakta yer almaktadır ve bu nedenle, antikanser ilaç geliştirme için iyi bir hedeftir. Mevcut çalışmada, ZINC veritabanından Lipinski'nin beşi olan kuralını karşılayan 22 milyondan fazla kimyasal yapı, sanal tarama ile α -enolaza yanaştırılmıştır. Enolaz substratı olan 2-fosfogliserattan daha iyi olan yirmi dört kimyasal yapı, absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (ADMET) özellikleri analiz edilmiştir. Bunlardan dördü, mutajenik ve karsinojenik olmayan, oral uygulama yeteneğine sahiptir ve moleküler dinamik (MD) simülasyonu ile mevcut inhibitörlerle karşılaştırılabilir [59].

1.1.5.3 *Theileria annulata* Enolazı

Theileriosis'e sebep olan *Theileria annulata*'ya karşı bu hastalığını tedavisinde 1990'lı yıllardan beri anti-protozoal ilaçlar olarak Parvaquone ve Buparvaquone yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat ilk olarak 2010 yılında direnç rapor edilmiştir [18].

Yapıya dayalı ilaç tasarımı çalışmaları kapsamında hedef molekül olarak belirlenen *Theileria annulata* enolazı ilk olarak 2014 yılında izole edilip klonlanmıştır. Ayrıca web tabanlı uygulamalar ile dizi analizi yapılarak insersiyonlar, katalitik ve önemli residüler karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir [60]. 2014 yılında yapılan diğer bir çalışmada literatürde ilk olarak *Theileria annulata* enolazının saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Enolazın spesifik aktivitesi 40 U/mg, K_m : 106 μ M, k_{cat} : 37 s^{-1} ve k_{cat}/K_m : $3.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ olarak belirlenmiştir [61].

2016 yılında yapılan çalışmada *Theileria annulata* enolazının birincil ve ikincil yapı analizleri yapılmıştır ve homoloji modeli oluşturularak substratı olan 2-fosfogliserat moleküler yanaştırma yöntemiyle aktif bölgeye yanaştırılmıştır. Bu çalışmada katalitik residüler ve enolaz-substrat etkileşimleri ilk defa deneysel olarak belirlenmiş olan maya enolazı ile kıyasalanarak residu numaraları sistematığı geliştirilmiştir [62].

Son olarak 2017 yılında yapılmış tez çalışmasında Theileriosis'in tedavisinde kullanılabilecek kumarin türevlerinin parazit enolazını inhibisyon potansiyelleri araştırılmıştır. 38 adet kumarin türevi arasında *in vitro* tarama sonrası %90 ve üzeri inhibisyon özelliği olan 5 türev K5 (6,7-dihidroksi-3-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin), K8 (6,7-dihidroksi-4-(3,4-dimetoksifenil)-kumarin), K9 (7,8-dihidroksi-4-(3,4-

dihidroksifenil)-kumarin), K21 (6,7-dihidroksi-4-(3,4-dihidroksifenil) -kumarin), K23 (7,8-dihidroksi-3-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin) olarak belirlenmiş ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. IC_{50} değerleri 15 μ M düşük dört kumarin K8, K9, K21 ve K23 belirlenmiş ve bu türevlerin *Theileria annulata* enolazını yarışmasız inhibisyon mekanizması ile inhibe ettiği tespit edilmiştir (YAKARSONMEZ, 2017, Doktora tezi).

1.1.6 Enzim Kinetiği

Enzimlerle katalize edilen kimyasal reaksiyonların özelliklerinin incelenmesi olarak bilinen enzim kinetiği çalışmalarında reaksiyon hızı, reaksiyonun koşullarının değişmesinin etkileri gibi parametreler belirlenebilmektedir. Bu özellikler enzimin katalitik mekanizmasını, metabolizmasındaki rolünü, aktivitesinin nasıl kontrol edildiğini ve bir ilacın veya bir agonistin enzimi nasıl inhibe ettiğini anlamada yardımcı olmaktadır. Substratların ve ürünlerin kataliz sırasında enzimin aktif bölgesine nasıl bağlandıklarını, reaksiyon sırasında meydana gelen değişiklikleri ve hatta mekanizmada belirli aminoasit residülerin rolü gibi kinetik verileri yorumlada enzimin yapısının bilinmesi gerekmektedir [63].

Enzimlerin biyokimyasal özellikleri belirlenirken genellikle reaksiyon hızını ölçmek için substrat veya ürünlerin konsantrasyonundaki değişiklikleri takip edilir. Bu yöntemlerden spektrofotometrik analizlerde, ürünler ve reaktifler arasındaki ışığın absorbansındaki değişim temel alınmaktadır. Spektrofotometrik analizler, reaksiyon oranının sürekli olarak ölçülmesine izin verdiğinden, en uygun olanlardır [64].

1.1.6.1 Michaelis-Menten Kinetiği

Biyokimyada Michaelis-Menten kinetiği, enzim kinetiğinin en iyi bilinen modellerinden biridir. Reaksiyon hızının (ürün oluşumu oranı) substrat konsantrasyonuna karşı değişimini model alan ve enzimatik reaksiyonların hızını tarif eden bir denklem olarak ifade edilir (1.7). Michaelis-Menten denklemindeki V_{max} , doymuş substrat konsantrasyonunda maksimum hızı temsil eder. Michaelis-Menten sabiti K_m , reaksiyon hızının V_{max} 'in yarısı olduğu substrat konsantrasyonudur. K_m substratın enzime afinitesinin bir ölçüsüdür. Küçük K_m yüksek afinite anlamına gelir ve daha düşük substrat konsantrasyonlarında V_{max} 'a yaklaşıcağı anlamına gelir. Bu sabit, enzimin

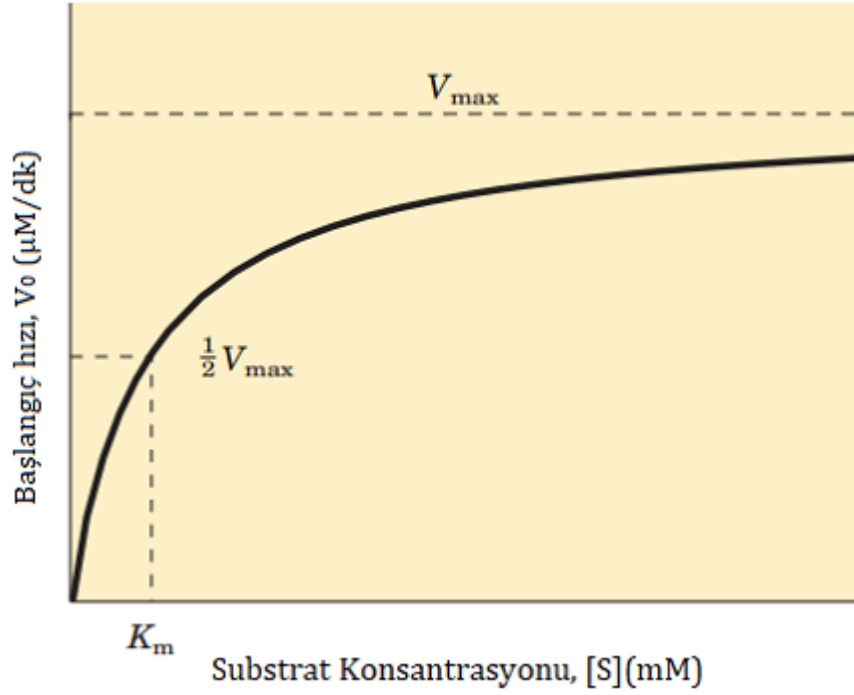
konsantrasyonundan veya saflığından etkilenmez. K_m değeri hem enzim hem de substratın yanı sıra sıcaklık ve pH gibi koşullara bağlıdır. Tek bir substratı içeren biyokimyasal reaksiyonların genellikle Michaelis-Menten kinetiklerini takip ettiği varsayılmaktadır [65].

$$v_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1.7) [66]$$

Enzim katalizli reaksiyonlar doyurulabilir olduğundan kataliz oranı, artan substrata doğrusal bir tepki göstermez. Eğer reaksiyonun başlangıç hızı bir dizi substrat konsantrasyonu üzerinden ölçülürse ($[S]$ olarak gösterilir), ilk reaksiyon hızı $[S]$ arttıkça artar. Bununla birlikte, $[S]$ yükseldikçe, enzim substratla doyurulur ve başlangıç hızı (V_0), enzimin maksimum hızı olan V_{max} 'a ulaşır.

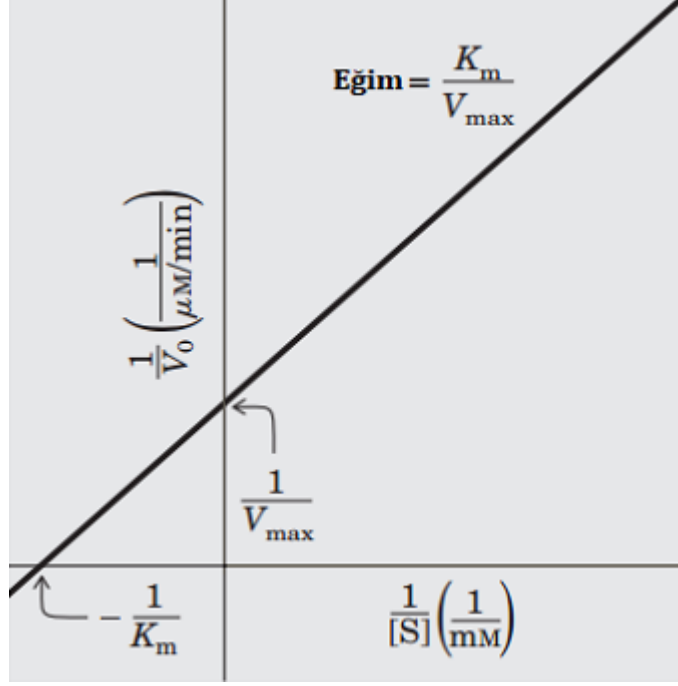


Enzim-substrat kompleksi ES'yi oluşturmak için enzim ve substrat arasında bir başlangıç reaksiyonu vardır (1.8) . Enzimatik reaksiyon oranı, substrat konsantrasyonunun V_{max} seviyesine yükselmesiyle artar. Substrat konsantrasyonunda artış, substrat (S) ile reaksiyona girecek daha fazla enzim (E) bulunmadığından reaksiyon hızında herhangi bir artışa neden olmaz. Burada, reaksiyon oranı ES kompleksine bağımlı hale gelir ve tek moleküllü reaksiyon haline gelir (Şekil 1. 8) [67].



Şekil 1. 8 Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi [54]

Lineweaver–Burk grafiği, doğrusal olmayan regresyon yazılımların yaygın olarak kullanılmasından önce, K_m ve V_{max} gibi enzim kinetiklerindeki önemli terimleri belirlemek için yaygın olarak kullanılmıştır. Bu grafikte doğrunun y-eksenini kestiği nokta V_{max} 'ın tersine eşdeğerdir ve grafiğin x ekssnini kestiği nokta ise $-1/K_m$ 'yi temsil eder. Doğrunu eğimi ise K_m/V_{max} vermektedir. Aynı zamanda farklı enzim inhibisyon biçimlerinin hızlı, görsel bir izleniminide vermektedir [68].

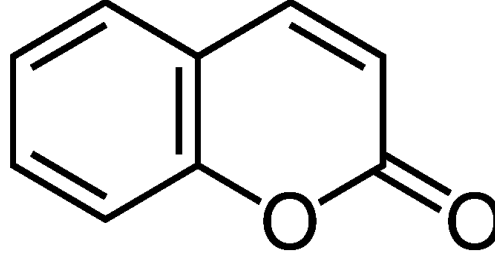


Şekil 1. 9 Lineweaver-Burk grafiği [54]

1.1.7 Kumarin Türevleri

Kumarinler, 'Coumarou', tonka fasulyesinin (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae) yerel adından almıştır ve ilk olarak 1820'de izole edilmiştir. Dört ana kumarin alt türü vardır: basit kumarinler, furanokumarin, piranokumarin ve piron kumarinleri içerir. Basit kumarinler (ör. Kumarin, 7-hidroksikumarin ve 6,7-dihidroksikumarinin), ana bileşiği olan kumarin ve bunların glikozitleri ile birlikte hidroksillenmiş, alkoksillenmiş ve alkillenmiş türevleridir (Şekil 1. 10). Furanokumarin, kumarin iskeletine bağlı beş üyeli bir furan halkasından oluşur, geriye kalan benzoid konumlarından birinde veya her ikisinde sübstitüsyon ile lineer veya açısallara bölünür. Piranokumarin üyeleri Furanokumarin'e benzer, ancak altı üyeli bir halka içerir. Piron halkasında sübstitüe edilen kumarinler 4-hidroksikosarin içerir. Sentetik varfarin, bu kumarin alt tipine aittir. Yapısal sadeliğiyle kumarin, benzo-alfa-pironun ana bileşiği olmasına rağmen, genel olarak 7-hidroksikumarininin, daha kompleks kumarinlerin ana bileşiği olarak kabul edilmektedir. Genistein bir izoflavon olup benzo-gamapironlara aittir. Bu, soyanın doğal bir bileşenidir ve hayvan modellerinde esas olarak hormonal olarak düzenlenmiş meme ve prostat kanserine karşı, kimyasal olarak önleyici bir ajan olarak yoğun bir şekilde çalışılmıştır [69]. Kumarinler antimikrobiyal, antiviral, antienflamatuvar,

antidiyabetik, antioksidan ve enzim inhibitör aktivitesi gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir [70].



Şekil 1. 10 Kumarin ana iskeleti

Kumarin türevlerinin, fotokemoterapi, antitümör ve anti-HIV tedavisi ve merkezi sinir sistemi (CNS) uyarıcıları, antibakteriyeller, anti-inflamatuar, anti-koagülanlar ve boyalar dahil olmak üzere birçok terapötik uygulamaya sahip olduğu bilinmektedir (Çizelge 1. 1). Ek olarak, kumarinlerin orta derecede trigliserit düşürücü aktiviteye sahip maddeler olduğu bilinmektedir. Ayrıca, hidroksikumarinler güçlü zincir kırıcı antioksidanlardır ve reaktif oksijen türlerini temizleyerek serbest radikal hasarını önleyebilirler. Daha önce fiksatif ve tatlandırıcı maddeler olarak kullanılan bazı kumarin türevleri, şu anda ABD'de Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından gıda katkısı olarak düzenlenmektedir. Bunlar belirli miktarlarda kullanıldığında hafif bulantı, ishal ve hepatotoksisite gibi bazı olumsuz etkileri mevcuttur. Hâlihazırda birçok Avrupa ülkesinde pazarlanmakla birlikte, lenfödem tedavisi için kullanılan kumarin tipi ilaçlar hepatotoksisiteleri nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri'nde tedavi amaçlı olarak onaylanmamıştır. Bununla birlikte, yakın zamanda östrojenik aktiviteye sahip olan kumarinlerin son keşfi, osteoporoz gibi menopoza ile ilgili hastalıkların ortaya çıkmasını önlemekte, kardiyovasküler olay / hastalık ve kognitif eksiklikler için artmış risk riskini azaltmada terapötik maddeler olarak bu tür türevlerin kullanılmasına yol açmıştır [71], [72].

Çizelge 1. 1 Kumain türevleri ve terapötik rolleri [72]

Kumarin Türevi	Terapötik rolü
Varfarin 4-hidroksikumarin	Malignant melanoma
Piranokumarinler	Renal hücre karsinoma
Piranokumarinler	Prostat kanseri
Kumarin 7-hidroksikumarin	Lökemia
Benzopironlar	Göğüs kanseri
Psoralenler	Servikal karsinoma
Psoralenler	Deri hastalıkları
Varfarin	Anti-koagulan

1.2 Tezin Amacı

2017 yılında yapılan tez çalışmasında (YAKARSONMEZ, 2017, Doktora tezi) tropikal theileriosis'e sebep olan *Theileria annulata* enolazına karşı yapıya dayalı ilaç çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *Theileria annulata* temel enerji metabolizmasındaki glikoliz yolağında önemli bir enzim olan enolaz hedef alınmış ve bu enzimi inhibe eden kumarin türevleri taranmıştır. 38 adet kumarin türevi arasından enolazın aktivitesi üzerine IC₅₀ değeri 15 µM altında olan K8 (6,7-dihidroksi-4-(3,4-dimetoksifenil)-kumarin), K9 (7,8-dihidroksi-4-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin), K21 (6,7-dihidroksi-4-(3,4-dihidroksifenil) -kumarin) ve K23 (7,8-dihidroksi-3-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin) olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında belirlenen aday ligandların parazit hedef molekülünü inhibe etmesi ama konak organizmadaki eşdeğer molekülü inhibe etmemesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasının amacı parazit yaşamının bağımlı olduğu ve konak *Bos taurus*'da da mevcut olan enolazın; klonlanması, ifade edilmesi, saflaştırılması ve saflaştırılan yabanıl tip enzimin yapısal, moleküler ve kinetik analizleri yapılarak, parazit enolazını inhibe eden kumarin türevlerinin konak enolazı üzerine olan etkilerinin *in silico* ve *in vitro* analizler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

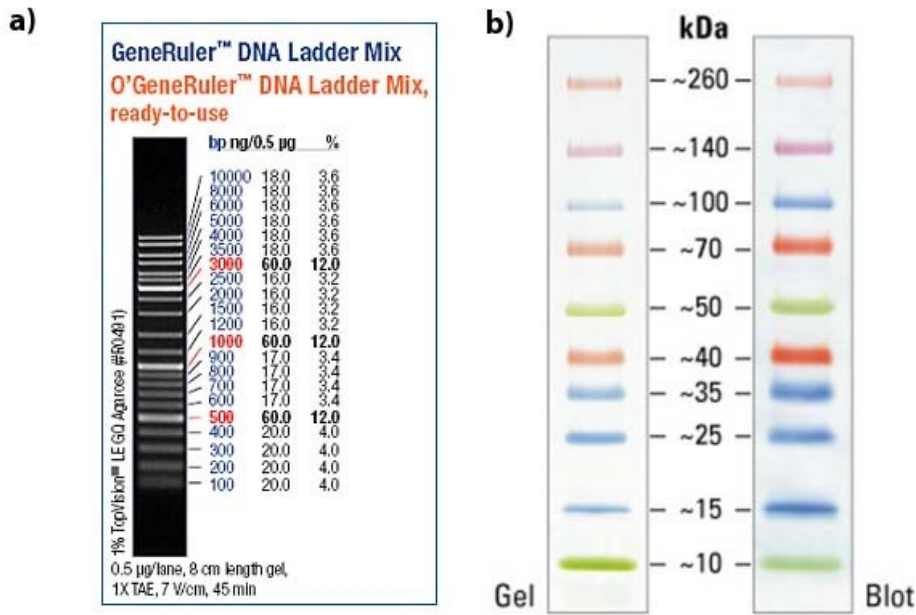
Yapıya dayalı ilaç tasarımının kritik basamağı parazit enzimini engeller iken konaktaki eşdeğerinin engellenmemesi veya minimum etkilenmesidir. Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda 38 adet kumarin türevi arasından inhibitör adayları belirlenmiştir ve aday kumarin bileşiklerinin ADMET ve farmakolojik özelliklerinin belirlenmesi, *in vivo* şartlarda ligandların inhibisyon etkinliğinin tanımlanması çalışmalarına olanak sağlayacağı öngörülmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) plazmid DNA izolasyonunda, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) PCR ürünü saflaştırılmasında kullanılmıştır. Klonlama aşamalarında dNTP (deoksi nükleotid trifosfat) (Promega), *Pfu* DNA Polimeraz (Thermo Scientific) ve *Taq* DNA polimeraz (Thermo Scientific) kullanılmıştır. DNA marker olarak GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) (Şekil 2. 1a) ve protein ladder olarak Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific) kullanılmıştır (Şekil 2. 1b). Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH, Sigma, Bio-Rad, Roche ve Merck'ten sağlanmıştır.



Şekil 2. 1 a) O'GeneRuler DNA Ladder Mix b) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder

2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

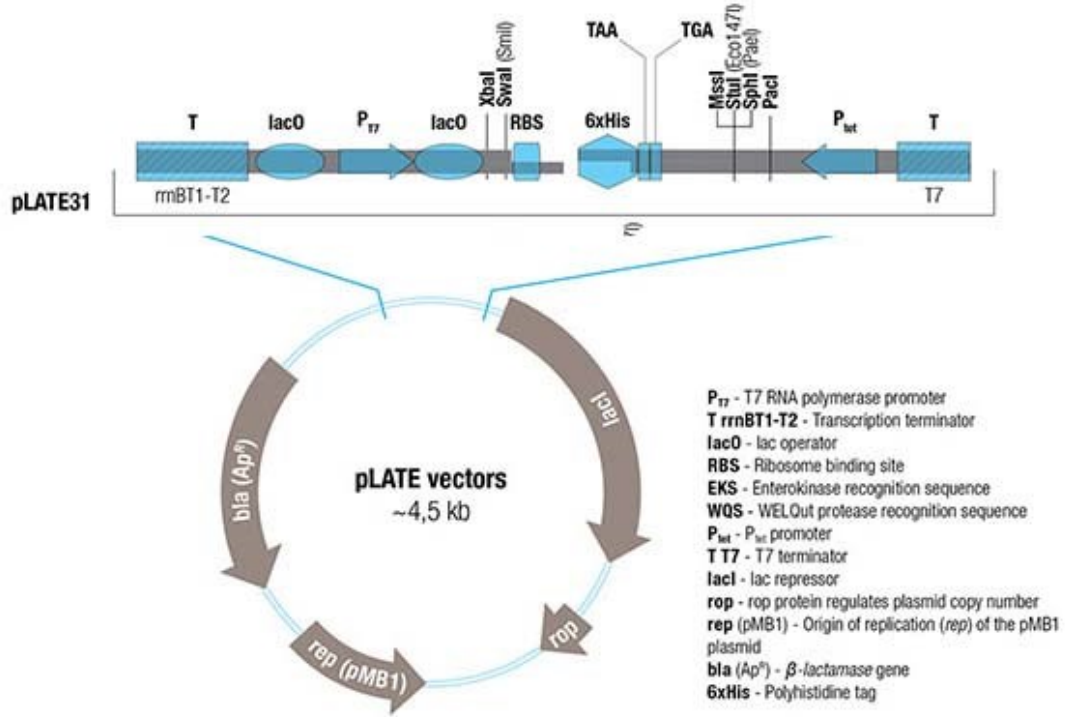
Cihaz	Marka
Jel Görüntüleme sistemi	Biorad
Saf Su Cihazı	GFL
Termal Döndürücü	Eppendorf
Mikropipet seti	Eppendorf
Şarjlı Pipet Ünitesi	Hirschmann
Hassas Terazi	Ohaus
Dikey Elektrophorez Sistemi	Biorad
Sonikatör	Bandelin
pH Metre	Eutech
Su Banyosu	Kerman
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Yatay Elektrophorez Sistemi	Biorad ve Peqlab
PCR Çalışma Kabini	Esco
Jel Kurutma Ünitesi	Biorad
Mikrosantrifüj	Sigma
UV Visible Spectrophotometre	Shimadzu ve Thermo scientific

Otoklav	Systec
Çalkalamalı İnkübatör	GFL
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Etüv	Binder
Vorteks	Heidolph

2.1.3 Plasmid DNA ve Vektörler

Bos taurus kas enolaz genini içeren (Klon id: OBa41987) pcDNA3.1 ekspresyon vektörü (Şekil 2. 2) GenScript®(USA) firmasından temin edilmiştir. Standart memeli ekspresyon klonlama vektörü olan bu vektör transkripsiyon başlatıcı CMV (human cytomegalovirus) promoter bölgesi içerir. Ayrıca protein saflaştırma ve tespiti için N yada C-terminal DYKDDDDK kuyruğu taşır. DYK kuyruğu füzyon proteinlerini saflaştırmak için eklenen bir hidrofilik oktapeptid epitoptan oluşur. Hidrofilik yapısı nedeniyle bir füzyon proteininin yüzeyinde bulunması muhtemeldir ve bu nedenle antikorlar için ulaşılabilir olması daha muhtemeldir. DYK kuyruğu, farklı tanıma ve bağlanma özelliklerine sahip M1, M2 ve M5 gibi çeşitli spesifik anti-FLAG monoklonal antikorlara bağlanır. FLAG füzyon proteinleri, kalsiyum bağımlı (örneğin M2) veya kalsiyumdan bağımsız bir şekilde monoklonal antikor tarafından tanımlanabilir. Kozak konsensüs sekansı ökaryotik mRNA'ya özgü ve konsensüs (gcc) GCCGCCACCAUGG sahip olan bir sekanstır. Kozak konsensüs dizisi translasyon sürecinin başlatılmasında önemli bir rol oynar [73].

(DE3) gibi *E. coli* suşları kullanılmalıdır, burada T7 RNA polimeraz geninin ekspresyonu indüklenebilir bir promotörün kontrolü altındadır. IPTG indüksiyonundan sonra, T7 RNA polimerazı hücre içinde eksprese edilir ve T7 promoteri altındaki genlerin transkripsiyonunu başlatılır [74], [75], [76].



Şekil 2. 3 pLATE31 ifade vektörü

2.1.4 Mikroorganizmaların Gelişimi İçin Gerekli Besiyerleri

LB (Luria-Bertani) Buyyon

Maya Ekstraktı	0,5 g/100 ml
Trypton	1 g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözündükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

LB (Luria-Bertani) Agar

Maya Ekstraktı	0,5 g/100 ml
Trypton	1 g g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml
Agar	1,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözündükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

Mavi-Beyaz seçim için LB agar (Amp/X-gal/IPTG)

Amfisilin (100 mg/ml)	100 µl
X-gal (20 mg/ml)	160 µl
IPTG (20 mg/ml)	160 µl

Belirtilen miktarlar 100 ml LB agar içine eklenir.

Çift Kuvvetli Yeast-Trypton (2xYT) Agar

Maya Ekstraktı	1 g/100 ml
Trypton	1,6 g g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml
Agar	1,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözündükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

Çift Kuvvetli Yeast-Tripton (2xYT) Buyyon

Maya Ekstraktı	1 g/100 ml
Tripton	1,6 g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözüldükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

SOC Buyyon (10 ml için)

Maya Ekstraktı	50 mg
Tripton	0,2 g
1 M NaCl stok solüsyonundan	0,1 ml
1 M KCl stok solüsyonundan	25 µl
2 M Mg ⁺² stok solüsyonundan (Filtre ile sterilize edilir)	0,1 ml
2 M Glikoz stok solüsyonundan (Filtre ile sterilize edilir)	0,1 ml

Tripton, maya ekstraktı, 1 M NaCl ve 1 M KCl solüsyonlarından gerekli miktarlar eklenerek distile su ile 9 ml'ye tamamlanır. Karışımın pH'sı 7,0 olarak ayarlanır. Otoklavda sterilize edilir. Oda sıcaklığına getirilir. 2 M Mg⁺² ve 2 M Glikoz solüsyonları son konsantrasyonları 20 mM olacak şekilde karışıma ilave edilir. Son hacim steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

2.1.5 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Agaroz Jel İçin Örnek Uygulama Tamponu (EtBr-SAB, Sample Application Buffer)

Sükroz	4 g/10 ml
2 M Tris HCl	0,5 ml/10 ml
0,5 M EDTA	2 ml/10 ml
Bromfenol mavisi	4 mg/10 ml

Kristal Viyole (CV) Stok Solüsyonu

dH₂O ile 5 mg/ml stok solüsyonu hazırlanır. Karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

Kristal Viyole Jel İçin Örnek Uygulama Tamponu (Cv-SAB)

Gliserol	500 µl/ml
1xTAE	500 µl/ml
Kristal viyole (stok 5 mg/ml)	10 µl/ml

Karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

50x TAE Tampon Çözeltisi (Tris-Asetat-EDTA)

Trizma Base	24,2 g/100 ml
Asetik Asit	5,71 ml/100 ml
0,5 M EDTA (pH:8.0)	10 ml/100 ml

CaCl₂ Solüsyonu

100 mM CaCl ₂ .6H ₂ O	2,19 g/100 ml
5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	102 mg/100 ml
5 mM Tris-HCl (pH:7.6)	1 ml/100 ml (0,5 M pH'sı 7,6 olan stok Tris-HCl çözeltisinden)

Solüsyon hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

Amfisilin

100 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

IPTG (Isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside)

20 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside)

20 mg/ml konsantrasyonu ayarlamak için 0,02 g X-Gal tartılır, N,N-dimetilformamid (DMF) ile 1 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

Mg⁺² Stok Solüsyonu (10 ml)

MgCl ₂ .6H ₂ O	2,03 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,465 g

Distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

SDS-PAGE için Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB)

%10 SDS	1 g/10 ml
0,5 M Tris HCl (pH: 6.8)	0,6 g/10 ml
% 5 Gliserol	0,5 ml/10 ml
% 25 β-Merkaptoethanol	0,25 ml/10 ml
% 0,05 Bromfenol mavisi	0,005 g/10 ml

5x SDS-PAGE Tank Tamponu

0,025 M Trizma Base	1,5 g/100 ml
0,192 M Glisin	7,2 g/100 ml
% 0,1 SDS	0,5 g/100 ml

Jel yürütme aşamasında dH₂O ile 1x'e seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanabilir.

% 30 Akrilamid/Bis-akrilamid Solüsyonu

Akrilamid	29 gr/100 ml
N, N'-Metilen-Bis-Akrilamid	1 gr/100 ml

Protein Boyama Solüsyonu

Coomassie Brilliant Mavisi	280 mg /100ml
Metanol	45,2 ml/100 ml
Glasiyal Asetik Asit	9,2 ml /100 ml

Belirtilen bileşenler eklendikten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

Boya Uzaklaştırıcı Solüsyon

Metanol	75 ml / litre dH ₂ O
Asetik Asit	50 ml / litre dH ₂ O

Tris-KCl (pH: 7.5) Tampon Çözeltisi

50 mM Trisma Base

50 mM KCl

Bu bu bileşikler eklendikten sonra HCl ile pH ayarlanır.

HisTALON saflaştırma koloni için hazırlanan çözeltiler

Lizis tamponu (1 lt)

50 mM NaH_2PO_4 6,90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

10 mM imidazole 0,68 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Dengeleyici Tampon (1 lt)

50 mM NaH_2PO_4 6,90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

10 mM imidazole 0,68 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Yıkama tamponu (1 lt)

50 mM NaH_2PO_4 6,90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

20 mM imidazole 1,36 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Elüsyon Tamponu (1 lt)

50 mM NaH_2PO_4 6,90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

150 mM imidazole 10,2 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

2.1.6 Primerler

Bos taurus kas enolazını (*BtEno3*) ifade eden gen pcDNA3.1 vektörü içinde N-terminal DYK işaretli olarak bulunmaktadır. Bu tezde klonlama için 6-His afinitesi ile saflaştırma yapılmıştır. Bu sebeple iki aşamalı olarak gen amplifiye edilerek genden DYK kuyruğunun çıkarılması gereklidir. İlk aşamada *BtEno3F_M* ve *BtEno3R_M* primerleri kullanılarak DYK kuyruğu çıkarılmıştır (Çizelge 2.1). İkinci aşamada ise tasarlanan *BtEno3F* ve *BtEno3R* primerleri pLATE31 vektörüne spesifik yapışkan uçlar oluşturmaktadır. Protein saflaştırması için olması gereken 6 His-tag kuyruğu pLATE31 vektöründe yer almaktadır. aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) klonlama protokolünde belirtilen primer tasarımında 5' ucu primeri pLATE31 vektörüne spesifik diziler içermekte ve ilgili gen ile çakışan yeterli bir 3' ucu içermektedir.

Çizelge 2.1 *Bos taurus* kas enolazını (*BtEno3*) ifade eden genin amplifikasyonunda kullanılan primerler

<i>BtEno3F_M</i> 5' GCCATGCAAAAAATCTTGCCCGG 3'	T_m: 62,4 °C
<i>BtEno3R_M</i> 5' CTTGGCCTTCGGGTACGGAAC 3'	T_m: 63,0 °C
<i>BtEno3F</i> 5' AGAAGGAGATATAACTATGGCCATGCAAAAAATCTTGCCCGGG 3'	T_m: 68,3 °C
<i>BtEno3R</i> 5' GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCTTGGCCTTCGGGTACGG 3'	T_m: 77,1 °C

2.2 YÖNTEM

Tüm yöntemler Sambrook, J. ve Russell, D.W. moleküler klonlama laboratuvar metotlarına uygun olarak tasarlanmıştır [77]. Aksi belirtilmediği takdirde başka bir metot uygulanmamıştır.

2.2.1 Plasmid DNA'dan *Bos taurus* kas enolazını (*BtENO3*) ifade eden genin Amplifikasyonu

İlk aşamada ticari olarak pcDNA3.1 ekspresyon vektörü içinde 1305 bp'lık *Bos taurus* kas enolaz geni (*BtENO3*) C-terminal DYK işaretli olarak satın alınmıştır. Yapılan ilk denemede doğru bölgenin amplifiye edildiği görülmüştür. Fakat aLICator LIC Klonlama

ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi ile klonlanıp ekspresyonu yapıldığında klonlamanın başarısız olduğu görülmüştür. Amplifiye edilen gen sekanslanıp analiz edildiğinde DYK kuyruğunun N-terminalde yer aldığı fark edilmiştir. Sipariş edilen firmadan kaynaklı bu yanlışlığı düzeltmek için N-terminalde yer alan DYK kuyruğunun çıkarılması amacıyla iki aşamalı olarak amplifiye edilmiştir [78]. Çizelge 2. 2 ve Çizelge 2. 3’de ki koşullar takip edilerek 1305 bp büyüklüğünde gen amplifiye edilmiştir. PCR koşulları şöyledir; 95°C’de 5 dakika ön denatürasyon, 94°C’de 1,5 dakika denatürasyon, 50 °C’de 2 dakika bağlanma, 72 °C’de 2 dakika uzama ile 30 döngü ve 72 °C’de 10 dakika son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. Primer tasarımında 5’ ucu primeri pLATE31 vektörüne spesifik diziler içermekte ve ilgili gen ile çakışan yeterli bir 3’ ucu içermektedir. Protein saflaştırması için olması gereken 6 His-tag kuyruğu pLATE31 vektöründe yer almaktadır. Amplifiye edilen *BtENO3* geni aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi ile klonlanmıştır. aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) protokolünde verilen, gen büyüklüğüne göre reaksiyona girmesi gereken insert DNA miktarı hesaplama tablosu esas alınarak 1305 bp’lik *BtENO3* saflaştırılmış ürünün konsantrasyonu 65 ng olarak ayarlanması gerekmektedir [74].

Çizelge 2. 2 Birinci aşama PCR; pcDNA3.1 ekspresyon vektöründen *Bos taurus* kas enolazını (*BtENO3*) kodlayan genin amplifikasyonu için PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> PCR tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
BtEno3F_M primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
BtEno3R_M primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH₂O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

Çizelge 2. 3 İkinci aşama PCR; *Bos taurus* kas enolazını (*BtENO3*) kodlayan genin pLATE31 vektörüne ligasyonu amacıyla yapılan amplifikasyon için PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X Long PCR tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
<i>BtEno3F</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>BtEno3R</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

2.2.2 Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifiye edilen PCR ürünlerinin analizi amacıyla % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 1xTAE tampon çözeltisi ile agaroz karıştırılıp tamamen çözününceye kadar kaynatılır, elektroforez tepsisine dökülür ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. Tepsie taraklar yerleştirildikten sonra jelleşme için 30 dk kadar beklenmektedir. Jel oluşuktan sonra taraklar çıkarılarak tepsi tankın içerisine yerleştirilir. İstenilen miktarda örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 40-60 mA'de cihaz çalıştırılır ve örneklerin jelde yürümesi beklenir. Son aşamada ise baz sayısına göre ayrılan örnekler Etidyum bromür'e alternatif olarak Novel juice (Genedirex) ile boyanarak UV ışık altında görüntülenir [77], [79].

2.2.3 *Bos taurus* Kas Enolazını Kodlayan Genin (*BtENO3*) İfade Vektörüne (pLATE31) Aktarılması

2.2.3.1 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant DNA Plazmidinin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu

aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) protokolünde verilen, gen büyüklüğüne göre reaksiyona girmesi gereken insert DNA miktarı hesaplama

tablosu esas alınarak 1305 bç'lik *BtENO3* saflaştırılmış ürünün konsantrasyonu 65 ng olarak ayarlanması gerekmektedir.

Vektör ile saflaştırılmış PCR ürününün ligasyonu için oda sıcaklığında reaksiyonu hazırlanmıştır (Çizelge 2.4). Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmektedir. Reaksiyonu durdurmak için 0,6 µl 0,5 M EDTA ile iyice karıştırılır. Vektör ile birleşme aşamasında ise lineer pLATE31 vektöründen 1 µl (60 ng) ve T4 DNA polimeraz ile muamele edilmiş PCR ürünü hafifçe vortekslenir ve 3-5 saniye santrifüj edilir. Birleştirme karışımı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Birleştirilen karışım transformasyona uygun hale gelmiştir.

Çizelge 2.4 pLATE31 ekspresyon vektörü ve *BtENO3* geni ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	Hacim
5X LIC tamponu	2 µl
Saf PCR ürünü	1 µl (65 ng)
Steril distile su	6 µl
T4 DNA polimeraz	1 µl (1 U/ µl stoktan)
Toplam	10 µl

2.2.3.2 Kalsiyum Klorür Muamelesi ile Kompetant *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetan hücre hazırlamak için -80 °C'deki *E. coli* BL21(DE3) soyu hücre stoğundan sürme ekim yöntemi ile LB agara ekimi yapılır ve gece boyu 37 °C' de inkübe edilir. Gelişen kolonilerden tek koloni seçimi yapılarak 5 ml LB buyyona aktarılır ve bir gece 37 °C 120 rpm de inkübe edilir. Gelişen kültürden 500 µl alınarak 50 ml buyyona aktarılır ve 37 °C, 120 rpm'de OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,3–0,4 arasında bir değere ulaşıncaya kadar inkübe edilir. İstenilen hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra 25 ml'lik iki tüpe bölünür ve +4 °C ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücrelerin toplanması sağlanır. Supernatant kısmı atıldıktan sonra, pellet 25 ml CaCl₂ ile yavaşça çözülür ve sonrasında 30 dk buzda bekletilir. 5000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilir ve supernatant dökülür ve her bir tüpteki pelet 1ml CaCl₂ solüsyonunda yavaşça

çözülür. Tüpler 2 saat buzda bekletildikten sonra hücrelerimiz kompetan hale gelmiş olur [74].

2.2.3.3 Rekombinant DNA Plazmidinin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu

Vektör ile amplifiye edilen DNA'nın ligasyonu yapıldıktan sonra örneğin üzerine 200 µl kompetant *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden aktarılır ve hafifçe karıştırılır ve sonrasında 30 dk buzda bekletilir. Bu bekleme aşamasından sonra 42 °C'deki su banyosunda 90 saniye boyunca ısı şokuna maruz bırakılır. Isı şokundan sonra hücreleri sarsmada 2 dk buzda bekletilir ve peşi sıra 100 µl/ml amfisilin içeren SOC buyyondan 800 µl ilave edilir. Tüpler hafifçe sarsmadan karıştırılır ve 37 °C de 45 dakika etüvde bekletilir. İnkübasyon sonrası 100 µl/ml amfisilin içeren LB-agara 100 µl, 200 µl , 200 µl ve 500 µl örnek olacak şekilde ekim yapılır ve 37 °C'deki etüvde bir gece inkübe edilir.

2.2.3.4 Gen Klonlamasının koloni PCR ve dizileme ile kontrolü

BtENO3 geni pLATE31 ekspresyon vektörü ile ligasyonu yapıp *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon sonrası LB agar besi yerine ekilen hücrelerimizden pozitif koloni seçilmiştir. Seçilen bu koloniler 5 ml (amp'li) LB buyyona ekilmiştir. *BtENO3* geni koloni PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir (Çizelge 2.5). Bu yöntemde; besi yerinden 100 µl alınarak 7 dk 12000 rpm de santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Pellet 100 µl ile çözüldükten sonra 10 dk kaynatılmıştır. Sonrasında 15 dk 12000 rpm de santrifüjlenerek süpernatant kısmı alınarak kalıp olarak kullanılmıştır. 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 50 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ile 30 döngü ve 72 °C'de 10 dakika son uzama PCR koşullarında amplifiye edilmiştir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen gen ürününün tamamı agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gen klonlamasının ön kontrolü yapılmıştır ve PCR sonucu pozitif olarak görülen örnekler dizilenmiş ve dizinin doğruluğu kontrol edilmiştir.

Çizelge 2.5 Koloni PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X <i>Taq</i> tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
<i>BtEno3F</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>BtEno3R</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	10 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	24 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

2.2.4 *Bos taurus* Kas Enolazını Kodlayan Genin (*BtENO3*) Dizi Analizi

Bos taurus enolazı (NCBI accession number: NP_001029874.1) ile *Theileria annulata* (NCBI accession number: ADU85973.1) parazitindeki eşdeğer enolazı karşılaştırmalı analiz yapılmıştır. Ayrıca bazı filogenetik olarak yakın olan türler olan *Bos indicus* (NCBI accession number: XP_019836779.1), *Homo sapiens* (NCBI accession number: P13929), *Bubalus bubalis* (NCBI accession number: XP_006060127.1), *Capra hircus* (NCBI accession number: XP_005693512.1) ve *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI accession number: P00924) enolazları Clustal-Omega web tool [80] kullanılarak karşılaştırılmıştır. Filogenetik olarak yakın türler NCBI-BLAST web aracı [81] kullanılmıştır ve korunan bölgeler, insersiyonlar, delesyonlar ve katalitik halkalar karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

2.2.5 *Bos taurus* Kas Enolazını Kodlayan Genin İfadesi, Enzimin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu

2.2.5.1 *Bos taurus* Kas Enolazını Kodlayan Genin İfadesi

BtENO3 geni ekspresyon vektörü olan pLATE31 vektörüne aktarılıp *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edildikten sonra genin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. *BtENO3* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücreleri 100 µg/ml amfisilin içeren 5ml LB buyyona

ekilmiştir. 37 °C'de ve 180 rpm'de gece boyu inkübe edilmiştir. Aynı kültür *BtENO3* genini içermeyen *E. coli* BL21(DE3) hücreleri içinde yapılmıştır. 5 ml'lik besiyerinden 500 µl alınıp 50 ml lik amfisilinli LB besiyerine aktarılmıştır. 37 °C'de inkübe edilmeye devam edilip, OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Hücre yoğunluğu istenilen miktara ulaştıktan sonra, 50 ml'lik kültür son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ile hücreler indüklenir. Aynı işlemler *BtENO3* genini içermeyen *E. coli* BL21(DE3) hücreleri içinde yapılmıştır. 5 saat boyunca inkübe edilen bu örnekler 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant kısımları atılarak pellet -20 °C saklanabilir. Pellet üzerine 500 µl Tris-HCl (pH 7,4) eklenir ve pellet çözünür. Hücre tamamen homojen hale geldikten sonra sonikasyon ile hücrelerimiz parçalanır. % 20 güç, 10 sn sonikasyon ve 20 sn bekleme olmak üzere sonikatör ayarlandıktan sonra 6 döngü halinde hücreler parçalanır. Tüm basamaklar buzun içinde yapılması gerekmektedir. Sonikasyondan sonra hücreler 14.000 rpm'de 20 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant kısımları alınarak temiz bir tüpe aktarılır. Pelletler ise distile su ile çözülerek SDS-PAGE de koşturulmak için hazırlanır. BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılmıştır.

2.2.5.2 *Bos taurus* Kas Enolazının Saflaştırılması

Saflaştırma basamağında 50 ml'lik kültürlerden elde edilen pelletler 3 ml lizis tamponunda çözülmüştür. Çözülen pellet, sonikatör ile %40 güçte 10 sn uygulama 10 sn bekleme yapılarak 6 döngüde 2 dakika sürede parçalanmıştır. Elde edilen karışım, 14000 rpm'de 30 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Ticari olarak elde edilen TALON® kolonu (Clontech Laboratories, Inc., USA 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 yüklenerek 1 ml elüsyon fraksiyonları toplanmıştır. Toplanan elüsyonlar için aktivite bakılarak enzim aktivitesi bulunan ikinci ve üçüncü elüsyonlar birleştirilmiştir. İkinci saflaştırma sırasındaki enzim kaybını önlemek için birinci saflaştırma sonrası toplanan ikinci ve üçüncü elüsyonlardaki fazla imidazolü

uzaklaştırmak için 10K protein concentrator kullanılmıştır. Elüsyon içindeki 150 mM imidazol miktarı 20 mM'a düşürülmüş ve ikinci saflaştırmaya geçilmiştir.

İlk saflaştırma sonrası elüsyonlar 30K protein konsantratör (Thermo scientific Pierce™ Protein Concentrator PES, 10K MWCO, 2-6 mL, kat no: 88521) ile 4 °C, 5000 rpm'de 12 dk santrifüj edilmiştir. Ortamdan fazla imidazolu uzaklaştırmak amacıyla santrifüj sonrası dengeleyici tampon eklenerek işlem tekrarlanmıştır. Son olarak dengeleyici tampon tekrar eklenerek ikinci saflaştırmaya geçilmiştir. İkinci saflaştırma aynı koşullarda tekrarlanarak elüsyonlar toplanmıştır.

2.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Toplanan örnekler ve saflaştırdığımız enzim SDS-PAGE de analiz edilmiştir. BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılmıştır. Jel aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Ayırma jeli (% 12)

dH ₂ O	3,35ml
1,5 M Tris HCl (pH:8.8)	2,5ml
% 10 SDS	100µl
% 30 Akrilamid/ Bis	4ml
% 10 Amonyum persülfat	75µl
TEMED	15 µl

Yükleme jeli (% 4)

dH ₂ O	6,1ml
0.5 M Tris HCl (pH:6.8)	2,5ml
%10 SDS	100µl
%30 Akrilamid/ Bis	1,3ml
% 10 Amonyum persülfat	60µl
TEMED	12 µl

Örnekler jele yüklenmeden önce yükleme çözeltisi ile karıştırılarak 5 dk kaynatılır ve kuyucuklara yüklenir. Yürütme tamponu elektroforez tankına eklenerek 80 mA de yürütölmeye başlanır. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra boyama çözeltisi ile jel gece boyu boyandıktan boya çıkarıcı çözeltiye alınır ve bantlar belirginleşinceye kadar bekletilir.

2.2.5.4 Protein Konsantrasyon Tayini

Saflaştırılan örnekler 50 kat seyreltilerek A_{280} deki absorbans değeri okunmuştur. Okunan bu değeri ile Beer-Lambert formölüne göre protein konsantrasyonu bulunmuştur (2.1). Bu formöldeki molar absorpsiyon katsayısı (ϵ ; Extinction Coefficient) ve moleküler ağırlığı web tabanlı programlar (Peptide Property Calculator) yardımıyla bulunabilir. Formöldeki L ise ışık yolu uzunluğudur ve standart spektrofotometreler 1 cm genişliğinde örnek küvetlerinin kullanımı için uygun olduğundan L değeri genellikle 1 cm'dir. Bulunan değeri seyreltme katsayısı ile çarpılarak mg/ml olarak bulunmaktadıdır.

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{280} \times MW}{\epsilon} \times L \quad (2.1)$$

2.2.5.5 Spektrofotometrik Yöntemle Enzim Aktivitesi Tayini ve Karakterizasyonu

Protein ekspresyonu IPTG indüklemesi ile gerçekleştirildikten sonra hücre sonike edilmiştir ve hücre lizatından enzim aktivitesi ölçölmüştür. Enzim aktivitesi 240 nm dalga boyunda oluşarı ürün miktarındaki değışim baz alınarak ölçölmüştür. Enolaz Mg^{+2} kofaktörü ile substratı olan 2-fosfoglisaratı (2PG) iki yönlü olarak fosfoenolpiruvata (PEP) dönüştürmektedir. 2PG (son konsantrasyon 1,5 mM), Tris-HCl (pH 7,4 son konsantrasyon 50 mM), $MgCl_2$ (son konsantrasyon 1,5 mM) olacak şekilde son hacim 1 ml hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi oda sıcaklığında kuvarz küvet kullanılarak 2dk boyunca ürün miktarındaki değışimi baz alınarak spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır.

Enzim stabilitesini analiz etmek için gün içinde 1 saat aralıklar ile enzim aktivitesi ölçülmüş ve takibinde bir hafta içindeki stabiliteyi analiz etmek için bir hafta boyunca ölçüm alınmıştır.

Enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreleri belirlenmiştir. pH'ın enzim aktivitesine etkisi 25 °C'de pH 5.5-8.5 aralığında analiz edilmiştir. Optimum pH tespit edildikten sonra sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi 20-60 °C arası sıcaklıklarda analiz edilmiştir.

Bos taurus kas enolazının (*BtENO3*) farklı substrat konsantrasyonlarında (0.05 mM, 0.075 mM, 0.125 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2mM ve 3 mM) 2 dk boyunca ürün miktarı değişimi baz alınarak 240 nm 2 dk boyunca absorbans farkı hesaplanmıştır. Tüm absorbans farkı değerleri, ϵ_{PEP} ($1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [82] katsayısı baz alınarak aktivite ($\mu\text{mol/dk}$) değerine dönüştürülmüştür. Hız $V = (\Delta A / 2 \text{ dk}) / (1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} (\text{molar ekstinsiyon katsayısı}) \times 0,56 \text{ cm (küvet ışık yolu)}) \times 0,2 \text{ ml (reaksiyon hacmi)}$ ile herbir substrat konsantrasyonu için hesaplanmıştır. Substrat konsantrasyonuna karşı hız alınarak Michealis-Menten grafiği çizilmiştir

2.2.6 İnhibitör etkinliğinin *Bos taurus* kas enolaz enzimi kullanılarak taranması ve enzim kinetiği çalışmaları

Kumarin türevlerinin *Theileria annulata* enolazı üzerine inhibisyon potansiyellerinin araştırılması kapsamında yapılan çalışmada (Yakarsonmez, 2017, Doktora tezi) K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevleri en yüksek oranda enolazı inhibe ettiği bildirilmiştir. Seçilen bu kumarinlerin parazitin konak organizması olan *Bos taurus*'ta eş değeri olan enolaz üzerine inhibitör etkinliğinin analizi ve IC_{50} değerlerinin bulunması için aktivite tayini prosedürü takip edilmiştir. İnhibitör varlığında 240 nm dalga boyunda *BtENO3* enziminin substratı olan 2-PG'yı PEP ürününe dönüştürme hızı izlenmiştir.

Reaksiyonlarda; 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris/HCl (pH 6,5) tampon, 2 μl inhibitör (son konsantrasyon 100 μM , 80 μM , 60 μM , 40 μM , 20 μM , 10 μM), 3 μl enzim ve son hacim 200 μl olacak şekilde reaksiyon karışımı 25 °C'de 600 devirde 10 dakika inkübe edilmiştir. Kumarin türevleri ile yapılan inhibisyon çalışmalarında, kumarin türevleri DMSO içerisinde çözülmüştür. 10 dk inkübasyon sonrası 2PG (son konsantrasyon 1,5

mM) eklenmiştir ve 240 nm’de absorbans değişim baz alınarak % inhibisyon değerleri 2.2 kullanılarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri spesifik bir substrat konsantrasyonunda bir enzimatik reaksiyonun %50 oranında inhibisyon oluşturmak için gereken inhibitör konsantrasyonunu ifade etmektedir. Belirlenen kumarin türevlerinin saflaştırılan enzim üzerinde çalışılarak tespit edilen IC₅₀ değerleri; en az beş farklı inhibitör konsantrasyonunun log10 değerlerine karşı yüzde inhibisyon değerlerinin lineer olmayan regresyon analizleri ile değişken eğim (variable slope) baz alınarak GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%Inhibisyon = \frac{(\Delta A240_{kontrol} - \Delta A240_{reaksiyon})}{\Delta A240_{kontrol}} \times 100 \quad (2.2)$$

2.2.7 *Bos taurus* Kas Enolazını Homoloji Modellemesi ve Optimizasyonu

Saflaştırılan ve enzim aktivitesi tayini yapılan *BtENO3* enziminin 3-boyutlu yapısı, karşılaştırmalı modelleme prensibine dayanan homoloji modelleme yöntemi ile oluşturulmuştur. MODELLER programı 3-boyutlu yapısı bilinen ve bilinmeyen proteinler ile karşılaştırma yaparak tahmini olarak bir model oluşturur [83]. Kalıp yapının belirlenmesi 3-boyutlu yapısı bilinen proteinler ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Benzer yapıları belirlemek için web tabanlı program olarak PROTEIN BLAST kullanılmıştır. Oluşturulan 3-boyutlu yapının doğruluğu, AMBER programı ile enerji minimizasyonu yapıldıktan sonra web tabanlı programlar yardımıyla değerlendirilmektedir. RAMPAGE yardımıyla ramahandran grafiği çizilmiştir, ERRAT ve PROSA programları ile yapının doğruluğu değerlendirilmiştir [84], [85], [86]. Enzimin aktif bölgelerine muhtemel bağlanacak olan ligandları Q-site Finder web tabanlı programlar ile tespit edilmiştir.

2.2.8 *Bos taurus* kas enolaz enziminin moleküler docking çalışmaları ve moleküler dinamik simülasyonu

2.2.8.1 *Bos taurus* kas enolaz enziminin moleküler dinamik simülasyonu

Homoloji modelleme yöntemleri ile 3 boyutlu yapısı belirlenen *Bos taurus* kas enolazının (*BtENO3*) koordinatları başlangıç noktası alınarak 3-D yapısının

minimizasyonu yapılmıştır. Çizelge 2. 6'daki koşullar ile enerji minimizasyonu AMBER ile gerçekleştirilmiştir [48].

Çizelge 2. 6 *Bos taurus* enolazının (BtENO3) enerji minimizasyon koşulları

```
Minimize
&cntrl
  imin=1,
  ntx=1,
  irest=0,
  maxcyc=10000,
  ncyc=1000,
  ntp=100,
  ntwx=0,
  cut=8.0,
/
```

Enerji minimizasyonu koşulları aşağıdaki gibi tanımlanmıştır;

imin=1, minimizasyon

ntx=1, ASCII formatındaki koordinat dosyalarını oku

irest=0, simülasyonu yeniden başlatma

maxcyc=10000, maksimum enerji minimizasyonu basamağı

ncyc=1000, ilk 1000 döngü steepest descent algoritması sonraki basamaklar conjugate gradient algoritması

ntp=100, çıktıları yaz

ntwx=0, koordinat dosyalarını yazma

cut=8.0, Nonbonded cutoff uzaklığı (angstrom)

10000 döngü enerji minimizasyonu yapıldıktan sonra simulasyon öncesi Çizelge 2. 7'deki koşullar ile sistem ısıtılır.

Çizelge 2. 7 *Bos taurus* kas enolaz (BtENO3) sisteminin ısıtılması koşulları

```
&cntrl
  imin = 0, cut = 9, ntb = 2,
  nstlim = 100000, dt = 0.002, ntt = 3,
  gamma_ln = 1.0,
  tempi = 10.0, temp0 = 300.0,
  ntc = 2, ntf = 2,
  ntp = 1,
  ntwx = 200, ntwe = 5, ntp = 5,
&end
```

Sistemin ısıtılma koşulları aşağıdaki gibi tanımlanmıştır;

imin = 0, moleküler dinamik simülasyonu seçimi

cut = 9, Nonbonded cutoff uzaklığı (angstrom)

ntb = 2, sabit basınç

nstlim = 100000, MD simülasyon basamak sayısı

dt = 0.002, adım zamanı (pikosaniye)

ntt = 3, langevin termostat ile sıcaklık kontrolü

gamma_ln = 1.0, langevin termostat çarpışma frekansı

tempi = 10.0, başlangıç sıcaklığı

temp0 = 300.0, son sıcaklık

ntc = 2, bağ gerilmesinin simülasyonunda SHAKE modu

ntf = 2, bağ etkileşmelerinin simülasyonunda SHAKE modu

ntp = 1, sabit basınç

ntwx = 200, her 200 basamakta koordinatları yaz

ntwe = 5, her 5 basamakta enerji ve sıcaklık değerlerini yaz

ntpr = 5, her 5 basamakta enerji tüm enerji değerlerini yaz

200 pikosaniyelik sistemin ısıtılması sonrası Çizelge 2. 8'deki koşullar ile *Bos taurus* kas enolazının simülasyonu gerçekleştirilmiştir. *Bos taurus* kas enolazının (BtEno3) homoloji modeli için 50 ns'lik simülasyonu tamamlanmıştır.

Çizelge 2. 8 *Bos taurus* kas enolaz (BtENO3) sisteminin MD simülasyon koşulları

```
%cntrl
imin = 0, cut = 9, ntb = 2,
nstlim = 2500000, dt = 0.002, ntt = 1,
tempi = 10.0, temp0 = 300.0,
ntc = 2, ntf = 2,
ntp = 1,
irest = 1, ntx = 5,
ntwx = 500, ntwe = 50, ntpr = 50,
%end
%ewald
nfft1 = 108, nfft2 = 108, nfft3 = 108,
%end
```

Simulasyon koşulları aşağıdaki gibi tanımlanmıştır;

imin = 0, moleküler dinamik simulasyonu seçimi

cut = 9, Nonbonded cutoff uzaklığı (angstrom)

ntb = 2, ntb = 2, sabit basınç

nstlim = 2500000, MD simülasyon basamak sayısı

dt = 0.002, adım zamanı (pikosaniye)

ntt = 1, langevin termostat ile sıcaklık kontrolü

tempi = 10.0, başlangıç sıcaklığı

temp0 = 300.0, son sıcaklık

ntc = 2, bağ gerilmesinin simülasyonunda SHAKE modu

ntf = 2, bağ etkileşimlerinin simülasyonunda SHAKE modu

ntp = 1, sabit basınç

irest = 1, bir önceki simülasyondan devam et

ntx = 5, bir önceki simülasyondan hızı ve koordinatları oku

ntwx = 500, her 500 basamakta koordinatları yaz

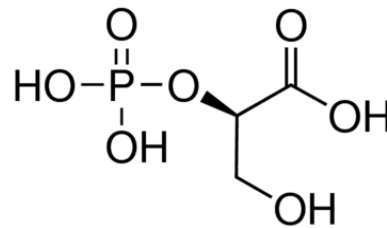
ntwe = 50, her 50 basamakta enerji ve sıcaklık değerlerini yaz

ntpr = 50, her 50 basamakta tüm enerji değerlerini yaz

nfft1 = 108, nfft2 = 108, nfft3 = 108, particle mesh ewald metodu kutucuk boyutları

2.2.8.2 Moleküler yanaştırma yöntemiyle *Bos taurus* kas enolazına substratının (2-Fosfoglisarat) yanaştırılması ve enzim-substrat kompleksinin moleküler dinamik yöntemler ile simulasyonu

AutoDock4 programı kullanılarak enzimin aktif bölgesine 2-fosfoglisarik asit (Şekil 2. 4) yanaştırılmıştır ve bağlanma enerjileri hesaplanmıştır [87]. Bu metotta genetik tarama algoritmaları ve Lamarckian yanaştırma parametreleri kullanılmıştır [88].



Şekil 2. 4 2-Fosfoglisarat

Simülasyon öncesi substratın atomik kuvvet alanları, Antechamber [89] vasıtasıyla AM1-BCC atomik yük [90] ve GAFF (general *AMBER* force field) parametreleri [91] ile tanımlanmıştır. Enzim substrat kompleksi kötü etkileşimlerden kurtarmak için enerji minimizasyonu yapılmıştır (Çizelge 2. 9). Molekül ilk 1000 adım stepest descent algoritması [92] ve sonrasında ise conjugate gradient algoritması [93] kullanılarak minimize edilmiştir. Ortama eklenen suyun moleküle homojen dağılması için restraint komutu ile sistem simülasyona hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 2. 9 *Bos taurus* enolazı-substratının (2-Fosfoglisarat) kompleksinin enerji minimizasyon koşulları

```
imin = 1, cut = 9, ntb = 1, ntr=1,
maxcyc = 100000, ncyc = 10000, ntmin = 1,
drms=0.01,
restraint_wt=1.0,
restraintmask=':1-434'
send
```

Minimize edilmiş sistemin son sıcaklığı Langevin termostadı kullanılarak [94] 300 K olacak şekilde 200 ps boyunca ısıtılmıştır ve sonrasında sistemin sıcaklığı Berendsen algoritması [95] ile kontrol edilerek 100 ns boyunca simule edilmiştir (Çizelge 2. 10).

Çizelge 2. 10 a) *Bos taurus* enolazı-substratının (2-Fosfoglisarat) kompleks sistemin ısıtılması b) Simülasyon koşulları

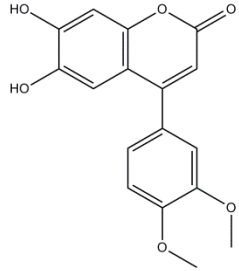
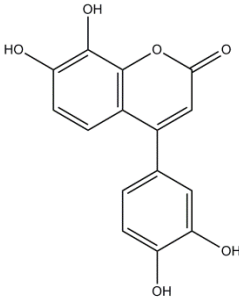
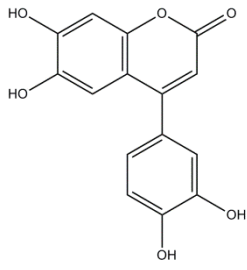
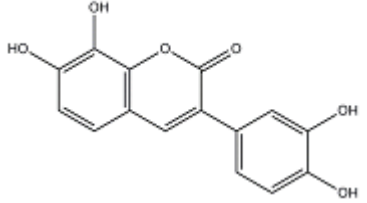
a) <code>&cntrl</code> <pre>- imin = 0, cut = 9, ntb = 2, nstlim = 200000, dt = 0.001, ntt = 3, gamma_ln = 10.0, tempi = 10.0, temp0 = 300.0, ntc = 2, ntf = 2, ntp = 1, ntwx = 200, ntwe = 50, ntpr = 50, send</pre>	b) <code>&cntrl</code> <pre>imin = 0, cut = 9, ntb = 2, nstlim = 5000000, dt = 0.002, ntt = 1, tempi = 10.0, temp0 = 300.0, ntc = 2, ntf = 2, ntp = 1, irest = 1, nttx = 5, nttxo=2, ntwx = 500, ntwe = 100, ntpr = 100, send &ewald nfft1 = 108, nfft2 = 108, nfft3 = 108, send</pre>
--	---

2.2.8.3 Moleküler docking yöntemiyle *Bos taurus* kas enolaz enzimine kumarin türevlerinin yanaştırılması ve moleküler dinamik simülasyonu

MD simülasyon öncesi enolaz enzimine AutoDock4 programı kullanılarak kör dock (blind docking) yöntemiyle on farklı konumda K8, K9, K21 ve K23 (Çizelge 2. 11) inhibitörü yanaştırılmıştır. On farklı konum içinde bağlanma enerjisi en düşük olan 2

farklı konum baz alınarak 50 ns boyunca simüle edilmiştir. Simülasyon sonrası enzim-kumarin komplekslerine substrat yanaştırılmıştır. Oluşturulan kompleks 100 ns boyunca simüle edilmeye devam edilerek son yapının belirlenmesi amaçlanmıştır. Simulasyon parametreleri Çizelge 2. 10'daki koşullar dikkate alınarak tekrarlanmıştır.

Çizelge 2. 11 Kumarin türevleri

K8	6,7- dihidroksi-4-(3,4-dimetoksifenil)-kumarin	
K9	7,8- dihidroksi-4-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin	
K21	6,7- dihidroksi-4-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin	
K23	7,8- dihidroksi-3-(3,4-dihidroksifenil)-kumarin	

2.2.9 MM-GB(PB)SA Metodu İle Kumarin Türevlerinin ve Substratın (2PG) Serbest Bağlanma Enerji Hesaplamaları

Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM-GBSA) ve Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) metodları moleküler mekaniği ve implicit solvent modelini kullanarak serbest bağlanma enerjilerini hesaplamaktadır. Serbest bağlanma enerji hesap formulasyonunda kompleks (reseptör+ligand), apoprotein (reseptör) ve ligandın ayrı ayrı enerjiler hesaplanır (2.3).

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{complex}} - (\Delta E_{\text{reseptör}} + \Delta E_{\text{reseptör}}) \quad (2.3)$$

MM-GB(PB)SA metodu ile enerji hesaplamalarında ortamdaki explicite su nedeniyle enerji değişimleri büyük dalgalanmalar şeklinde olur. Bu sebeple implicit solvent ile yer değiştirerek bu değişimler minimize edilmektedir. Herbir sistemin enerji hesabında E_{MM} gaz fazındaki sistemin moleküler mekanik enerjisini ve E_{solv} ise solvent içindeki serbest enerjiyi ifade etmektedir (2.4). Gaz fazındaki moleküler mekanik enerji kompleks, reseptör ve ligandın non-bonded bağlar olan electrostatik and van der Waals bağlarında oluşan enerjilerin toplamıdır. Yapılan simülasyon boyunca her bir sistemin moleküler mekanik enerji fonksiyonları (kuvvet alanları) kullanılarak sistem enerjisi hesaplanır. Solvent fazında hesaplanan enerji polar ve non-polar katkılar toplanarak hesaplanmaktadır. Polar enerji katkıları generalized Born (MMGBSA) ve Poisson-Boltzmann (MMPBSA) modellerine göre hesaplanabilmektedir. Ayrıca non-polar solvent etkisi de eklenmesi gerekmektedir (2.5).

$$\Delta E = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta E_{\text{solv}} \quad (2.4)$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{gas}}(\Delta \text{VDW}_{\text{gas}} + \Delta \text{EEL}_{\text{gas}}) + \Delta E_{\text{solv}}(\Delta \text{EGB}_{\text{solv}} + \Delta \text{SURF}_{\text{solv}}) \quad (2.5)$$

Bu çalışma döneminde enzim-substrat ve enzim-substrat-inhibitör komplekslerinde substrat ve inhibitör serbest bağlanma enerjileri MMGBSA/MMPBSA metodları ile karşılaştırmalı olarak hesaplanmıştır. Bu enerji hesabı simülasyon sonrası yaygınca yapılan bir yaklaşık hesaplama tekniğidir. Bu çalışmada AMBER14 programında MMPBSA.py uygulaması kullanılmıştır. mmpbsa.in girdi dosyası yardımıyla MMPBSA.py python platformu üzerinden çalıştırılmaktadır (Çizelge 2. 12). Her bir sistem için 100 ns simülasyon sonucu üretilen koordinat dosyasından 100 ps aralıklarla anlık koordinatlar

(snapshot) alınarak 0,1 M tuz konsantrasyonu ve Born implicit solvent modeli kullanılarak serbest bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.

Çizelge 2. 12 MM-GB/PBSA parametleri

[mmpbsa.in](#)

```
Input file for running PB and GB in serial
&general
  keep_files=2, interval=50,
/
&gb
  igb=2, saltcon=0.100,
/
&pb
  istrng=0.100, inp=0, radiopt=0,
```

MM-GB/PBSA hesaplama parametreleri aşağıdaki gibi tanımlanmıştır;

keep files=2, tüm geçici dosyaları tut

interval=50, koordinat dosyasında 50 adımda bir enerji hesaplama

igb=2, A. Onufriev, D. Bashford and D.A. Case tarafında modifiye edilmiş generalized born modeli kullan

saltcon=0.100, counter iyon konsantrasyonu (M)

istrng=0.100, iyonik şiddet (M)

inp=0, nonpolar enerji katkılarını hesaplamayı kapat

radiopt=0, topoloji dosyasındaki atom yarıçaplarını kullan

Kumarin türevleri olan K8, K9 ve K21 ligandları iki farklı pozisyonda enzime yanaştırıldıktan sonra 100 ns simülasyon boyunca oluşan koordinatlar kullanılmıştır. Karşılaştırma yapılması amacıyla izlenen yöntem şöyledir;

- Kumarin türevleri bağlı (*BtEno3*-2PG-inhibitör) ve bağlı olmayan (*BtEno3*-2PG) kompleksler alınarak substrat 2-fosfoglisarat serbest bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.
- Substrat bağlı (*BtEno3*-2PG-inhibitör) ve bağlı olmayan (*BtEno3*-inhibitör) kompleksler alınarak kumarin türevlerinin (K8, K9 ve K21) serbest bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

3.1 *Bos taurus* kas enolaz geninin (*BtENO3*) klonlanması

pcDNA3.1 ekspresyon vektörü içinde C-terminal DYK kuyruğu içerdiği varsayılan ve *BtENO3* geni (Çizelge 3. 1) öncelikle pLATE31 ekspresyon vektörünün için başarılı bir şekilde aktarılmıştır (NCBI Reference Sequence: NM_001034702.1). pLATE31 ekspresyon vektörüne aktarılan *BtENO3* geni dizilenmiştir ve klonlanan dizinin analizi sonucu genin 5' ucunda 24 bazlık DYK tag dizisi yer aldığı görülmüştür (Çizelge 3. 2).

Çizelge 3. 1 Klonlanmış olan *BtENO3* geninin nükleotit dizisi

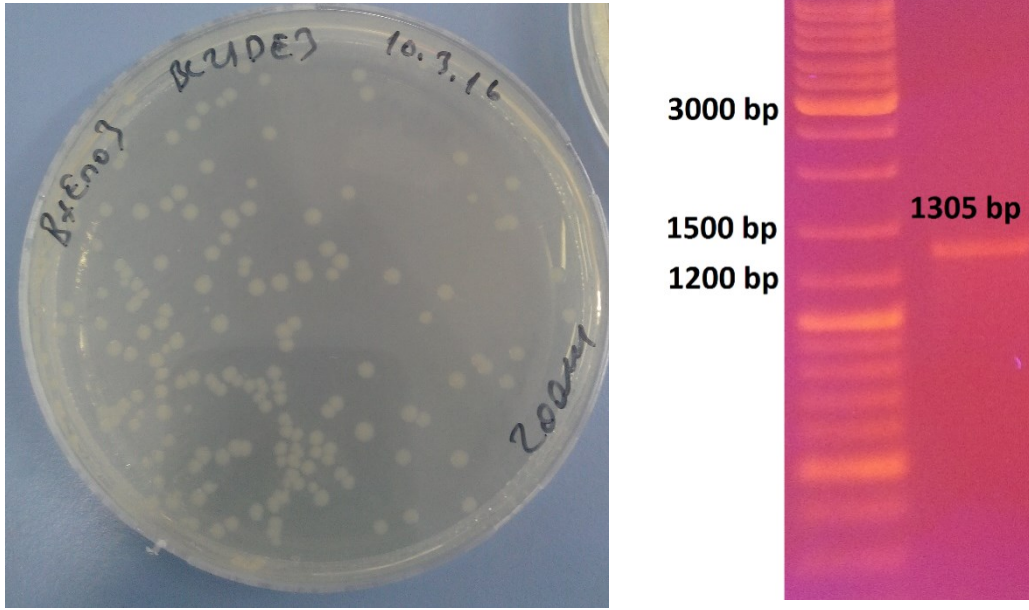
```
ATGGCCATGCAAAAAATCTTTGCCCGGGAAATCCTGGACTCCAGGGGCAACCCCACTGTGGA
GGTGGACCTGCACACGGCCAAGGGCCGATTCCGAGCAGCTGTGCCAGTGGCGCTTCCACAG
GTATCTATGAAGCTCTGGAACATAAGAGATGGAGACAAGTCTCGCTACCTGGGGAAAGGGGTC
CTGAAAGCTGTGGAACACATCAACAAGACCCTCGGCCCTGCGCTGCTGGAAAAGAACTAAG
TGTGGTGGATCAAGAAAAAGTTGACAAATTTATGATTGAGCTGGATGGGACAGAGAATAAAT
CCAAGTTTGGGGCCAATGCCATCCTGGGCGTGTCCCTGGCCGTGTGTAAGGCTGGAGCAGCT
GAGAAGGGGGTGCCGCTCTACCGACACATTGCAGATCTCGCAGGGAACCCAGAGCTGATCCT
CCCAGTCCCTGCCTTCAACGTGATCAATGGGGGCTCCCATGCTGGAAACAAGCTGGCCATGCA
GGAGTTCATGATCCTGCCTGTGGGAGCCAGCTCCTTCAGGGAAGCCATGCGCATTGGGGCCG
AGGTCTACCACCACCTCAAGGGGGTCAAGGCCAAGTATGGGAAGGACGCCACCAATGTG
GGTGATGAGGGTGGCTTTGCACCCAACATCCTGGAGAACAATGAAGCCCTGGAGCTGCTGAA
GACGGCCATCCAGGCGGCTGGTTACCCCGACAAGGTGGTGGTATTGGCATGGATGTAGCAGCAT
```

CTGAGTTCTATCGCAATGGGAAGTACGATCTCGACTTCAAGTCACCTGACGACCCTGCTCGGC
ACATCAGTGGAGAGAAGCTGGGCGAACTGTACAAGAACTTCATCAAGAACTACCCTGTGGTG
TCCATTGAGGATCCTTTTGACCAGGATGACTGGGCTACCTGGACCTCGTTCCTCTCGGGGGTC
AACATCCAGATCGTGGGGGATGATCTCACAGTCACCAACCCCAAAAGGATTGCCAGGCCGT
GGAGAAGAAGGCCTGCAACTGCCTGCTGCTGAAGGTCAACCAGATTGGCTCGGTGACTGAAT
CCATCCAGGCCTGCAAACTGGCTCAGTCTAACGGCTGGGGGGTGATGGTGAGCCACCGCTCT
GGAGAGACTGAGGACACCTTCATCGCTGACCTCGTGGTGGGGCTCTGCACAGGACAGATCAA
GACTGGTGCCCCATGCCGCTCAGAGCGTCTGGCCAAATACAATCAGCTCATGAGGATTGAGG
AGGCTCTTGGGGACAAGGCTGTCTTTGCTGGACGCAAGTTCCGTAACCCGAAGGCCAAGTGA

Çizelge 3. 2 Dizileme sonucu *BtENO3* geninin 5' dizisi

ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GCCATGCAAAAAATCTTTGCCCGGAAATCCTGGACTCCAGGGGCAACCC
M D Y K D D D D K
ACTGTGGAGGTGGACCTGCACACGGCCAAGGGCCGATTCCGAGCAGCTGTGCCAGTGGCGCTTCCACAGGTATCTAT
GAAGCTCTGGAACCTAAGAG

DYK kuyruğunun çıkarılması amacıyla *BtENO3F_M* ve *BtENO3R_M* primerleri kullanılarak dizinin 5' ucundaki 24 bazlık kısım çıkarılmıştır. İkinci aşama olarak pLATE31 vektörüne spesifik uçlar oluşturmak amacıyla *BtENO3F* ve *BtENO3R* primleri kullanılarak *BtENO3* geni amplifiye edilmiştir. LIC reaksiyonu ile vektör ve *BtENO3* geni ligasyon yapılmıştır. Ligasyon sonrası *BtENO3* içeren pLATE31 rekombinant vektörü CaCl₂ ile kompetan hale getirilmiş olan *E. Coli* BL21(DE3) hücrelerine başarılı bir şekilde transfer edilmiştir (Şekil 3. 1a). LB katı besiyerine ekilen transformantlar gece boyu 37 °C inkübe edilmiş ve gelişen beyaz kolonilerden hücreler alınarak LB sıvı besiyerine ekilmiştir. Geliştirilen kültürden plasmid DNA izole edilerek spesifik primerler ile gen amplifiye edilmiştir ve 1305 bazçifti olduğu jel üzerinde gösterilmiştir (Şekil 3. 1b).



Şekil 3. 1 a) Transformasyon sonucu pozitif olduğu düşünülen koloniler b) Klonlanan genin amplifikasyonu 1:Marker, 2:*BtEno3*

Pozitif olduğu düşünülen kolonilerden izole edilen rekombinant vektör dizilenmiş ve sonucun doğruluğu test edilmiştir. Yapılan analiz sonucu dizinin 5' ucundaki DYK dizisi çıkarıldığı görülmektedir(Şekil 3. 2). Saflaştırma amacıyla dizinin 3' ucuna spesifik primer yardımıyla 6 histidinden oluşan dizinin başarı ile eklendiği analiz sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 3. 3) .

<i>referans/1-1305</i>	1	-----ATGGCCATGCAAAAAATCTTTGCCCGGGAAATCCTGGACTCCAGGGGCAACCCAC	56
<i>BtEno3/1-623</i>	1	TATAACTATGGCCATGCAAAAAATCTTTGCCCGGGAAATCCTGGACTCCAGGGGCAACCCAC	63
<i>referans/1-1305</i>	57	TGTGGAGGTGGACCTGCACACGGCCAAGGGCCGATTCCGAGCAGCTGTGCCAGTGGCGCTTC	119
<i>BtEno3/1-623</i>	64	TGTGGAGGTGGACCTGCACACGGCCAAGGGCCGATTCCGAGCAGCTGTGCCAGTGGCGCTTC	126
<i>referans/1-1305</i>	120	CACAGGTATCTATGAAGCTCTGGAACCTAAGAGATGGAGACAAGTCTCGCTACCTGGGGAAAGG	182
<i>BtEno3/1-623</i>	127	CACAGGTATCTATGAAGCTCTGGAACCTAAGAGATGGAGACAAGTCTCGCTACCTGGGGAAAGG	189

Şekil 3. 2 *BtEno3* forward dizileme

<i>referans/1-1302</i>	1249	CTTGGGGACAAGGCTGTCTTTGCTGGACGCAAGTTCCGTAACCCGAAG	1296
<i>BtEno3/1-481</i>	337	CTTGGGGACAAGGCTGTCTTTGCTGGACGCAAGTTCCGTAACCCGAAG	384
<i>referans/1-1302</i>	1297	GCCAAG-----	1302
<i>BtEno3/1-481</i>	385	GCCAAGGGCCATCACCATCACCACCACGGCTAATGACTTCCCATCTCC	432

6-histidine

Şekil 3. 3 *BtEno3* reverse dizileme

3.2 *Bos taurus* Kas Enolaz (BtENO3) Dizi analizi

Bos taurus, *Bos indicus* *Homo sapiens*, *Theileria annulata*, *Bubalus bubalis*, *Capra hircus* ve *Saccharomyces cerevisiae* enolazları katalitik rezidüler, katalitik halkalar, plasminojen bağlanma bölgeleri, insersiyon ve delesyon bölgelerinin analizi için aminoasit düzeyinde karşılaştırılmıştır. Theileriosis sebeb olan *Theileria annulata* parazitinde bir tane penta-peptide insersiyonu [96] ve *B. taurus*, *B. indicus* *H. sapiens*, *B. bubalis* ve *C. hircus* türlerine karşı kıyaslandığında *T. annulata* ve *S. cerevisiae* 3 tane dipeptide insersiyonu [62] bulunduğu görülmektedir (Şekil 3. 4). Plasminojen bağlanma bölgeleri de ayrıca şekil üzerinde gösterilmektedir ve bu bölgenin benzer türler arasında korunduğu ortaya çıkmaktadır. *S. cerevisiae* enolazının 3 boyutlu kristal yapısı bulunmuştur ve detaylı bir şekilde 2PG-PEP iki yönlü çevrimi tanımlanmıştır. 2PG-PEP dönüşümünden sorumlu rezidüler, enolaz-Mg⁺² divalent katyon koordinasyonu ve proton paylaşımında rol alan rezidüler deneysel olarak belirlenmiştir [97], [98], [99], [100], [101]. Bu çalışmada *S. cerevisiae* ile *BtEno3* kıyaslandığında bu bölgelerin korunduğu bulunmuştur. 2PG substrat bağlanma bölgesindeki rezidüler His158 (His159 mayada), Gln166 (Gln167 mayada), Lys343 (Lys345 mayada), His371 (His373 mayada), Arg372 (Arg374 mayada), Ser373 (Ser375 mayada), ve Lys394 (Lys396 mayada) olarak tespit edilmiştir. Proton dehidrasyonundan sorumlu Glu167 (Glu168 mayada) ve Glu210 (Glu211 mayada) rezidüleridir. *BtEno3* ile Mg⁺² divalent katyonu ile koordinasyonda olan Asp245 (Asp246 mayada), Glu293 (Glu295 mayada), Asp318 (Asp320 mayada) ve Ser40 (Ser39 mayada) rezidüleridir. *T. annulata* enolazını katalitik halkaları daha önceki *in silico* çalışmalar ile tespit edilmiştir [62] ve bu rezidüler *BtEno3* için bu çalışmada doğrulanmıştır. *BtEno3* için Loop1 Val35-Arg56 (Cys36-Arg57 *T. annulata*), Loop2 His158-Gln166 (His165-Gln173 *T. annulata*) ve Loop3 Phe251-Ser272 (Phe258-Thr279 *T. annulata*) olarak tanımlanmıştır (Şekil 3. 4) [62].

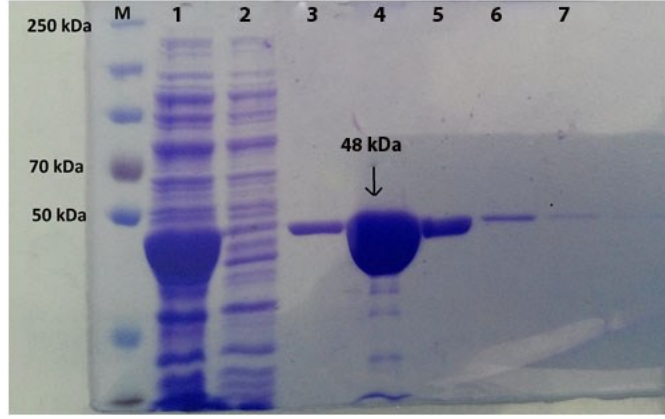
3.3 *Bos taurus* kas enolazını kodlayan genin ifadesi, enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu

BtENO3 geninin içeren *E. coli* BL21(DE3) hücreleri gece boyunca (ON) 25 °C de 0.5 mM IPTG indüklemesi inkübe edilen kültürden örnekler alınmış ve analiz edilmiştir (Şekil 3. 5). *BtENO3* proteini teorik olarak 47095 Dalton olarak belirlenmiştir. Enolazın fiziksel özellikleri, Innovagen AB (Lund, İsveç) tarafından sağlanan PepCalc kullanılarak teorik olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3. 3). *BtEno3*'ün moleküler ağırlığı fiogenetik olarak yakın olan türler *Bos indicus*, *Homo sapiens*, *Bubalus bubalis*, *Capra hircus* enolazları ile uyumludur. Ancak farklı krallıktaki *Theileria annulata* ve *Saccharomyces cerevisiae* enolazları *BtEno3*'ün moleküler ağırlığı ile farklı olduğu bilinmektedir.

Çizelge 3. 3 Enolazların fiziksel özellikleri

Species	Molecular Weight	Iso-electric point
<i>Theileria annulata</i>	48073.51 g/mol	pH 6.14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46815.56 g/mol	pH 6.17
<i>Bos indicus</i>	47095.49 g/mol	pH 7.53
<i>Bos taurus</i>	47095.49 g/mol	pH 7.53
<i>Homo sapiens</i>	47018.36 g/mol	pH 7.52
<i>Bubalus bubalis</i>	47023.43 g/mol	pH 7.83
<i>Capra hircus</i>	47068.47 g/mol	pH 7.53

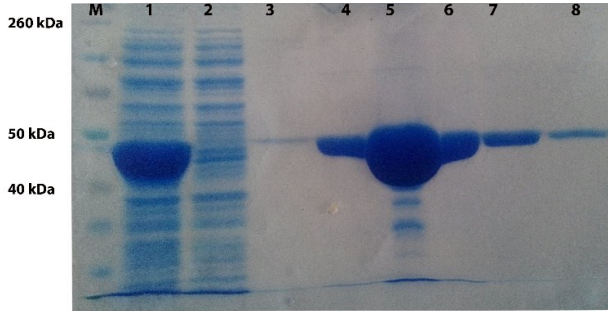
Analiz sonrası jel görüntüsünde 48 kDa bant hizasında enzimin eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Enzim karakterizasyon çalışmaları için %95 saflıkta protein elde edilmesi gerekmektedir. İkinci toplanan elüsyonda safsızlıkların olduğu gözükmemektedir. Bu safsızlıkları yok etmek için alternatif yöntem olarak çift saflaştırma yapılmıştır.



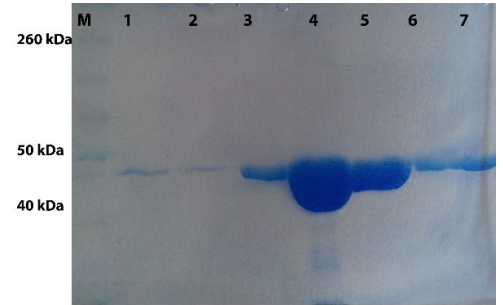
Şekil 3. 5 *BtENO3* SDS-PAGE jel, Hat 1; hücre lizati, Hat 2; flowthrough, Hat 3; elüsyon 1, Hat 4; elüsyon 2, Hat 5; elüsyon 3, Hat 6; elüsyon 4, Hat 7; elüsyon 5

Gece boyunca (ON) 25 °C de 0.5 mM IPTG indüklemesi inkübe edilen kültürden toplanan pellet saflaştırılarak çift saflaştırılma yapılmıştır (Şekil 3. 6). SDS-PAGE analizi sonrası ikinci olarak toplanan elüsyonda safsızlıkların olduğu görülmektedir. Devam eden ikinci saflaştırma sonrası bu safsızlıkların ortadan kaldırılamadığı gözlemlenmiştir.

a)

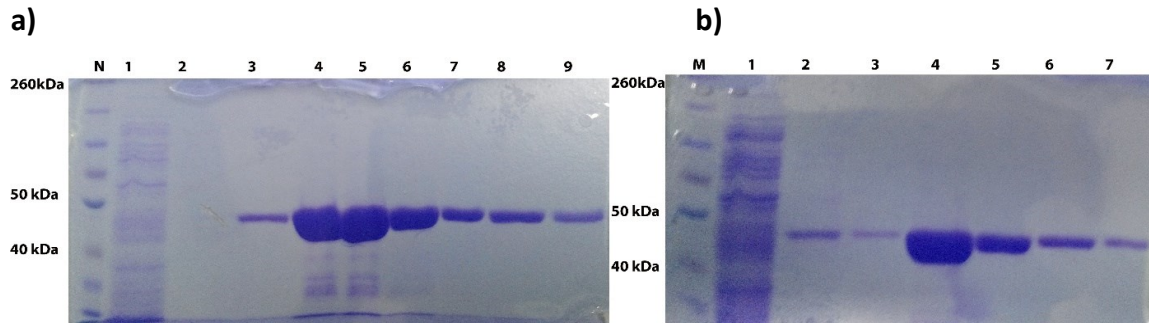


b)



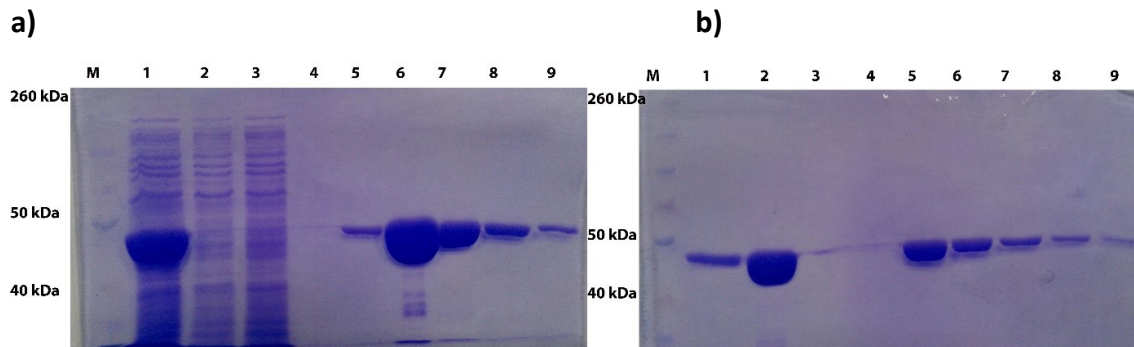
Şekil 3. 6 a) *BtENO3* ilk saflaştırma SDS-PAGE jel, Hat 1; hücre lizati, Hat 2; flowthrough, Hat 3; yıkama elüsyonu, Hat 4; elüsyon 1, Hat 5; elüsyon 2, Hat 6; elüsyon 3, Hat 7; elüsyon 4, Hat 8; elüsyon 5 b) İkinci saflaştırma, Hat 1; flowthrough, Hat 2; yıkama elüsyonu, Hat 3; elüsyon 1, Hat 4; elüsyon 2, Hat 5; elüsyon 3, Hat 6; elüsyon 4, Hat 7; elüsyon 4

Saflaştırma prosedüründe elüsyonlar 1'er ml şeklinde toplanmıştır. İkinci deneme olarak elüsyonlar 500'er µl alınıp SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 3. 7). İlk saflaştırmada ikinci ve üçüncü elüsyonlarda safsızlıkların olduğu ve devam eden ikinci saflaştırmada bu safsızlıkların kısmen devam ettiği gözlemlenmiştir.



Şekil 3. 7 a) *BtENO3* ilk saflaştırma SDS-PAGE jel, Hat 1; flowthrough, Hat 2; yıkama elüsyonu, Hat 3; elüsyon 1, Hat 4; elüsyon 2, Hat 5; elüsyon 3, Hat 6; elüsyon 4, Hat 7; elüsyon 5 Hat 8; elüsyon 6, Hat 9; elüsyon 7 b) İkinci saflaştırma, Hat 1; flowthrough, Hat 2; yıkama elüsyonu, Hat 3; elüsyon 1, Hat 4; elüsyon 2, Hat 5; elüsyon 3, Hat 6; elüsyon 4, Hat 7; elüsyon 5

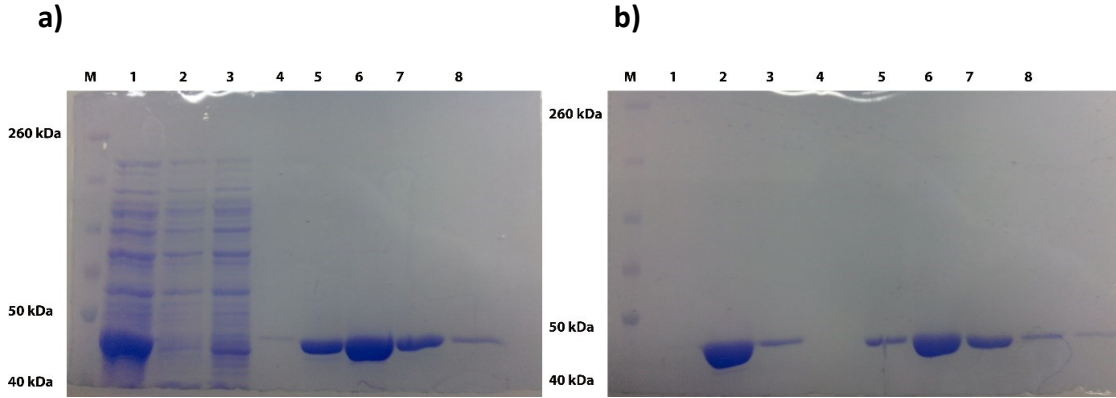
Üçüncü denemede elüsyonlar 1'er ml toplanmaya devam edilmiştir. Bu denemede ilk saflaştırma sonrası safsızlıkların olduğu ve ikinci saflaştırmada bu safsızlıkların kısmen devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3. 8). İkinci saflaştırma aşamasında örneklerin yıkama elüsyonlarında ve ilk süzüntüde kayıp olduğu farkedilmiştir. Enzim konsantrasyonu karakterizasyon çalışmalara yapmaya yeterli olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. 8 a) *BtENO3* ilk saflaştırma SDS-PAGE jel, Hat 1; hücre lizati, Hat 2; flowthrough, Hat 3; yıkama elüsyonu 1, Hat 4; yıkama elüsyonu 2 Hat 5; elüsyon 1, Hat 6; elüsyon 2, Hat 7; elüsyon 3, Hat 8; elüsyon 4, Hat 9; elüsyon 5 b) İkinci saflaştırma, Hat 1; flowthrough, Hat 2; yıkama elüsyonu 1, Hat 3; yıkama elüsyonu 2, Hat 4; elüsyon 1, Hat 5; elüsyon 2, Hat 6; elüsyon 3, Hat 7; elüsyon 4, Hat 8; elüsyon 5

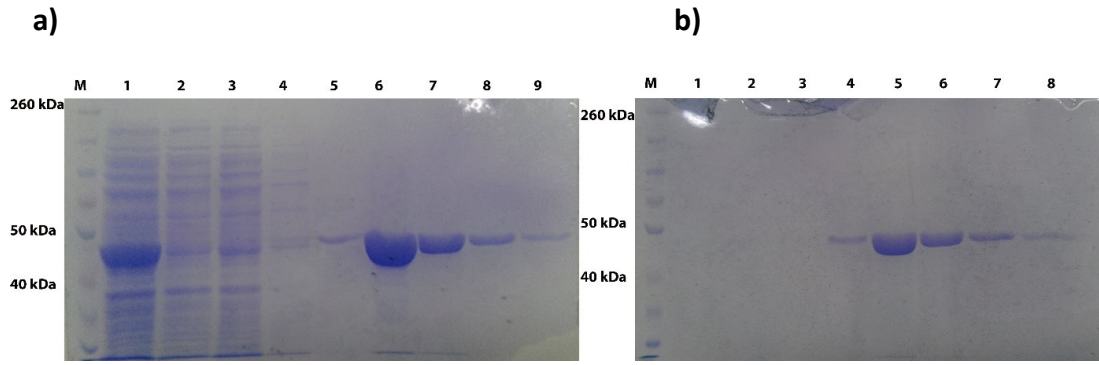
Dördüncü denemede yıkama solüsyonunun %5 gliserol ilavesi yapılarak safsızlıkların giderilmesi amaçlanmıştır. 5 saat boyunca 25 °C de 0.5 mM IPTG indüklemesi inkübe edilen kültürden toplanan pellet saflaştırılarak çift saflaştırılma yapılmıştır. Saflaştırmada elüsyonlar 1'er ml toplanmış ve ikinci saflaştırma yıkama tamponuna %5 gliserol ilavesi yapılarak saflaştırmaya aynı protokol ile devam edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonrasında ilk saflaştırma sonrası safsızlıkların ikinci saflaştırmada olmadığı fakat

son elde edilen saf enzimin konsantrasyonu yeterli görülmemiştir (Şekil 3. 9). Bir önceki denemede olduğu gibi enzimin ikinci saflaştırma sırasında ilk süzüntü ve yıkama elüsyonlarında kayıp edildiği tespit edilmiştir.



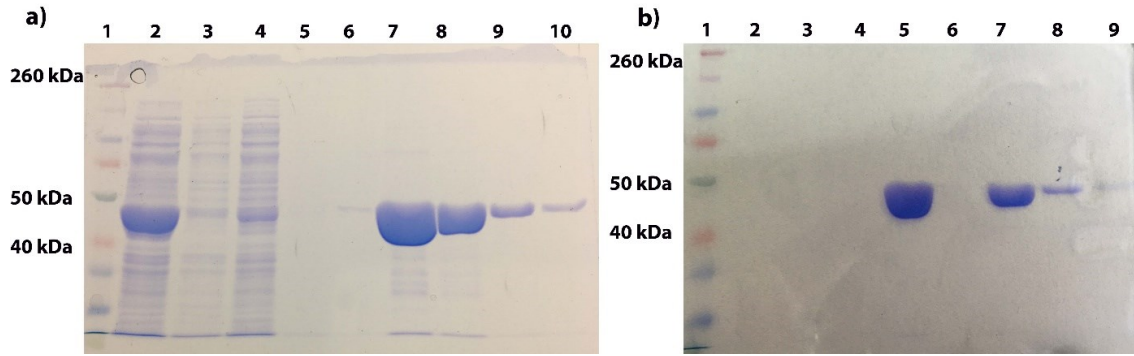
Şekil 3. 9 a) *Bt*ENO3 ilk saflaştırma SDS-PAGE jel, Hat 1; hücre lizatı, Hat 2; flowthrough, Hat 3;yıkama elüsyonu 1, Hat 4;yıkama elüsyonu 2 Hat 5; elüsyon 1, Hat 6; elüsyon 2, Hat 7; elüsyon 3, Hat 8; elüsyon 4, b) İkinci saflaştırma, Hat 1; flowthrough, Hat 2;yıkama elüsyonu 1, Hat 3;yıkama elüsyonu 2, Hat 4; elüsyon 1, Hat 5; elüsyon 2, Hat 6; elüsyon 3, Hat 7; elüsyon 4, Hat 8; elüsyon 5

Beşinci denemede 5 saat boyunca 25 °C de 0.5 mM IPTG indüklemesi inkübe edilen hücrelerden toplanan pellet saflaştırma sonrası safsızlıkları yok etmek ve yeterli konsantrasyonda enzim saflaştırabilmek için değişiklikler yapılmıştır. İkinci saflaştırma sırasındaki enzim kaybını önlemek için birinci saflaştırma sonrası toplanan ikinci ve üçüncü elüsyonlardaki fazla imidazolü uzaklaştırmak için 10K protein concentrator kullanılmıştır. Elüsyon içindeki 150 mM imidazol miktarı 20 mM'a düşürülmüş ve ikinci saflaştırmaya geçilmiştir. SDS-PAGE analizi sonrası safsızlıkların ve enzim kaybının engellendiği görülmüştür (Şekil 3. 10). Enzim karakterizasyon çalışmalarına bu protokol ile devam edilecektir.



Şekil 3. 10 a) *BtENO3* ilk saflaştırma SDS-PAGE jel, Hat 1; hücre lizati, Hat 2; flowthrough, Hat 3;yıkama elüsyonu 1, Hat 4;yıkama elüsyonu 2 Hat 5; elüsyon 1, Hat 6; elüsyon 2, Hat 7; elüsyon 3, Hat 8; elüsyon 4, Hat 9; elüsyon 5 b) İkinci saflaştırma, Hat 1; flowthrough, Hat 2;yıkama elüsyonu 1, Hat 3;yıkama elüsyonu 2, Hat 4; elüsyon 1, Hat 5; elüsyon 2, Hat 6; elüsyon 3, Hat 7; elüsyon 4, Hat 8; elüsyon 5

Optimizasyon sonrası takip edilen metot ile enzim %95 saflıkta üretilmiştir (Şekil 3. 11).

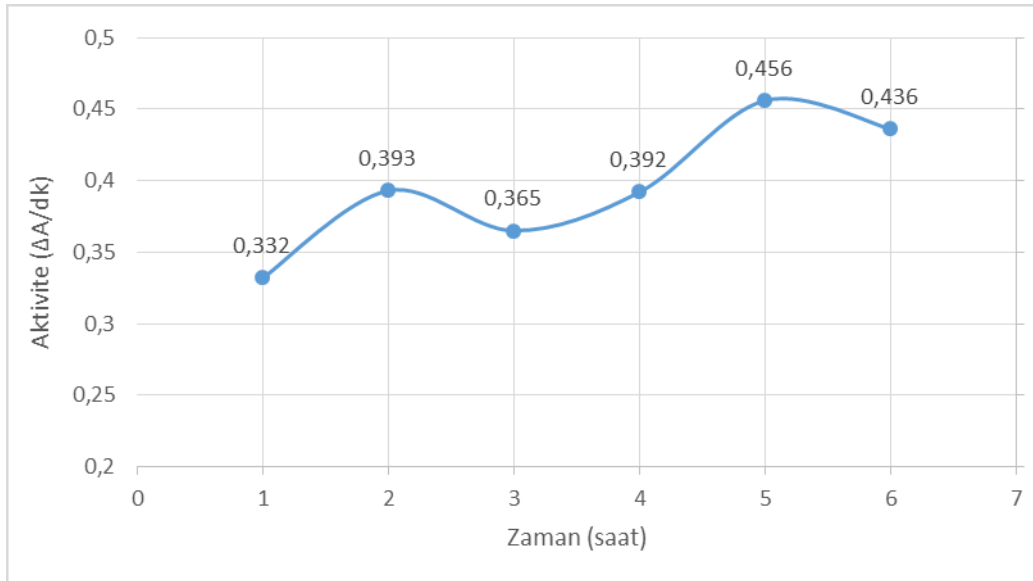


Şekil 3. 11 a) *BtENO3* ilk saflaştırma SDS-PAGE jel, Hat 1; Protein ladder, Hat 2; hücre lizati, Hat 3; flowthrough, Hat 4;yıkama elüsyonu 1, Hat 5;yıkama elüsyonu 2 Hat 6; elüsyon 1, Hat 7; elüsyon 2, Hat 8; elüsyon 3, Hat 9; elüsyon 4, Hat 10; elüsyon 5 b) İkinci saflaştırma, Hat 1; Protein ladder, Hat 2; flowthrough,, Hat 3; yıkama elüsyonu 1, Hat 4;yıkama elüsyonu 2, Hat 5; Elüsyon 2 ve 3 birleştirilmiş ve konsantre edilmiştir, Hat 6; elüsyon 1, Hat 7; elüsyon 2, Hat 8; elüsyon 3, Hat 9; elüsyon 4

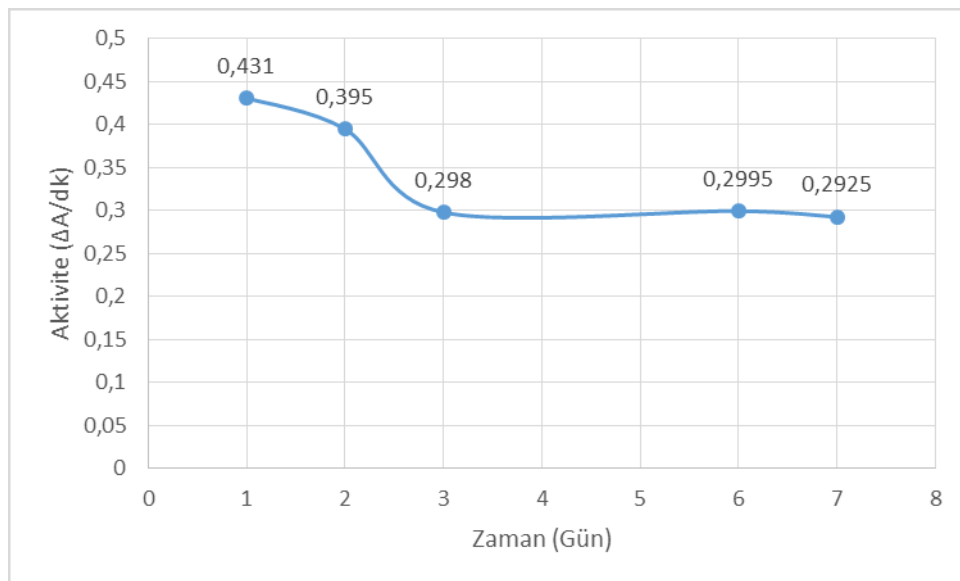
3.4 *Bos taurus* Kas Enolazının (*BtENO3*) Karakterizasyonu

Enzimin gün içindeki ve bir hafta içindeki aktivite değişimi 25 °C ve pH 7.4 de analiz edilmiştir. Gün içindeki enzim stabilitesini analiz etmek için saatte bir ölçüm alınmıştır. Hafta içindeki değişim için 1, 2, 3, 6 ve 7 günlerde aktivite değerleri hesaplanıp kaydedilmiştir. Bu değerler ile değişimin grafiği çizilmiştir. Gün içindeki enzim stabil kaldığı ve ölçümlerdeki küçük farklılıkların göz ardı edilebileceği ifade edilmektedir (Şekil 3. 12). Hafta içindeki değişim ise ilk 2 gün sonrasında enzim aktivite kaybına uğramıştır fakat 2. gün sonrasında sabit kalmıştır (Şekil 3. 13). Saflaştırılan enzimin

aktivitesinin koruma amacıyla son konsantrasyon 6 M etilen glikol ile birleştirilip +4 C de saklanmıştır.



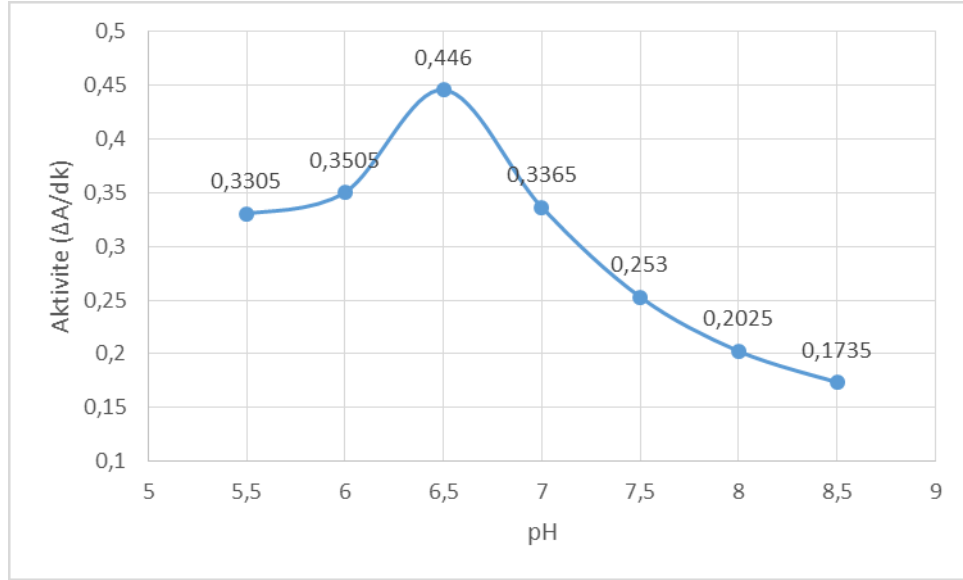
Şekil 3. 12 *Bos taurus* kas enolazının (*BtENO3*) gün içindeki aktivite değişimi



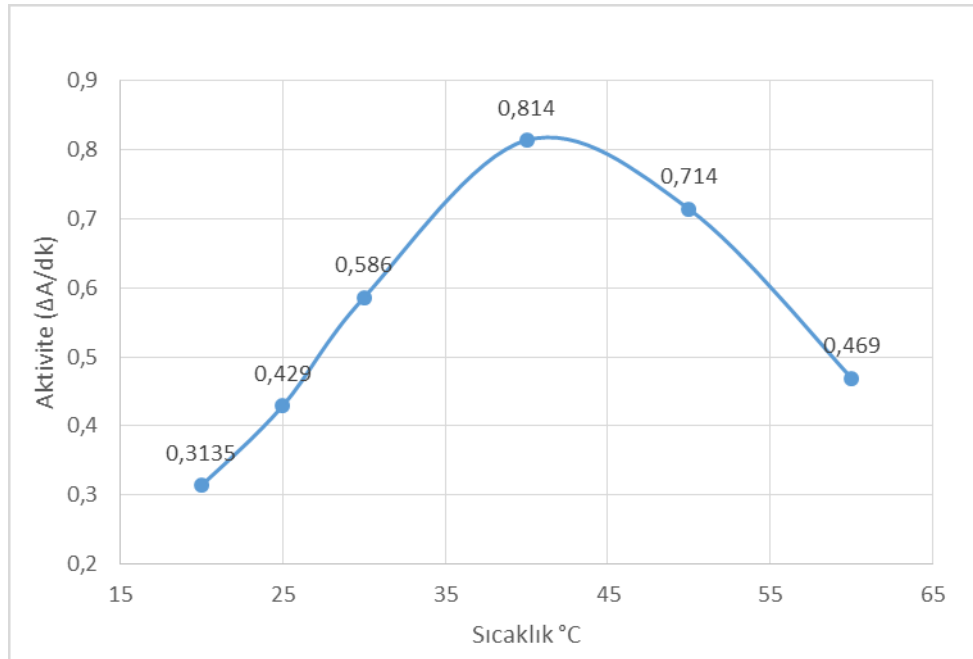
Şekil 3. 13 *Bos taurus* kas enolaz (*BtENO3*) hafta içindeki aktivite değişimi

Enzim aktivitesinin optimum koşullarını tespit etmek amacıyla 25 °C'de pH 5.5-8.5 aralığında aktivite değerleri analiz edilmiştir. Bu çalışma ile *Bos taurus* kas enolazının optimum çalıştığı pH değeri 6,5 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3. 14). Optimum pH tespit edildikten sonra sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi pH 6,5 da 20-60 °C arası

sıcaklıklarda analiz edilmiştir. *Bos taurus* kas enolazının aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 40 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 3. 15).



Şekil 3. 14 *BtENO3* optimum pH grafiği (25 °C)

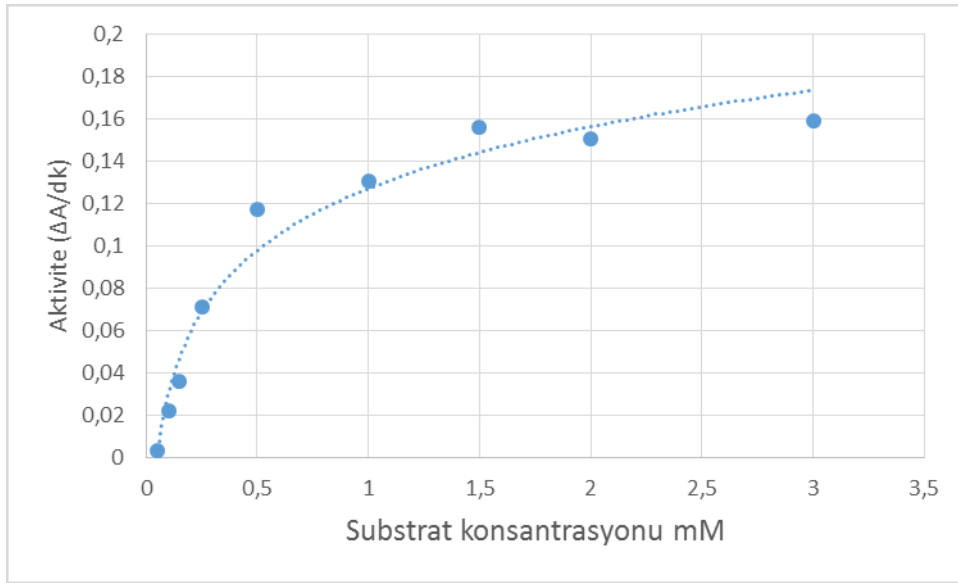


Şekil 3. 15 *BtENO3* optimum sıcaklık grafiği (pH 6.5)

%95 saflıkta saflaştırılan *Bos taurus* kas enolazının (*BtENO3*) kinetik parametreleri tanımlanmıştır. Saflaştırılan enzim %35 seyrelterek 25 °C ve pH 6.5 de ölçümler alınmıştır. Enzimi Michaelis-Menten kinetiğine uyumlu hale getirmek için 2 mM 2PG

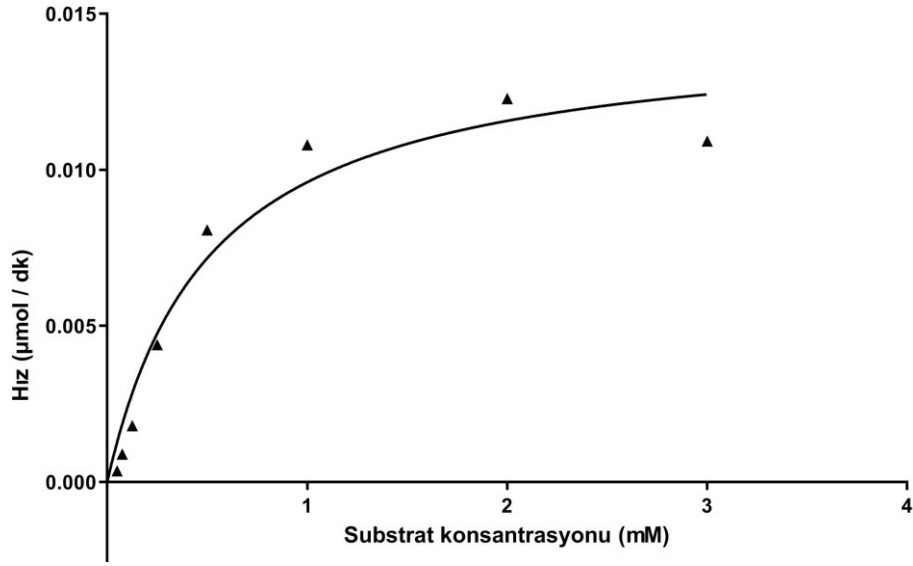
substrat konsantrasyonunda ölçülen aktivite değerinin $\Delta A/\text{min}$ 0.150 karşılık gelen seyreltme seçilmiştir.

Michaelis-Menten kinetiğine uyumlu hale getirmek için maksimum aktivitenin 2mM substrat konsantrasyonunda 0.150 değerinde ölçüm alabilmek için %35 seyreltilmiştir. Yapılan ölçümlerde substrat konsantrasyonu 3, 2 ve 1.5 mM da maksimum aktivite değeri sabit kalmıştır. Substrat konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri alınarak çizilen grafikte aktivitenin 1.5 mM substrat konsantrasyonunda sabitlendiği analiz edilmiştir (Şekil 3. 16).



Şekil 3. 16 Farklı substrat konsantrasyonlarda alınan enzim (% 35 seyreltmeli) aktivite ($\Delta A/\text{dk}$) grafiği

Bos taurus kas enolazının (*BtENO3*) Michaelis-Menten kinetiğine göre reaksiyonun parametreleri belirlenmiştir. Tüm absorbans farkı değerleri, ϵ_{PEP} ($1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [82] katsayısı baz alınarak spesifik aktivite ($\mu\text{mol}/\text{dk}$) değerine dönüştürülmüş ve V_{max} değeri hesaplanmıştır. V_{max} ve K_m parametreleri sırasıyla sırasıyla $0,01305 \mu\text{mol}/\text{dk}$ ve $0,514 \text{ mM}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 3. 17).



Şekil 3. 17 *Bos taurus* Kas Enolaz (*BtENO3*) Michaelis-Menten Eğrisi

Çizelge 3. 4'deki enolazların kinetik özellikleri karşılaştırıldığında, en yüksek K_m değerine sahip enzim *BtEno3*'tür. *BtEno3*'e karşı filogenetik olarak ilişkili insan beta enolazı ve tavşan kası enolazı daha düşük substrat afinitesi anlamına gelen daha düşük K_m değerlerine sahiptir. Theileriosis'e neden olan *Theileria annulata*, *BtEno3* konakçı organizma ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir substrat afinitesine sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 3. 4 Farklı kaynaklardan enolazın kinetik özellikleri

Türler	K_m (mM)	V_{max}	Kaynak
<i>BtEno3</i>	0.514	0,0291 $\mu\text{mol/dk}$	Bu çalışmada
Human beta enolase	0.20	0.36 mM / min	[102]
Tavşan kas	0.016	NA	[103]
Maya enolaz	0.057	NA	[103]
<i>Theileria annulata</i>	0.106	0,132 mM / min	[61]

3.5 *Bos taurus* kas enolaz enziminin homoloji modellemesi ve optimizasyonu

BtENO3 aminoasit dizisi ile 3-boyutlu yapısı bilinen proteinleri PROTEIN BLAST yardımıyla karşılaştırılmıştır ve yapılan sorguya göre Human Beta Enolase %98 aminoasit benzerliği, toplam dizi çakıştırma skoru 879, E değeri ise 0 dir. E değeri iki

dizinin akıştırılmasındaki anlamlılık değerini ifade etmektedir bu değer ne kadar küçük olursa o kadar iki dizi benzerdir denebilir (şekil 3. 18). MODELLER programı ile Human Beta Enolase (pdb kodu: 2XSX_A) şablon yapısı olarak kullanılarak *BtEno3* için tahmini bir 3-D yapısı oluşturulmuştur. Oluşturulan modeller DOPE ve GA341 skoruna göre sıralanmaktadır ve 100 tane farklı model oluşturulmuştur. GA341 puanları 0,0 ile 1,0 arasında değişmektedir ve en güvenilir modelin skoru 1'e yakın olması gerekmektedir. Ayrıca en yüksek DOPE skora sahip modelde güvenilir model alınabilmektedir. En güvenilir model alınmıştır ve bu yapı PyMOL pdb görüntüleyicisi ile çizilmiştir (şekil 3. 19).

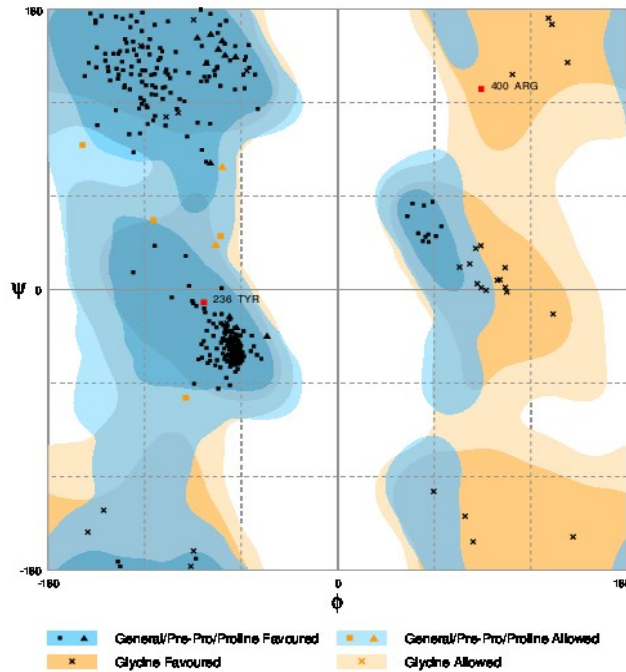
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Chain A, Crıstal Structure Of Human Beta Enolase Enob	879	879	100%	0.0	98%	2XSX_A
☐ Chain A, Crıstal Structure Of Enolase1	766	766	100%	0.0	84%	2PSN_A
☐ Chain A, Crıstal Structure Of Human Enolase 1	764	764	99%	0.0	84%	3B97_A
☐ Chain A, Asymmetric Complex Of Human Neuron Specific Enolase-1-PgaPEP	762	762	99%	0.0	84%	3UCC_A
☐ Chain A, Crıstal Structure Of Human Neuron Specific Enolase At 1.8 Angstrom	760	760	99%	0.0	84%	1TE6_A
☐ Chain A, Asymmetric Complex Of Human Neuron Specific Enolase-3-PgaPEP	760	760	99%	0.0	84%	3UJE_A
☐ Chain A, X-Ray Structure And Catalytic Mechanism Of Lobster Enolase	650	650	99%	0.0	72%	1PDZ_A
☐ Chain A, 2.75 Angstrom Crıstal Structure Of Enolase 1 From Toxoplasma Gondii	566	566	99%	0.0	64%	3OTR_A
☐ Chain A, Catalytic Metal Ion Binding In Enolase: The Crıstal Structure Of Enolase-Mn2+-Phosphonoacetohydroxamate Complex At 2.4 Angstroms Resolution	563	563	98%	0.0	64%	1ELS_A

şekil 3. 18 *BtENO3* enziminin kristalografik olarak 3 boyutlu yapısı bilinen proteinleri ile çakıştırılması sonucu benzerlik oranları



şekil 3. 19 *BtENO3* homoloji model

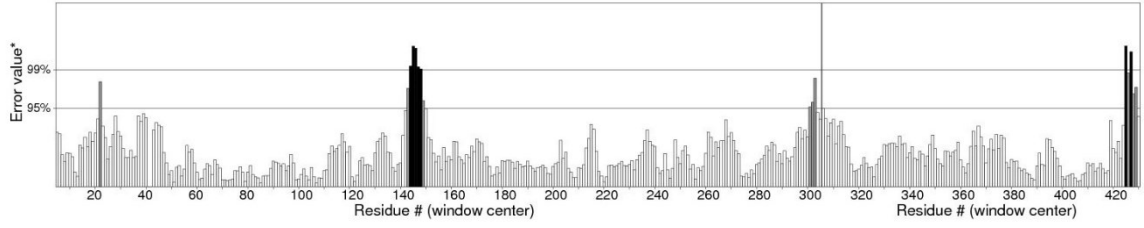
Oluşturulan yapının ramahandran grafiği RAMPAGE ile oluşturulmuştur. Programın verdiği çıktılarına göre aminoasit dizisinin % 98 (424 rezidü) tercih edilen bölgede, % 2 (6 rezidü) izin verilen bölgede ve %0,5 (2 rezidü) dış bölgede yer almaktadır (Şekil 3. 20). Bir polipeptitte ana zincirde N-C alfa ile C-C alfa nispeten serbest olarak dönebilirler. Bu dönmeler yapıdaki tüm residüler için phi-psi (ψ - ϕ) itme açılarını (dihedral) gösterir. Her bir konformasyon için yapı, atomlar arasındaki yakın etkileşimler için test edilmektedir. İdeal olarak, eğer %90 residue izin verilen bölgede ise yapının stereokimyasal kalitesi yüksek olduğu söylenebilir [84].



Şekil 3. 20 *BtENO3* RAMPAGE ile oluşturulan Ramahandran grafiği

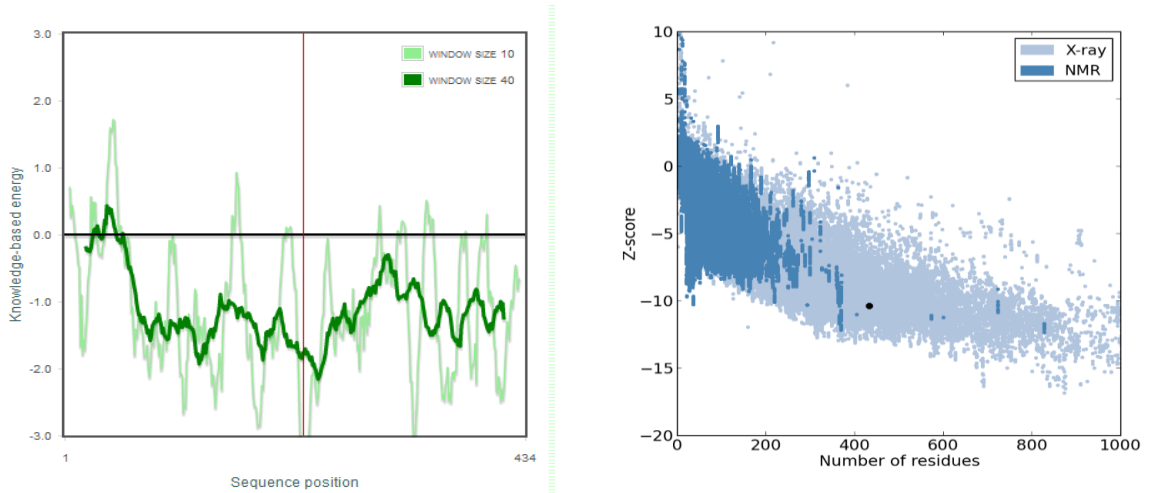
Web tabanlı ERRAT programı yardımıyla homoloji modelleme ile oluşturulan 3-boyutlu yapının güvenilirliği test edilmiştir. Bu program bağ yapmamış atomlar arasındaki etkileşim istatistiklerini analiz eder ve güvenilir yüksek çözünürlükteki protein yapıları ile karşılaştırır [85]. ERRAT programı yardımıyla elde edilen çıktıda oluşturulan yapının doğruluğu % 96,226 olarak verilmiştir (Şekil 3. 21). Alınan bu çıktıya göre değer

güvenilebilir sınırlar (%90 ve üzeri) içerisinde.



Şekil 3. 21 BtENO3 ERRAT program çıktısı

Web tabanlı ProSA programı ile 3-boyutlu yapının doğruluğu değerlendirilmiştir. Bu program teorik ve deneysel olarak tanımlanan yapıları karşılaştıran bir programdır. Düşük çözünürlükteki yapılar ile yüksek çözünürlükteki yapılar ile karşılaştırarak elde edilen 3-boyutlu yapının hızlı bir şekilde potansiyel hataları belirlenir [8]. Elde edilen çıktıya göre çalışmamızdaki *Bos taurus* enolazı X-ray kristalografi ile yapısı tanımlanan yapılara benzemektedir (Şekil 3. 22). Enerji grafiğinde pozitif değerler o modelin problemli ve hatalı bir model olduğu yönünde fikir verir. Verilen enerji grafiğinde oluşturulan 3- boyutlu yapının güvenilir yapı olduğu söylenebilmektedir (Şekil 3. 22).



Şekil 3. 22 ProSA ile gösterilen enerji grafiği

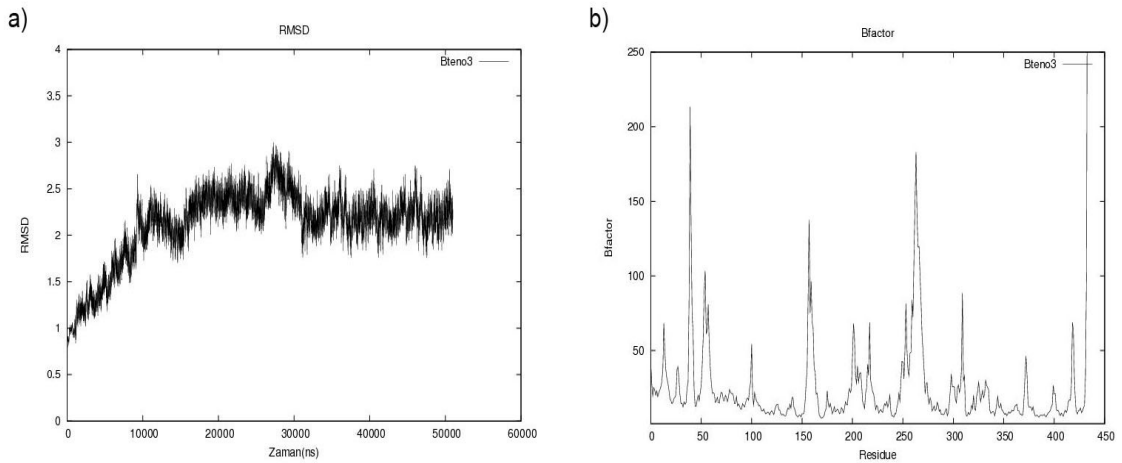
3.6 *Bos taurus* kas enolaz enziminin moleküler docking çalışmaları ve moleküler dinamik simülasyonu

3.6.1 *Bos taurus* kas enolaz enziminin moleküler dinamik simülasyonu

Biyolojik moleküllerin hareketi belirli zaman aralıklarında olmaktadır. Bölgesel hareketler olan atomic salınım, yan zincir hareketleri, loop hareketleri 10^{-3} ns - 10^8 ns

aralığında; molekülün iskelet hareketleri olan heliks hareketleri, domain ve alt ünite hareketleri 1 ns – 10⁹ ns aralığında; büyük hareketler olan helikslerin tekrar oluşumu, moleküllerin bağlanıp-ayrılması ve molekülün katlanması-açılması hareketleri 10² ns – 10¹³ ns aralığında gerçekleşmektedir.

Bos taurus kas enolazının (*BtEno3*) toplamda 50 ns'lik simülasyonu sonrası molekülün termodinamik olarak dengede olan yapısı analiz edilmiştir. Molekülün dengeye ulaştığı zaman aralığının analizi için RMSD değerleri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3. 23a). RMSD değerleri simülasyon boyunca atomlar arası uzaklığın ortalama değişimini ifade etmektedir. Bu grafiğe göre yaklaşık olarak 50 ns'lik simülasyon sonrası molekül dengeye ulaştığı söylenebilmektedir ve simülasyon boyunca ortalama RMSD değeri 2,11 Å olarak hesaplanmıştır. Simülasyon boyunca her bir residünün salınımı analiz edilmiştir (Şekil 3. 23b). Grafiğe göre 30-60, 150-164, ve 250-270 arası bölgeler en fazla salınımı göstermiştir. Bu yapılar enzimin aktif bölgesi dışındadır ve katalitik halka bölgeleridir.



Şekil 3. 23 a) MD simülasyon boyunca *BtEno3* homoloji modelinin RMSD değeri grafiği
b) MD simülasyon boyunca *BtEno3* homoloji modelindeki her bir residünün atomik salınımı

3.6.2 Moleküler docking yöntemiyle *Bos taurus* kas enolaz enzimine substratının (2-Fosfoglisarat) yanaştırılması ve enzim-substrat kompleksinin moleküler dinamik yöntemler ile simülasyonu

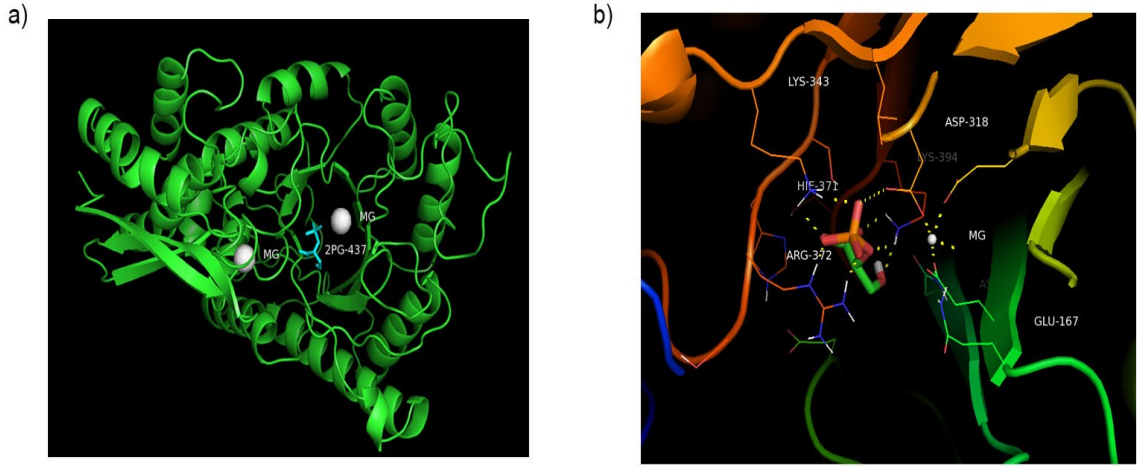
AutoDock4 programı vasıtasıyla enzimin aktif bölgesi hedeflenerek moleküler docking yaklaşımı ile substrat yanaştırılmıştır. Bu metotta 10 farklı yanaştırma yapılmıştır ve

bağlanma enerjilerine göre sıralanmıştır. Bağlanma afinitesi en yüksek olan konformasyon seçilerek analiz edilmiştir. Serbest bağlanma enerjisi moleküller arası, iç enerji ve torsiyonel serbest enerjisi ve bağ yapmayan sistemin toplam enerji değerleri göz önüne alınarak hesaplanır. Bu hesaplama göre substratın serbest bağlanma enerjisi -12,03 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3. 5). Bu hesaplama moleküler yanaştırma temellidir ve yaklaşık bir değer hesaplanır.

Çizelge 3. 5 On farklı yanaştırma konformasyonu arasında bağlanma afinitesi en yüksek olan substratın moleküler yanaştırma temelli serbest bağlanma enerji değerleri

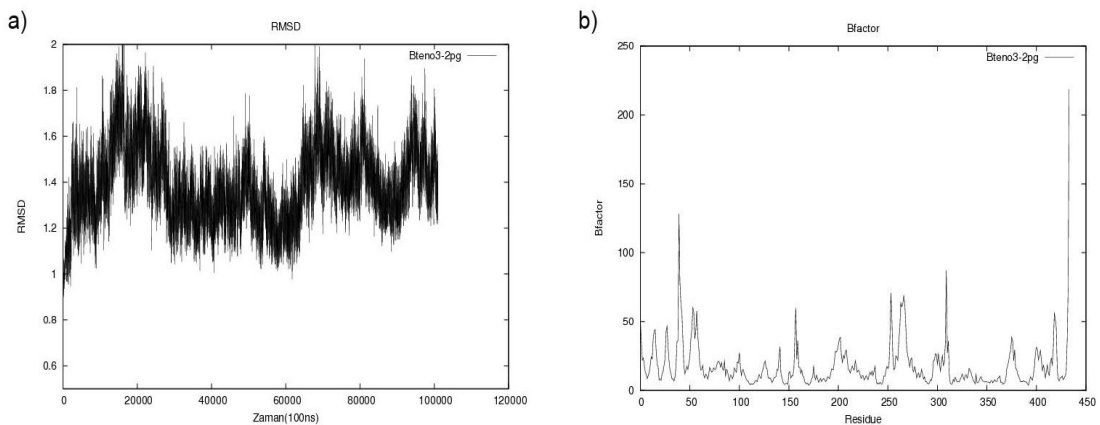
RMSD from reference structure	85.673 Å
Estimated Inhibition Constant, Ki	1.51 nM (nanomolar) [Temp = 298.15 K]
Estimated Free Energy of Binding	-12.03 kcal/mol [(1)+(2)+(3)-(4)]
(1) Final Intermolecular Energy	-13.52 kcal/mol
Moving Ligand-Fixed Receptor	+1.10 kcal/mol
vdW + Hbond + desolv Energy	-1.28 kcal/mol
Electrostatic Energy	+2.37 kcal/mol
Moving Ligand-Moving Receptor	-14.62 kcal/mol
vdW + Hbond + desolv Energy	-7.90 kcal/mol
Electrostatic Energy	-6.72 kcal/mol
(2) Final Total Internal Energy	-9.51 kcal/mol
Internal Energy Ligand	+0.16 kcal/mol
Internal Moving-Fixed Receptor	-10.45 kcal/mol
Internal Moving-Moving Receptor	+0.79 kcal/mol
(3) Torsional Free Energy	+1.49 kcal/mol
(4) Unbound System's Energy [(2)]	-9.51 kcal/mol

Yanaştırma sonrası substrat Lys343, Lys394, Arg372, His371 ile ve Mg^{+2} Asp318, Glu167 ile etkileşimde ve koordineli olduğu görülmektedir (Şekil 3. 24). Bu koordinasyonda yanlış etkileşimler olmamakla beraber substrat-ürün dönüşümü sırasındaki koordinasyonda eksiklikler olduğu görülmektedir.



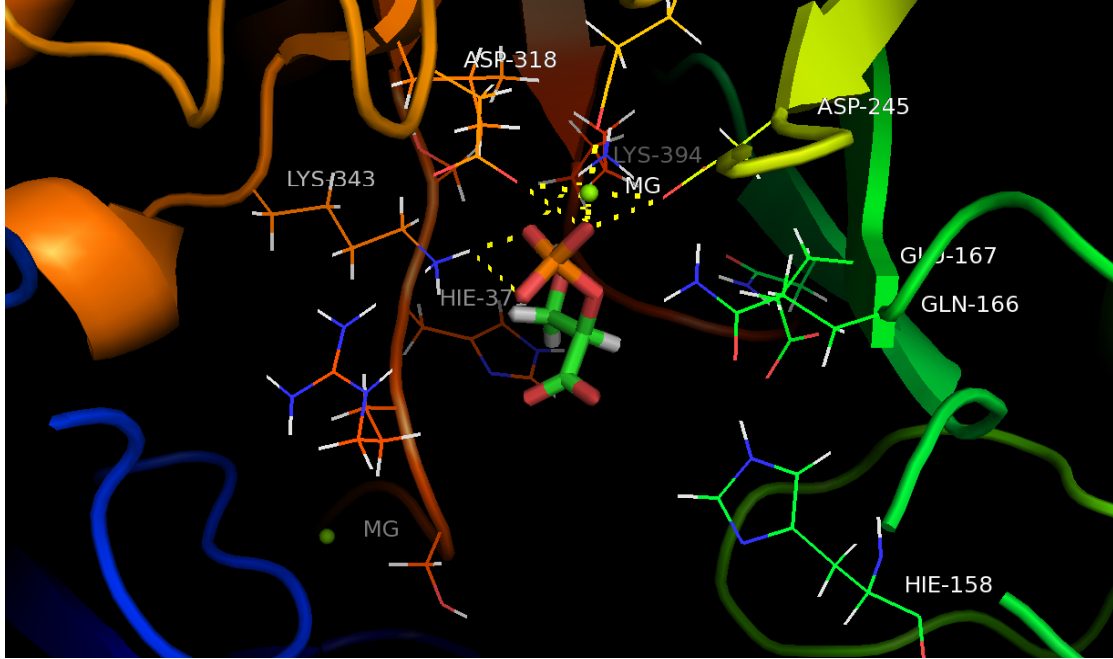
Şekil 3. 24 Moleküler yanaştırma sonrası *Bos taurus* kas enolaz enzimi-substrat (2-Fosfoglisirik asit) etkileşimleri

Moleküler yanaştırma sonrası kompleksin denge haline gelmesine, doğru etkileşimleri gerçekleştirmek ve bu etkileşimlerin analizi içim moleküler dinamik yöntemler ile 100 ns boyunca simule edilmiştir. Yapılan analiz sonucu RMSD grafiğine bakıldığında enzim substrat kompleksinin termodinamik olarak dengeye ulaştığı ve atomların ortalama yer değiştirmesi 1.38531 Å olarak söylenebilmektedir (Şekil 3. 25a). Atomik salınım grafiği analiz edildiğinde her bir residünün substrat yanaştırılması sonucu büyük değişimler gözlemlenmemiştir (Şekil 3. 25b). Substrat bağlı olmadan yapılan analiz ile kıyaslandığında aynı bölgelerin hareketli olduğu fakat bu hareketleri daha küçük olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 3. 25 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3-2pg* kompleksinin RMSD değeri grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3-2pg* kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı

100 ns simülasyon sonrası substrat-enzim etkileşimi analiz edildiğinde substrat ile HIS158, GLN166, LYS343, HIS371, ARG372, SER373 ve LYS394 residuleri ile etkileşimde olduğu görülmektedir. Dehidrasyon basamağı için Mg^{+2} ASP245, GLU293, ASP318 ile koordineli olduğu görülmektedir (Şekil 3. 26). Bu etkileşimler deneysel olarak ortaya çıkarılmış etkileşimler ile bire bir örtüşmektedir.



Şekil 3. 26 100 ns simülasyon sonrası *Bos taurus* kas enolaz-substrat (2-fosfoglisarat) etkileşimleri

3.6.3 Kumarin türevleri-*Bos taurus* kas enolaz enzim komplekslerinin *in silico* analizleri

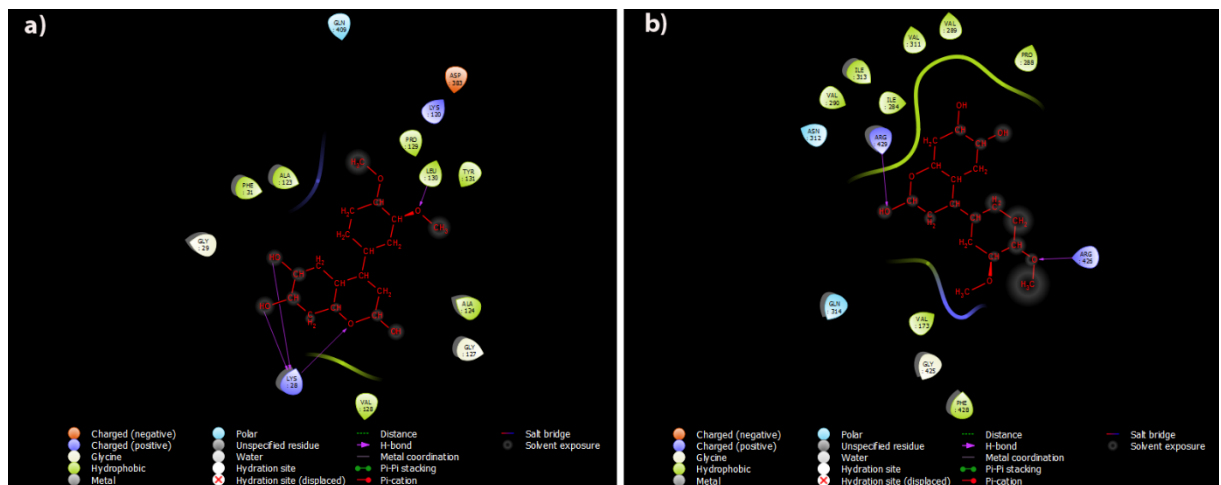
3.6.3.1 Moleküler docking yöntemiyle *Bos taurus* kas enolazına kumarin türevlerinin yanaştırılması

Seçilmiş olan kumarin türevleri olan K8, K9 ve K21 ligandlarının sırasıyla enzime moleküler docking yaklaşımı ile yanaştırılmıştır. Bağlanma enerjileri baz alınarak afinitesi en yüksek olan iki farklı pozisyon analiz edilmiştir. Moleküler docking dayalı hesaplanan bağlanma enerjileri karşılaştırıldığında, bileşiklerin tümünün bağlanma enerjilerinin birbirine yakın olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 3. 6).

Çizelge 3. 6 Moleküler yanaştırma sonrası K8, K9 and K21 bileşiklerinin serbest bağlanma enerjisi

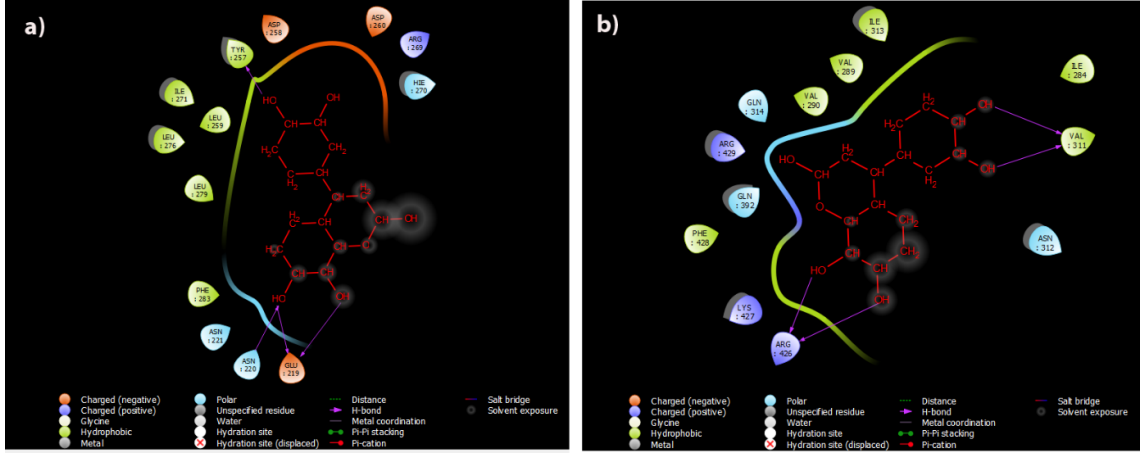
Bileşikler	K8-1	K8-2	K9-1	K9-2	K21-1	K21-2
Bağlanma enerjisi	-4,97 kcal/mol	-4,13 kcal/mol	-5,3 kcal/mol	-5,22 kcal/mol	-5.28 kcal/mol	-5.08 kcal/mol

Enolase-kumarin etkileşiminin 2D diyagramı Maestro arayüzündeki Ligand Interaction (Schrödinger Inc., www.schrodinger.com) komut dosyası kullanılarak oluşturulmuştur. K8 bileşiğinin bağlandığı ilk pozisyonda, bir hidrofobik boşluk içine yerleştirilmiş ve Lys28 ve Leu130 ile bir hidrojen bağı oluşturduğu ortaya çıkmaktadır. Bileşik ve enolaz arasındaki bağı kuvveti yaptığı hidrojen bağları ile orantılıdır ve hidrofobik boşluklardaki bileşikler daha stabil kalabilir [104]. İkinci pozisyonda K8, Arg426 ve Arg429 ile bir hidrojen bağı oluşturur ve bileşik bir hidrofobik boşluk içine bağlanmıştır. (Şekil 3. 27).



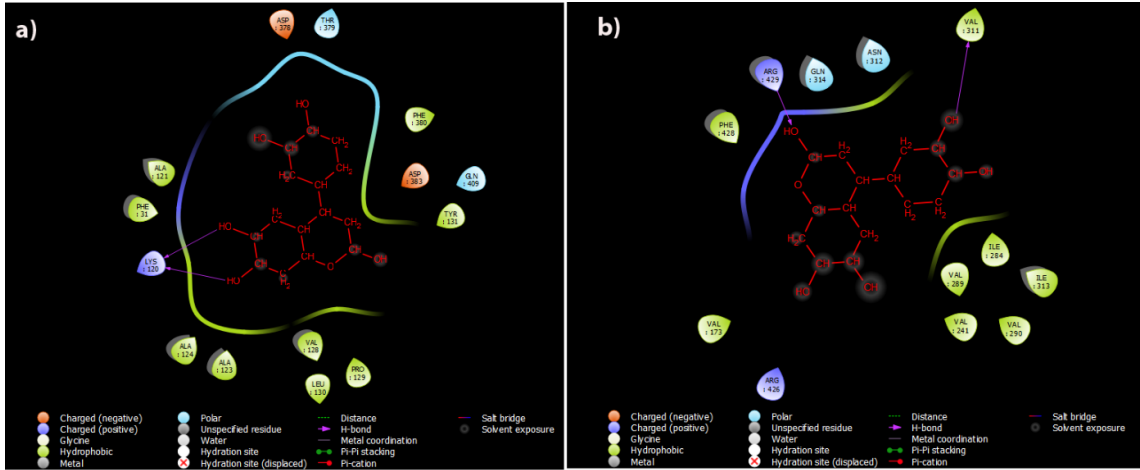
Şekil 3. 27 K8- *Bos taurus* kas enolazı etkileşiminin tahmini 2D diyagramı a) Pozisyon 1 b) Pozisyon 2

Enolase birinci pozisyonda bağlı olan Glu219 ve Asn220 ile pozisyon 2'de ise Val311 ve Arg426 ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. K9 birinci pozisyonda hidrofobik residüler arasında bulunur fakat ikinci pozisyonda, residülerin çoğunlukla polar ve yüklü yan grupların olduğu bir boşlukta bulunur (Şekil 3. 28).



Şekil 3. 28 K9- *Bos taurus* kas enolazı etkileşiminin tahmini 2D diyagramı a) Pozisyon 1
b) Pozisyon 2

K21, birinci pozisyonda Lys120 ve ikinci pozisyonda Val311 ve Arg429 ile bir hidrojen bağı oluşturmuştur. İlk boşluk hidrofobiktir, ancak ikinci pozisyonda çoğunlukla polar ve yüklü residülerin bulunduğu bir oyukta bağlı olduğu analiz edilmiştir (Şekil 3. 29).



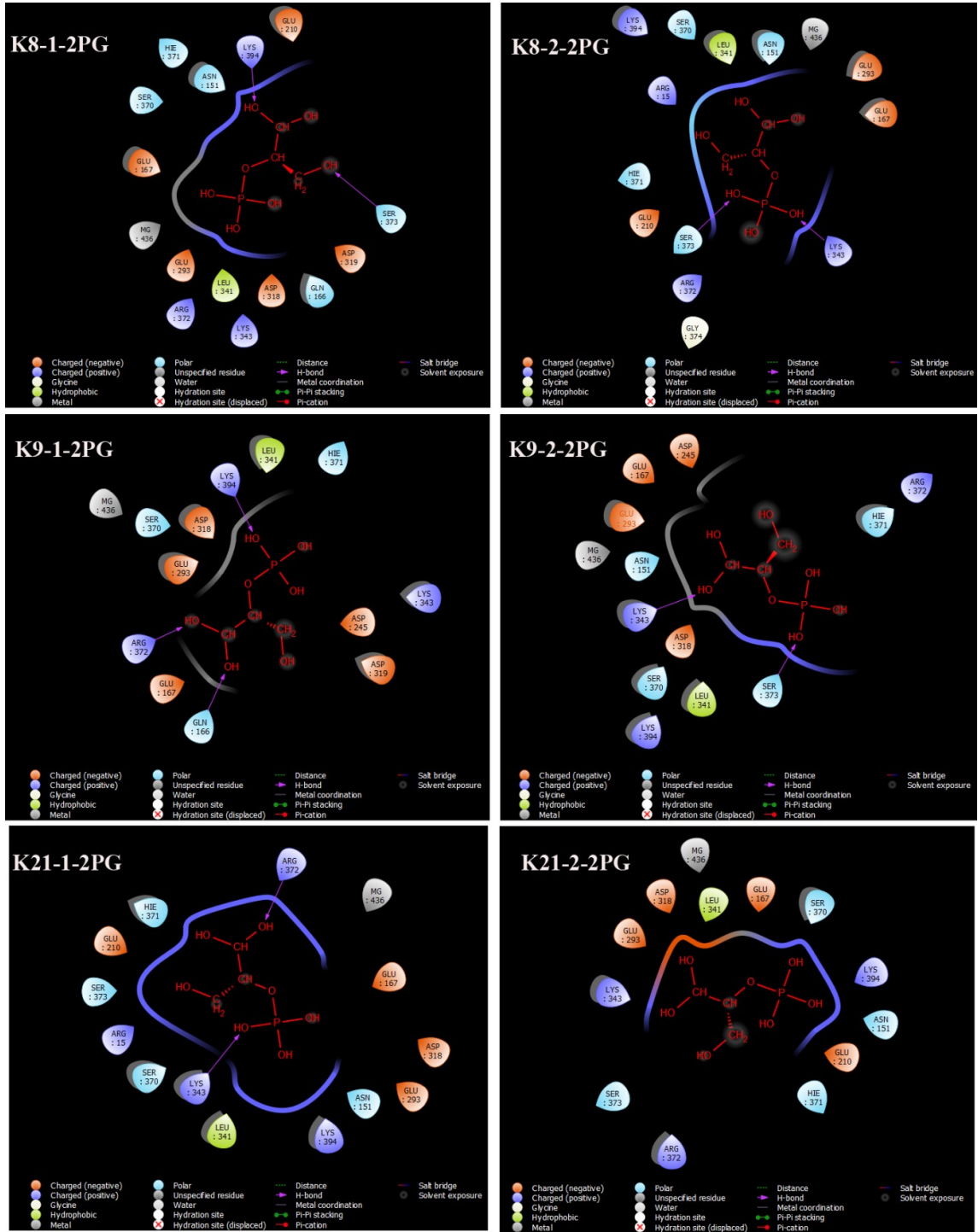
Şekil 3. 29 K21- *Bos taurus* kas enolazı etkileşiminin tahmini 2D diyagramı a) Pozisyon 1
b) Pozisyon 2

Enolase-kumarin kompleksleri moleküler dinamikler yöntemleri kullanılarak 50 ns boyunca simüle edilmiştir ve sonrasında substrat (2PG) on farklı pozisyonda enolazın aktif bölgesine yanaştırılmıştır. Yüksek bağlanma afinitesine sahip konformasyonlar seçilerek serbest bağlanma enerjileri karşılaştırılmıştır (Çizelge 3. 7). Substratın enzim-kumarin komplekslerine tahmini serbest bağlanma enerjileri değişkenlik göstermiştir ve bağlanma afiniteleri K8-1 <K9-1 <K8-2 <K21-1 <K9-2 <K21-2 olarak sıralanmıştır. Enolase-2PG etkileşimi 2D diyagramı analiz edildiğinde Ser373, Lys394, Lys343, Arg372

ve Gln166 katalitik residüler 2PG ile hidrojen bağları oluşturmuştur (Şekil 3. 30). Önceki çalışmalarda 2PG-PEP'in dönüştürülmesinden sorumlu residüler ampirik olarak belirlenmiştir. 2PG substrat bağlanma residüleri, His158 (mayada His159), Gln166 (mayada Gln167), Lys343 (mayada Lys345), His371 (mayada His373), Arg372 (mayada Arg374), Ser373 (mayada Ser375) ve Lys394(mayada Lys396) olarak belirlenmiştir [60], [62], [97], [98], [100], [101].

Çizelge 3. 7 Substratın (2PG) enzim-kumarin komplekslerine tahmini bağlanma enerjileri

Substrat 2PG	K8-1	K8-2	K9-1	K9-2	K21-1	K21-2
Bağlanma enerjisi	-7,06 kcal/mol	-9,22 kcal/mol	-8,24 kcal/mol	-11,21 kcal/mol	-10,47 kcal/mol	-11,96 kcal/mol



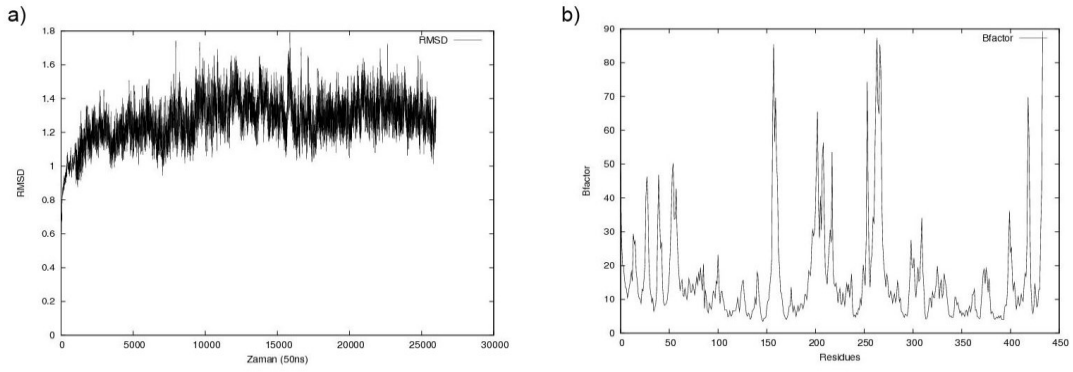
Şekil 3. 30 Enolase-kumarin-2PG komplekslerindeki substrat-enolase etkileşimlerinin 2D diagram gösterimi

3.6.3.2 Moleküler dinamik yöntemlerle *Bos taurus* kas enolaz enzim-kumarin türevleri komplekslerinin simülasyonları

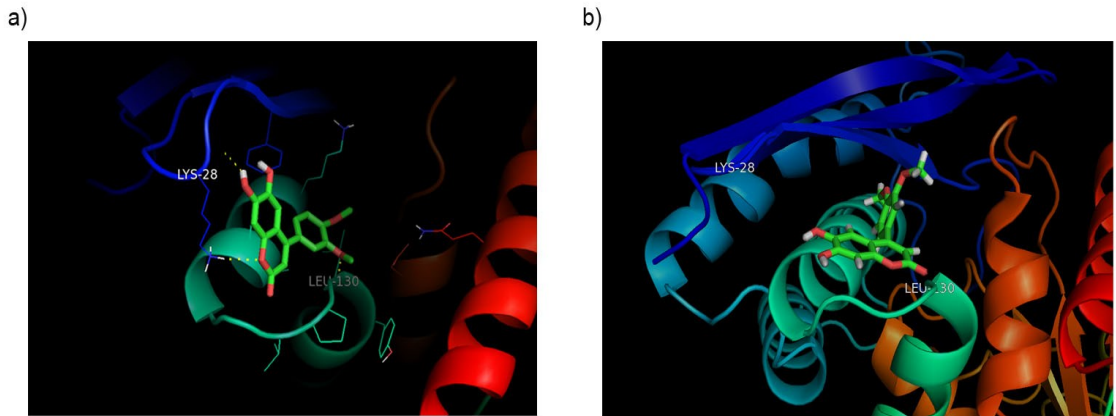
Öncelikle termodinamik olarak bağlanma enerjisi düşük farklı iki konumdaki kompleksler baz alınarak 50 ns boyunca simule edilmiştir. Sonrasında komplekse

substrat dock edilerek 100 ns daha simule edilerek toplamda 150 ns simülasyon gerçekleştirilmiştir.

K8 kumarin türevi için bir numaralı konumda iken 50 ns simülasyon sonrası molekülün dengeye ulaştığı RMSD grafiğinden analiz edilebilmektedir ve ortalama RMSD 1.2715 Å olarak hesaplanmıştır (Şekil 3. 31a). Her bir residünün atomik salınımı ligand bağlanmadan önceki durumu ile kıyaslandığında genel olarak molekül daha rigid hale geldiği ve ligandın enzimin konformasyonunda değişikliğe sebep olmadığı söylenebilmektedir (Şekil 3. 31b). Moleküler yanaştırma ve öncesi K8 türevinin konumu analiz edildiğinde büyük bir yerdeğiştirme gözlemlenmemiştir (Şekil 3. 32).



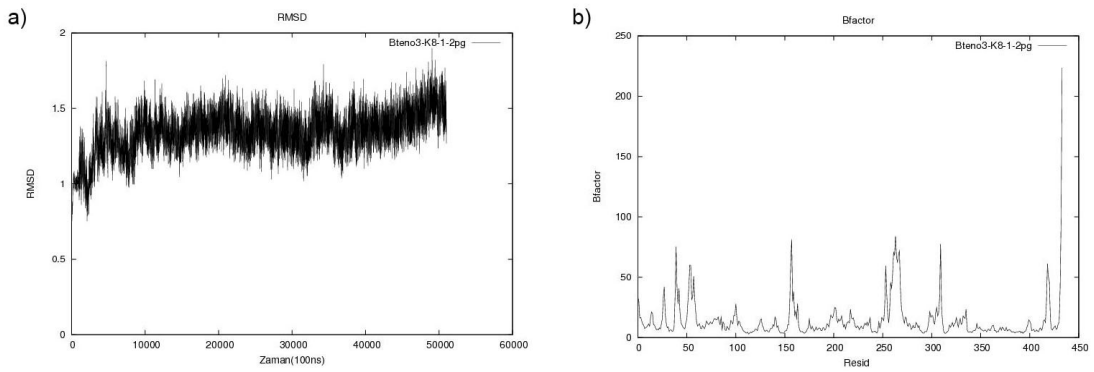
Şekil 3. 31 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K8-1 (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değeri grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K8-1 kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı



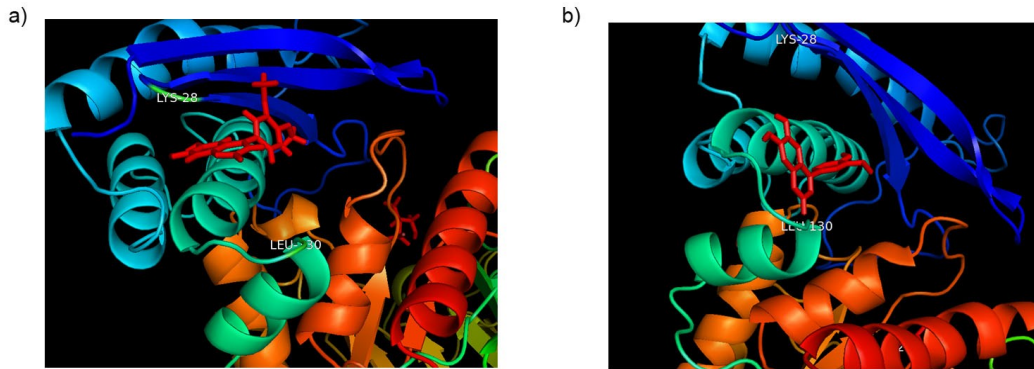
Şekil 3. 32 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3*-K8-1 (1 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K8-1 etkileşimi

Kumarin türevi olan K8 ligandı moleküler docking yaklaşımı ile enzime yanaştırıldıktan sonra 50 ns simülasyon sonrası substratı yanaştırılıp 100 ns boyunca simule edilmiştir.

Yapılan simülasyon sonrası RMSD grafiği çizilmiştir ve ortalama değer 1,3414 olarak hesaplanmıştır. Bfactor grafiği analiz edildiğinde residülerin atomik salınımlarında farklılık olmadığı söylenebilmektedir (Şekil 3. 33). 100 ns sonunda molekülün son koordinatları analiz edildiğinde K8 türevinin ilk bağlandığı yerde stabil kaldığı görülmektedir (Şekil 3. 34).



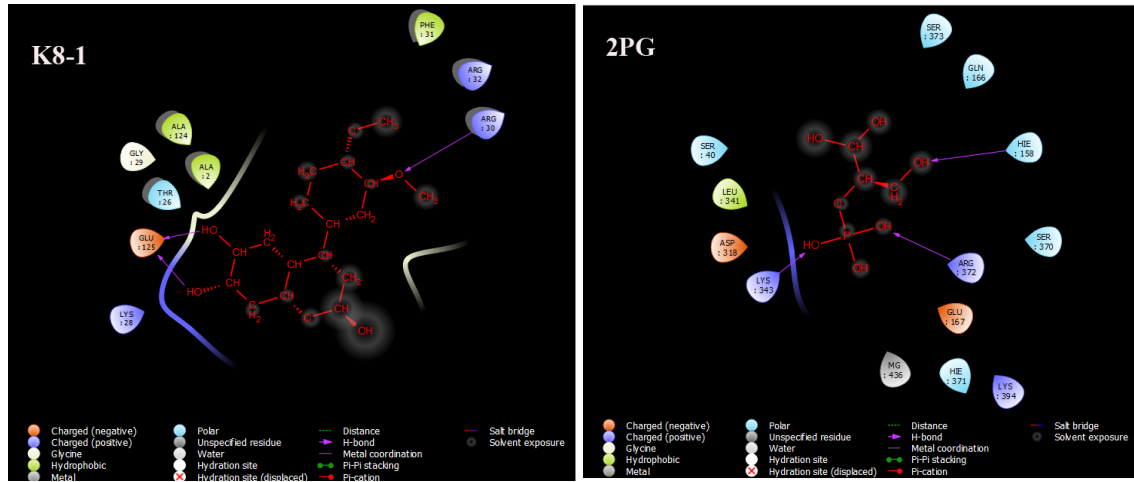
Şekil 3. 33 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-1-2pg* (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değeri grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-1-2pg* kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı



Şekil 3. 34 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3-K8-1-2pg* (1 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-1-2pg* etkileşimi

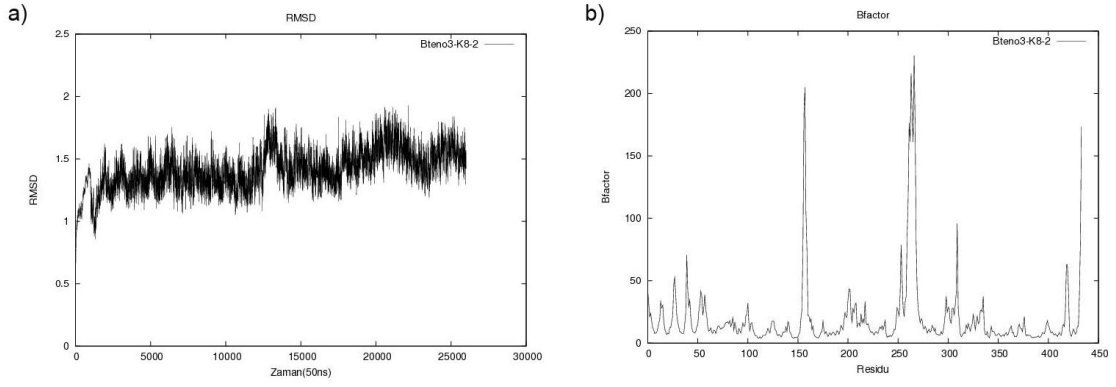
Bteno3-K8-1-2pg 2D ligand etkileşim diagramından simülasyon öncesi ile karşılaştırıldığında K8 (pozisyon 1) Glu125 ve Arg30 ile bir hidrojen bağı oluşturduğu analiz edilmektedir (Şekil 3. 35). K8 hidrofobik bir boşluktan yüklü residülerin yer aldığı bir oyuğa hareket etmiştir ve bu sebeple böylece etkileşimi enolaz ile olan bağı güçlenmiştir. Substrat etkileşimi aynı diyagramdan analiz edildiğinde, fosfat grubu hidrojeni Lys343 ve Arg372 ile bağ yapmıştır ve ayrıca karboksil grubu His158 ile

etkileşmektedir (Şekil 3. 35). Bu etkileşimler, ampirik olarak incelenen etkileşimlerle uyumludur.

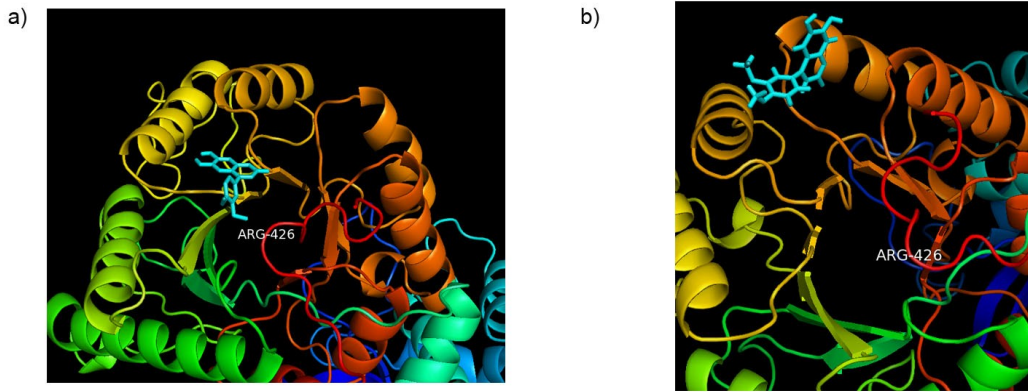


Şekil 3. 35 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K8-1-2pg etkileşiminin 2D diagram gösterimi

Kumarin türevi K8 ligandının 2 numaralı konumunda iken aynı assay takip edilmiştir. Öncelikle 50 ns simüle edildikten sonra substratı 2PG yanaştırılıp 100 ns boyunca simüle edilmiştir. Ortalama RMSD değeri 1,41 Å olarak hesaplanmıştır ve grafik analiz edildiğinde molekülün dengeye ulaştığı söylenebilmektedir (Şekil 3. 36a). Her bir residünün atomik salınımı ligandın 1 numaralı konumu ile kıyaslandığında oynak bölgelerin benzer olduğu fakat salınımın arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3. 36b). Atomik salınımların arttığı bölgeler 2. ve 3. katalitik bölgeler olarak söylenebilmektedir. 50 ns simülasyon sonrası K8 kumarin türevinin konumu analiz edildiğin ilk aşamada ARG426 ile etkileşim halinde iken sonrası oyğun içine doğru yer değiştirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3. 37). Bu yer değişikliği 250-280 arası loop bölgesinin daha fazla atomik salınımına neden olmuş sonucu çıkarılabilmektedir.

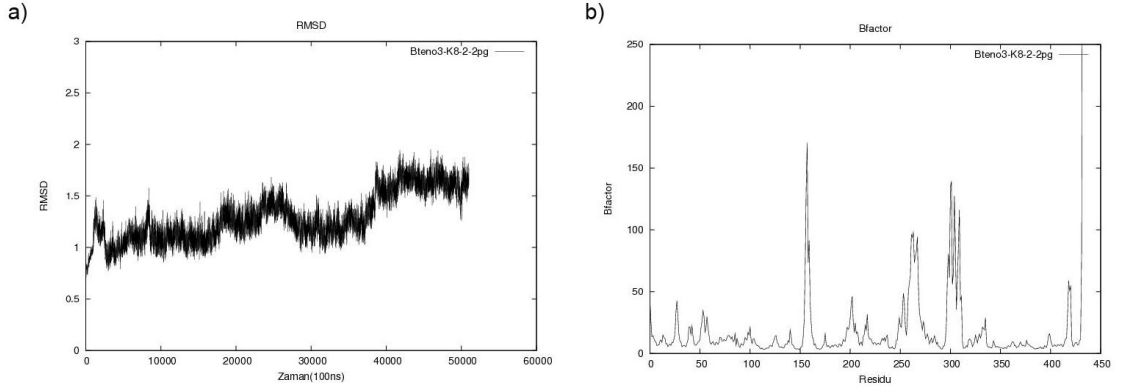


Şekil 3. 36 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-2* (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-2* kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı

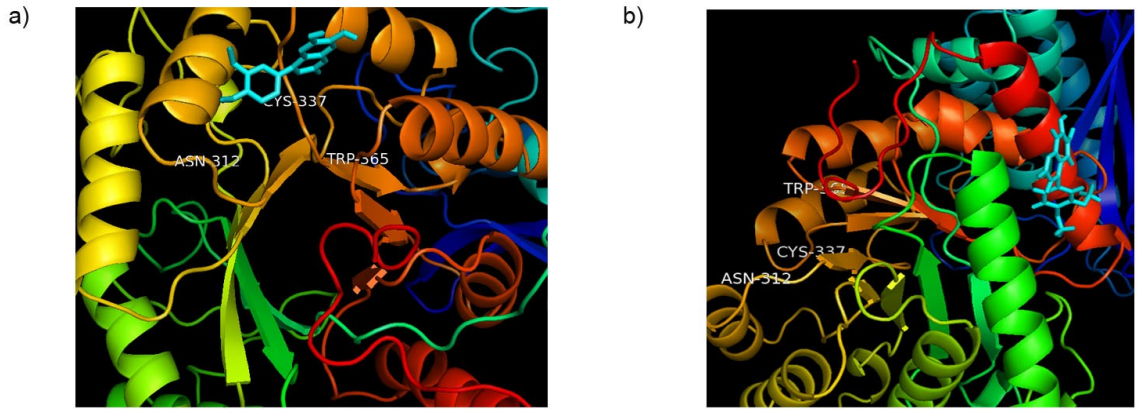


Şekil 3. 37 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3-K8-2* (2 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-2* etkileşimi

Enzime-ligand-substrat kompleksinin 100 ns simülasyonu sonrasında çizilen RMSD grafiğine göre molekül termodinamik olarak dengeye ulaşmadığı görülmektedir ve ortalama değer 1.28 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3. 38a). 80 ns sonrasında RMSD değerinin arttığı görülmektedir ve simülasyon devam ettirildiği takdirde dengeye ulaşacağı görülebilecektir. Her bir residünün atomik salınımı grafiği analiz edildiğinde kumarın türevi olan K8 ligandı 2 numaralı konumda iken atomlarının salınımlarına etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3. 38b). Ancak katalitik bölge haricinde olan 300-320 residüleri arası bölgede salınım artmıştır ve RMSD grafiğindeki değişkenliğin sebebi olarak söylenebilmektedir. 100 ns sonrası ligandı konumu incelendiğinde molekülün yüzeyinde gezindiği görülmektedir ve bu durum enzimin aktif bölgesine etkisinin olmayacağı yorumlanabilmektedir (Şekil 3. 39).

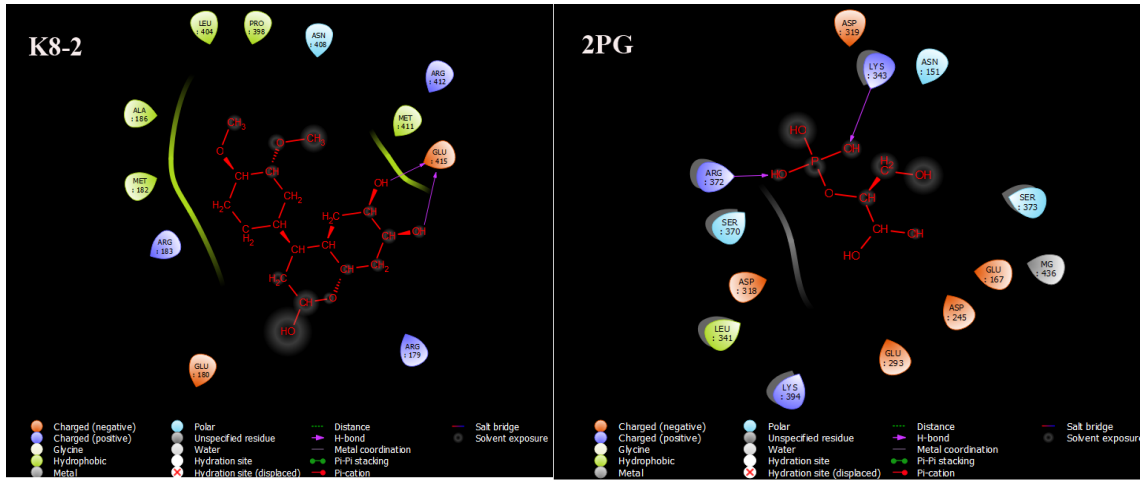


Şekil 3. 38 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-2-2pg* (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değeri grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-2-2pg* kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı



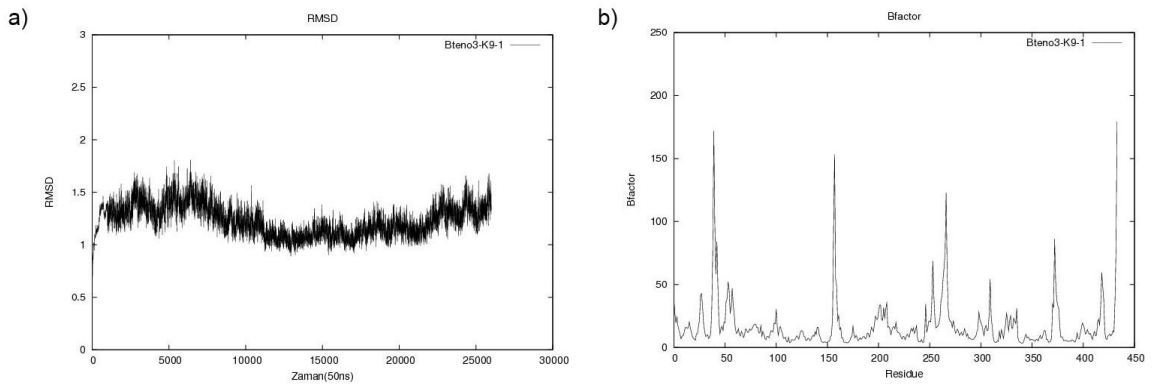
Şekil 3. 39 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3-K8-2-2pg* (2 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3-K8-2-2pg* etkileşimi

100 ns'den sonra ligandın pozisyonu (pozisyon 2) analiz edildiğinde K8 molekülün yüzeyi üzerinde gezindiği ve enzimin enzimin aktif bölgesi üzerinde bir etkisi olmayacağı yorumlanabilir. Bu nedenle, 2D ligand etkileşim şemasındaki tüm etkileşimler değişmiştir ve sadece Glu415 ile hidrojen bağı yapmıştır. Substratın fosfat grubu ile Lys343 ve Arg372 residüleri hidrojen bağları oluşturduğu görülmektedir. (Şekil 3. 40).

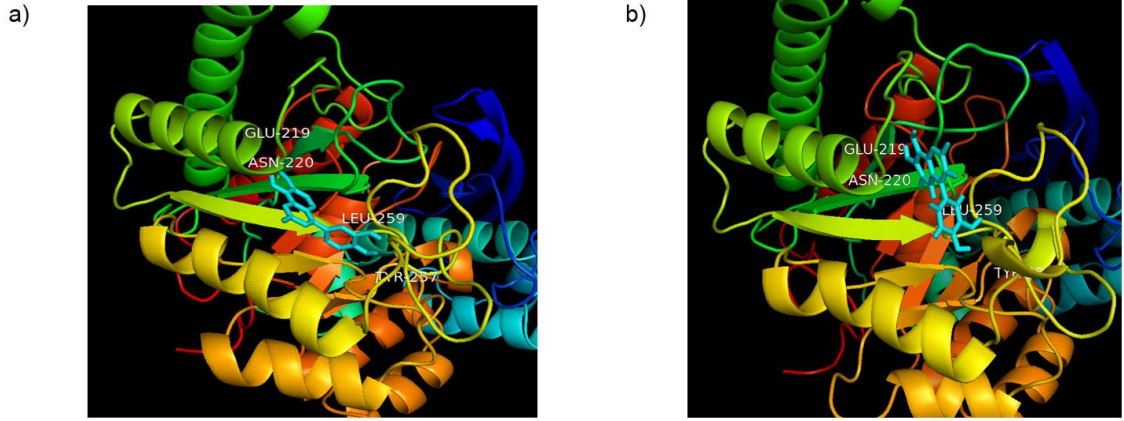


Şekil 3. 40 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K8-2-2pg etkileşiminin 2D diagram gösterimi

Kumarin türevi olan K9 ligandı için termodinamik olarak düşük enerjili birinci konumda moleküler docking metoduyla yanaştırıldıktan sonra sistem 50 ns simule edilmiştir. Çizilen RMSD grafiğine göre sistemin dengeye ulaştığı görülmektedir ve ortalama değer 1.23 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3. 41a). Atomik salınım grafiğine göre hareketli bölgelerinin ligand bağlandıktan sonra farklılaşmadığı görülmüştür (Şekil 3. 41b). Bağlanan ligandın 50 ns sonraki konumu analiz edildiğinde konumun değişmediği ve bağlandığı oyukta stabil kaldığı görülmüştür (Şekil 3. 42).

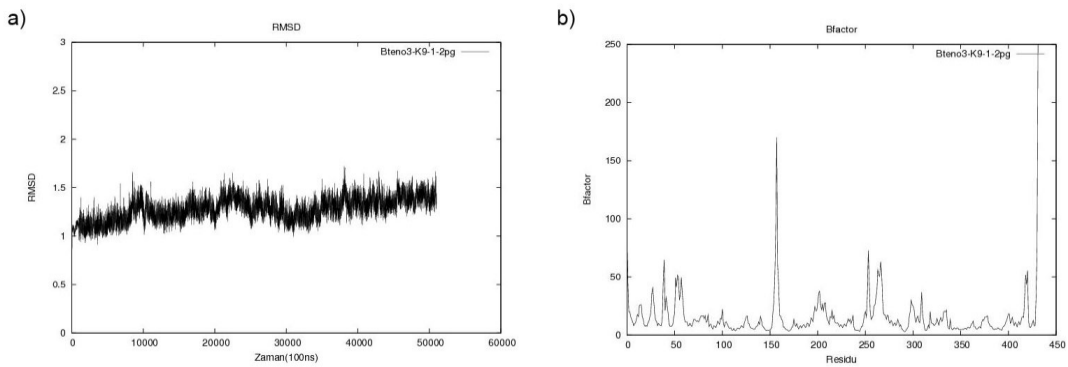


Şekil 3. 41 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K9-1 (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K9-1 kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı

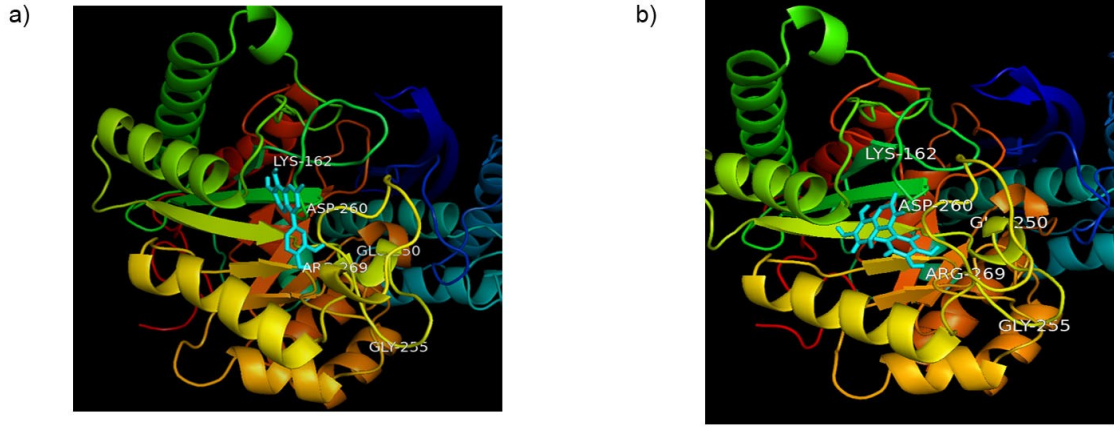


Şekil 3. 42 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3-K9-1* (1 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3-K9-1* etkileşimi

Enzim-ligand-substrat kompleksinin 100 ns simülasyonu analiz edildiğinde molekülün dengeye ulaştığı görülmektedir (Şekil 3. 43a). Enzime bağlı ligand ve substrat 100 ns boyunca enzimin konformasyonunda ciddi değişiklikler yapmadığı bfactor grafiği analiz edildiğinde söylenebilmektedir (Şekil 3. 43b). Moleküler docking metodu ile enzime yanaştırılan ligand simülasyon sonrası bağlandığı konumda stabil kaldığı ve molekülün 3-boyutlu yapısında değişikliği sebep olmadığı görülmüştür (Şekil 3. 44).

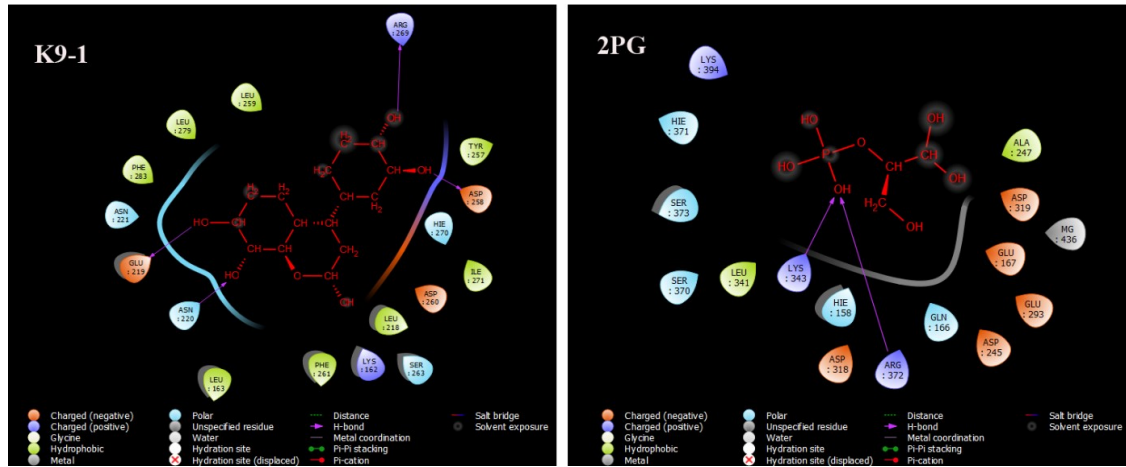


Şekil 3. 43 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K9-1-2pg* (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K9-1-2pg* kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı



Şekil 3. 44 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3*-K9-1-2pg (1 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K9-1-2pg etkileşimi

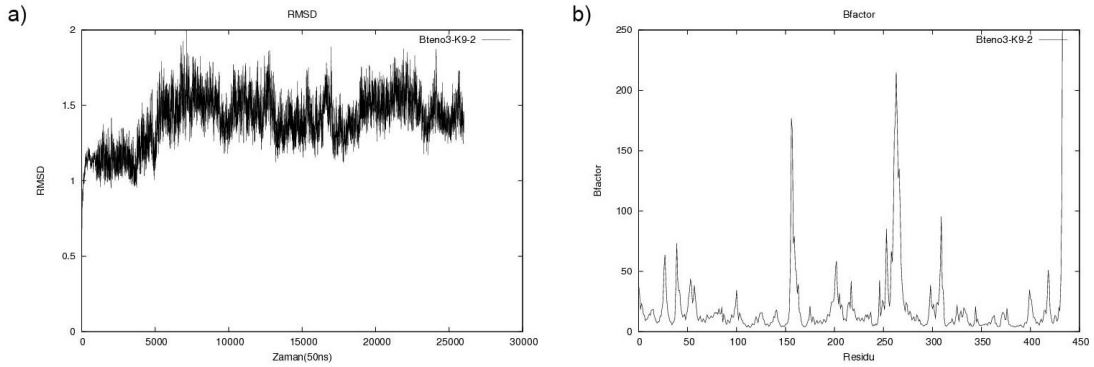
Bteno3-K9-1-2pg kompleksindeki K9 bileşiğinin (pozisyon 1) 2D ligand etkileşim diyagramından, hidrojen bağlarının simülasyon öncesi pozisyonunu koruduğu, Glu219, Glu220 ve Arg269 olarak stabil olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak, substratın fosfat grubu ve Lys343 ve Arg372'nin residüleri ile hidrojen bağlarının stabil kaldığı görülmüştür (Şekil 3. 45).



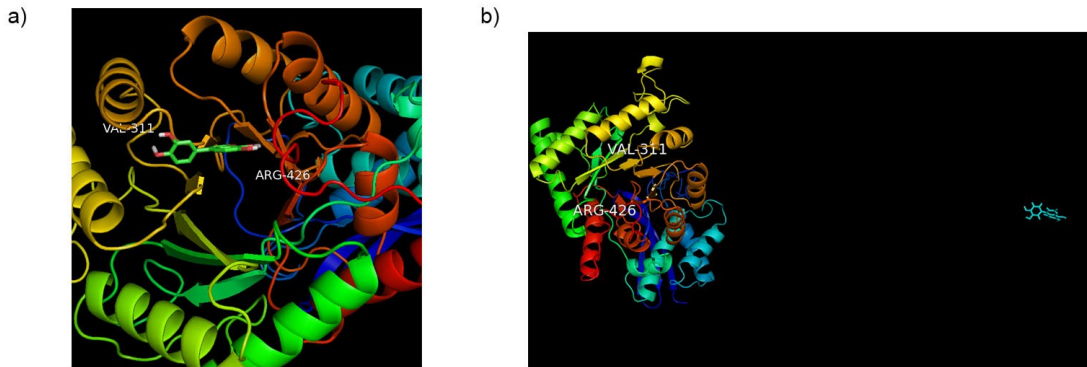
Şekil 3. 45 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K9-1-2pg etkileşiminin 2D diagram gösterimi

Kumarin türevi olan K9 ligandının 2. konumundaki 50 ns simülasyonu sonrası yapılan analizde molekülün termodinamik olarak dengeye ulaştığı ve ortalama RMSD değeri 1.40 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3. 46a). Atomik salınım grafiğine bakıldığında 2. Ve 3. katalitik halkada salınım arttığı görülmektedir (Şekil 3. 46b). MD simülasyon sonrası ligandın konumu incelendiğinde ligandın tamamen bağlandığı yerden ayrıldığı görülmektedir (Şekil 3. 47). RMSD değerinin ve atomik salınımın yüksek olması ligandın

molekülün yüzeyinde gezinmesi bir süre sonra enzimden ayrılmasından kaynaklı olduğu görülmektedir. Bu sebeple bu ligand için enzim-ligand-substrat kompleksi oluşturulup simule edilmemiştir.

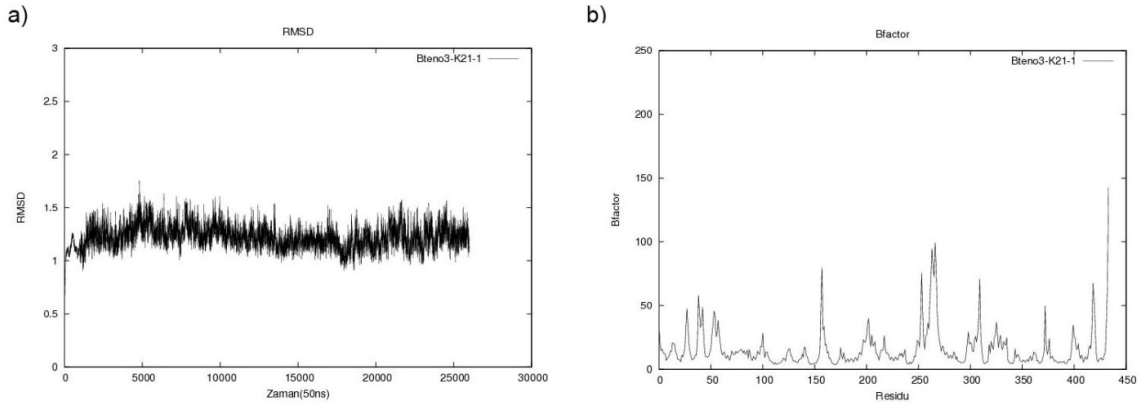


Şekil 3. 46 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K9-2* (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3-K9-2* kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı

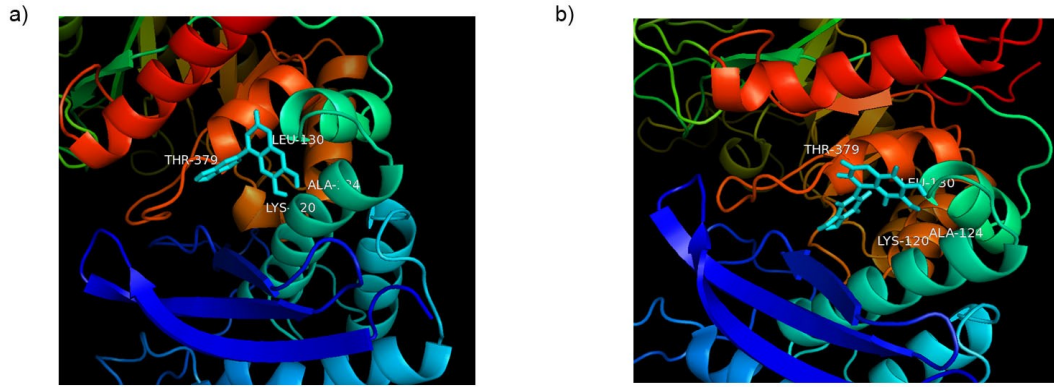


Şekil 3. 47 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3-K9-2* (2 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3-K9-2* etkileşimi

Kumarin türevi olan K21 ligandı moleküler docking yaklaşımı ile enzime yanaştırıldıktan sonra 1 numaralı konumda iken 50 ns simule edilmiştir. Simülasyon sonrası sonuçlar analiz edildiğinde RMSD grafiğine göre molekül simülasyon sonrası termodinamik olarak dengeye ulaştığı söylenebilmektedir (Şekil 3. 48a). Ligand bağlandıktan sonra atomik salınım analizinde ise loop bölgeleri harici ayırt edici bir farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 3. 48b). Ligandın ilk bağlandığı konum ile 50 ns simülasyon sonrası konumu kıyaslandığında bağlandığı oyukta stabil kaldığı görülmektedir (Şekil 3. 49). K21 ligandı 1 numaralı konumda stabil kaldığı için düşük ortalama RMSD 1.174 değeri hesaplanmıştır ve katalitik halklardaki oynaklık minimuma inmiştir.

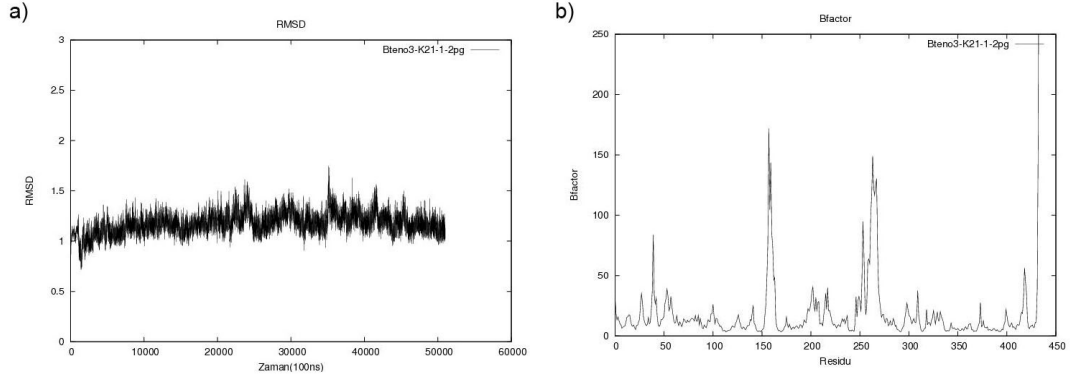


Şekil 3. 48 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-1 (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-1 kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı

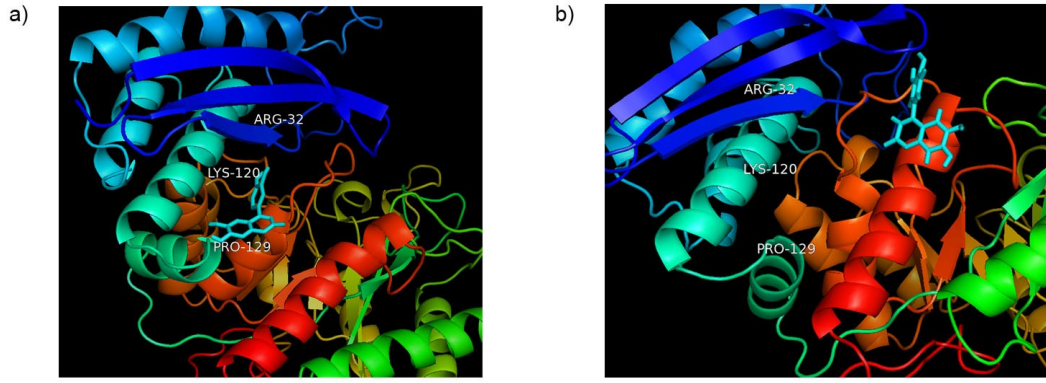


Şekil 3. 49 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3*-K21-1 (1 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-1 etkileşimi

Kumarin türevi olan K21 ligandı 1 numaralı konumda iken 50 ns simule edildikten sonra substratı olan 2PG enzime yanaştırılıp 100 ns boyunca simule edilmiştir. Simülasyon sonrası RMSD grafiği ve atomik salınım grafikleri analiz edildiğinde molekülün dengede olduğu ve loop bölgeleri dışında enzim üzerinde farklılık göstermediği açığa çıkmaktadır (Şekil 3. 50). Ayrıca K21 ligandının 1 numaralı konumda simülasyon önce bağlandığı konumu ile sonrası analizinde ligandın sadece bağlandığı oyukta yer değiştirdiği görülmektedir (Şekil 3. 51).

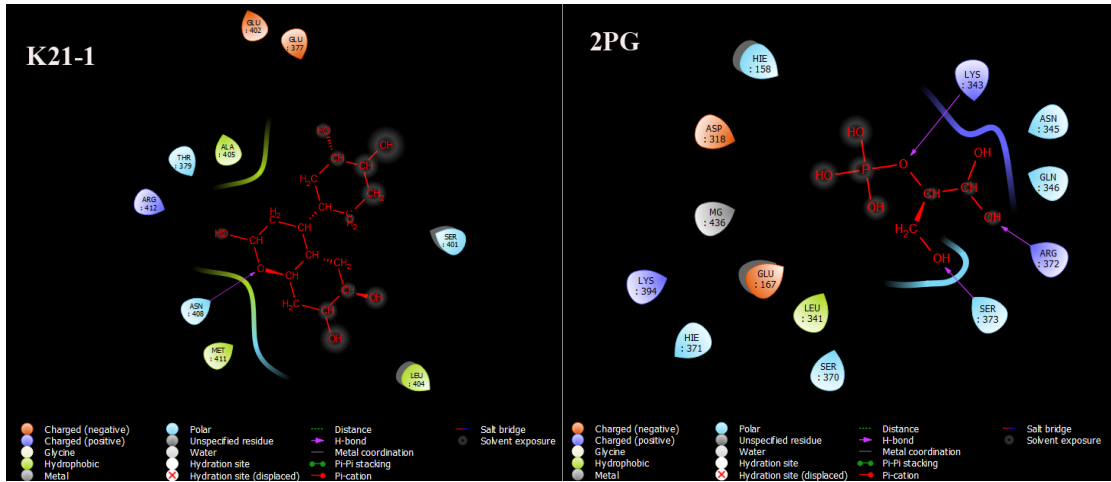


Şekil 3. 50 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-1-2pg (1 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-1-2pg kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı



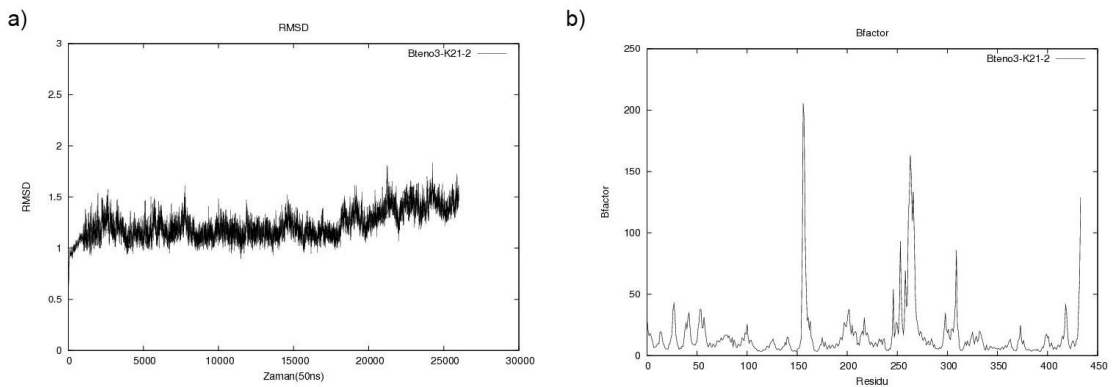
Şekil 3. 51 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3*-K21-1-2pg (1 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-1-2pg etkileşimi

Bteno3-K21-1-2pg kompleksindeki etkileşimlerin 2D diyagramı analiz edildiğinde, K21'in (pozisyon 1) enzim ile hidrojen bağlarının sayısını azalttığını ve Asn408 ile sadece zayıf bağ oluşturduğunu göstermektedir. K21, pozisyonunu başlangıç pozisyonundan değiştirmede ve hidrofobik boşlukta sabit kaldığı görülmektedir. Substrat simülasyondan sonra Lys343, Arg372 ve Ser373 residüleri ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır (Şekil 3. 52).

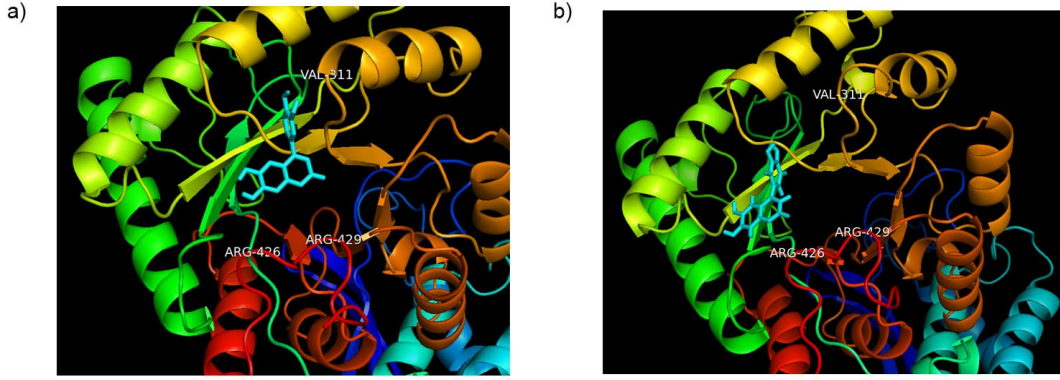


Şekil 3. 52 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-1-2pg etkileşiminin 2D diagram gösterimi

Kumarin türevi olan K21 ligandı moleküler docking yaklaşımı ile yanaştırıldıktan sonra termodinamik olarak uygun bağlanabilen ikinci konumu sonrası 50 ns simule edilmiştir. Simülasyon sonrası RMSD grafiğine göre 30 ns süresince dengede olduğu fakat sonrasında RMSD değeri yükselmiştir. Çizilen bfactor grafiğine göre atomik salınımı kıyaslandığında 2. Katalitik halka olan bölgede oynaklığın arttığı görülmüştür (Şekil 3. 53). Bağlanan ligandın ilk konumu ile 50ns sonraki konumu kıyaslandığında halen mevcut oyuk için olduğu ve stabil kaldığı görülmektedir (Şekil 3. 54).

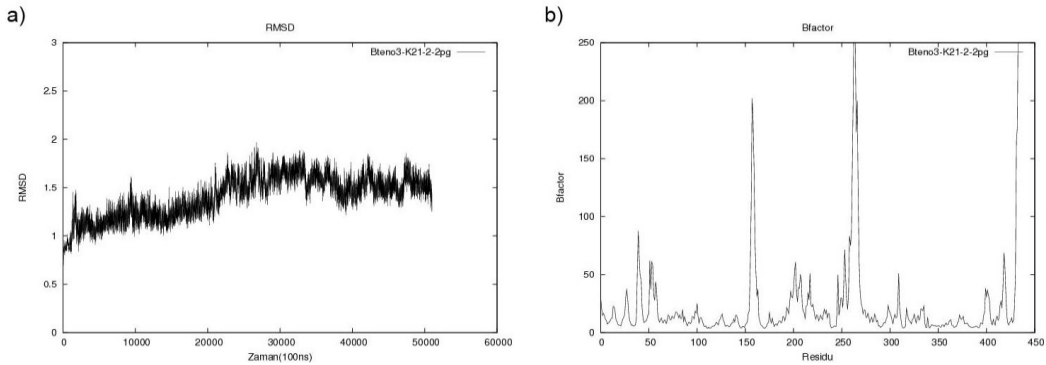


Şekil 3. 53 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-2 (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değer grafiği b) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-2 kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı

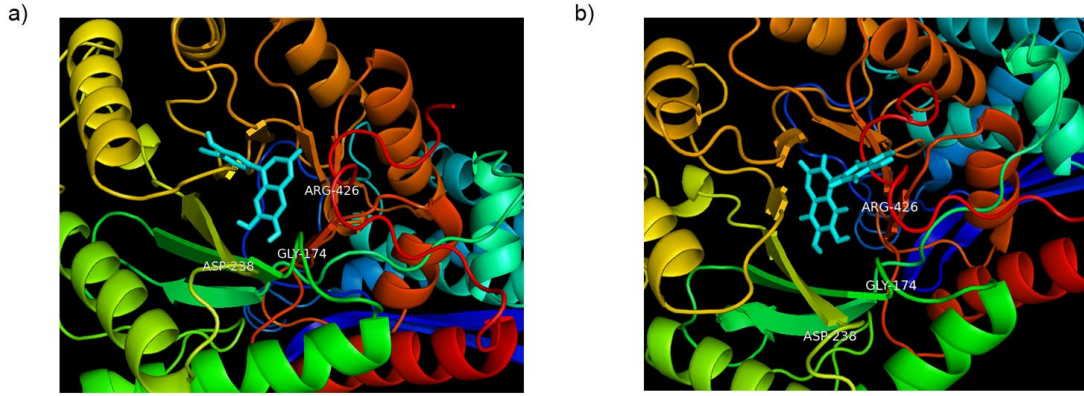


Şekil 3. 54 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3*-K21-2 (2 numaralı konum) b) 50 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-2 etkileşimi

Kumarin türevi K21 ligandı enzime yanaştırılıp 50 ns simülasyonu sonrası enzimin substratı olan 2PG moleküler docking yaklaşımı ile yanaştırılmıştır ve 100ns boyunca simule edilmiştir. RMSD grafiği analiz edildiğinde molekül 60 ns sonrası termodinamik olarak dengeye ulaştığı görülmektedir (Şekil 3. 55a). Atomik salınımı miktarlarını gösteren bfactor grafiğine bakıldığında 250-270 arası loop bölgesi K8 ve K9 ligandına göre kıyaslandığında daha fazla salınım göstermiştir (Şekil 3. 55b). Ligandın bağlanmış olduğu konum simülasyon öncesine göre kıyaslandığında yeri sabit kaldığı fakat bağlandığı oyğun iç kısmına doğru girip sabitlendiği görülmektedir (Şekil 3. 56).

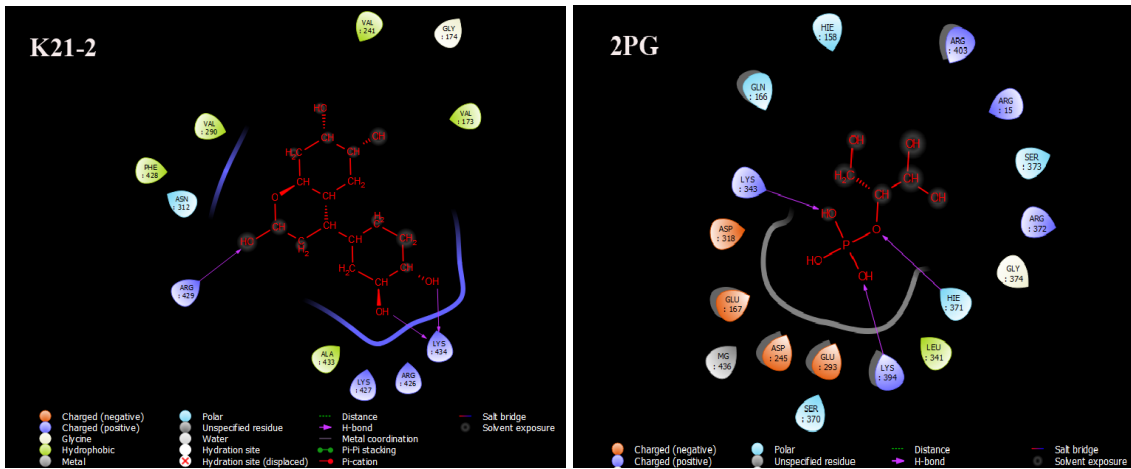


Şekil 3. 55 a) MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-2-2pg (2 numaralı konum) kompleksinin RMSD değeri b) 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-2-2pg kompleksindeki her bir residünün atomik salınımı



Şekil 3. 56 a) MD simülasyon öncesi *Bteno3*-K21-2-2pg (2 numaralı konum) b) 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-2-2pg etkileşimi

Bteno3-K21-2-2pg kompleksinde K21 (pozisyon 2) yüklü residülerin olduğu oyuya girmiştir ve hidrojen bağları oluşturduğu. K21, Arg429 ve Lys434 ile bir hidrojen bağı oluşturur ve aynı zamanda, enolase ile daha sıkı bir yapı oluşturan, yüklü residüler olan Arg426 ve Lys427 ile etkileşir. Ek olarak substrat, Lys343, Lys394 ve His371 ile substratın fosfat grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmak için enzimin aktif bölgesinde yeniden konumlanmıştır (Şekil 3. 57).



Şekil 3. 57 100 ns MD simülasyon boyunca *Bteno3*-K21-2-2pg etkileşiminin 2D diagram gösterimi

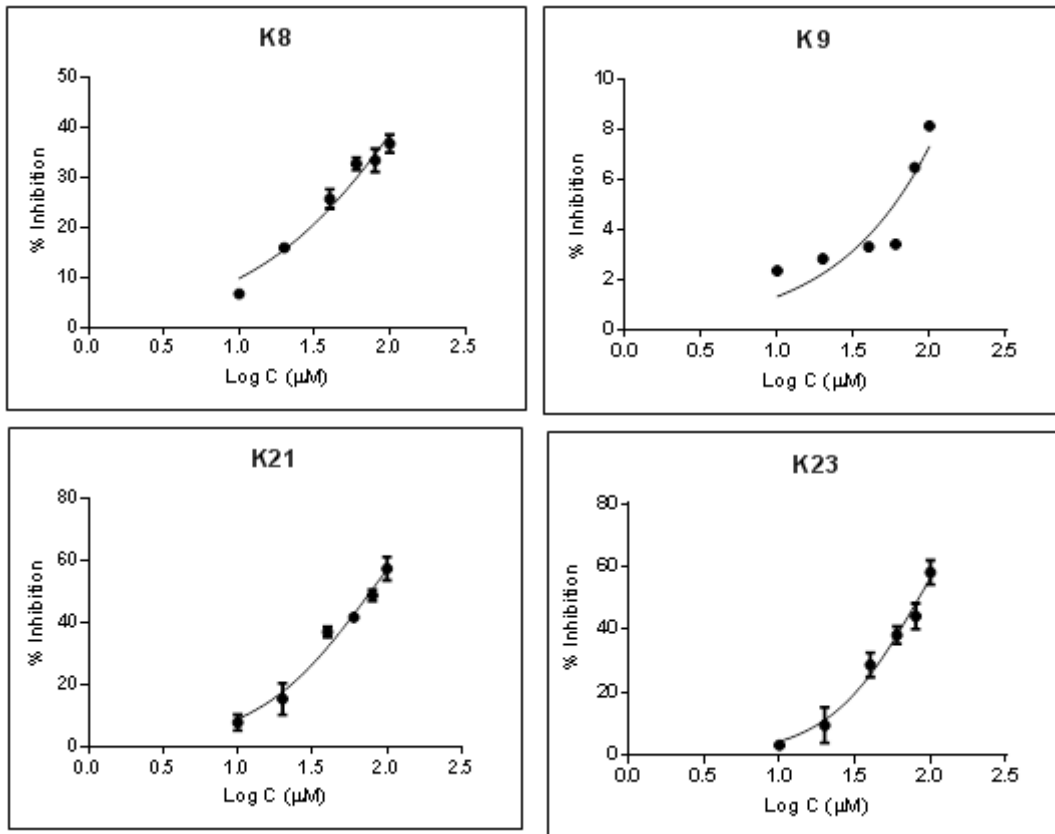
3.7 İnhibitör etkinliğinin *Bos taurus* kas enolaz enzimi kullanılarak taranması ve enzim kinetiği çalışmaları

Elde edilen bulgulara göre K21 ve K23 için IC_{50} değeri sırasıyla 77,69 μM ve 84,42 μM olarak hesaplanmıştır. K8 ve K9 inhibitör etkinliği düşük olduğu için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır fakat 100 μM 'da % inhibisyon değerleri sırasıyla %36,87 ve %8.13

olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3. 8). *Bt*ENO3 üzerinde yapılan inhibitör etkinliği taraması sonucunda IC₅₀ değerleri hesaplanan kumarin türevlerinin logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafikleri Şekil 3. 58'te verilmiştir.

Çizelge 3. 8 Kumarin türevlerinin IC₅₀ değerleri. (*100 µM konsantrasyonda % inhibisyon değeri)

Bileşikler	IC ₅₀ (µM)
K8	% 36,87* ± 1,098
K9	% 8,13* ± 2,968
K21	77,69 ± 1,042
K23	84,42 ± 1,038



Şekil 3. 58 K8, K9, K21 ve K23 kumarin türevlerine göre logaritmik inhibitör konsantrasyonuna karşı reaksiyon sonucunda meydana gelen % inhibisyon grafikleri

2017 yılında yapılan tez çalışmasında (YAKARSONMEZ, 2017, Doktora tezi) K8, K9, K21 ve K23 türevlerinin parazit enolazı aktivitesine etkisi Çizelge 3. 9’da konak organizma enolazı ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Belirtilen kumarin türevleri parazit enolazına göre kıyaslandığında daha yüksek konsantrasyonlarda *Bos taurus* enolazını inhibe ettiği görülmektedir. *Bos taurus* enolazını inhibisyon oranlarına göre K21>K23>K9>K8 olarak sıralanmaktadır. K9 türevi diğerlerine göre kıyaslandığında *Bos taurus* enolazını en az inhibe eden bileşik olduğu ve bu sebeple en muhtemel aday inhibitör olarak önerilebileceği görülmektedir (Çizelge 3. 8).

Çizelge 3. 9 Kumarin türevlerinin *Theileria annulata* ve *Bos taurus* enolazlarının aktivitelerine etkisi

	K8 (μM)	K9 (μM)	K21 (μM)	K23 (μM)
<i>Theileria annulata</i> enolazı (IC ₅₀)	10,45	13,17	8,87	10,86
<i>Bos taurus</i> enolazı (IC ₅₀)	>100	>100	77,69	84,42

3.8 MM-GB(PB)SA Metodu İle Kumarin Türevlerinin ve Substratın (2PG) Serbest Bağlanma Enerji Hesaplamaları

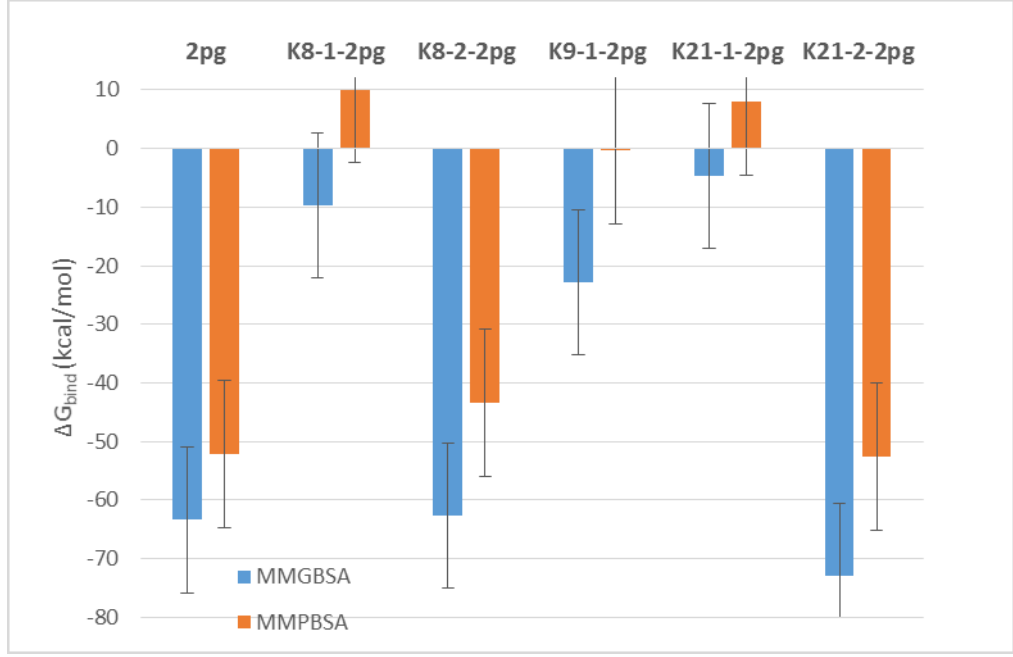
100 ns simulasyon boyunca yapılan enerji hesaplamaları MM-GB/PBSA olarak karşılaştırılmalı verilmiştir (Çizelge 3. 10). Kumarin türevleri bağlı olmayan komplekste substratın bağlanma enerjileri sırasıyla MMGBSA -63.4176 kcal/mol ve MMPBSA -52.1330 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. MMPBSA serbest bağlanma enerji hesaplamasında non-polar solvent enerji katkıları göz ardı edildiği için MMGBSA enerjisi daha düşük hesaplanmıştır.

İnhibitör bağlı komplekslere bakıldığında K8 türevinin 1 numaralı pozisyonundaki (*BtEno3*-2PG-K8_1), K9 türevinin 1. pozisyonundaki (*BtEno3*-2PG-K9_1) ve K21 türevinin 1 numaralı pozisyonundaki (*BtEno3*-2PG-K21_1) komplekslerinin serbest bağlanma enerjilerinin pozitif yakın olduğu görülmektedir (Şekil 3. 59). Bu durumda substratın bağlanma afiniteleri daha düşük yorumu yapılabilmektedir. Fakat 100 ns boyunca simulasyon sonrası kumarin türevlerinin simulasyon öncesi ve sonrası konumları kıyaslandığında enzim ile etkileşimlerinin kısıtlı olduğu görülmektedir. Enzim-ligand

arasındaki etkileşim zayıflığı toplam enerji hesabında gaz fazındaki elektrostatik enerjinin (ΔEEL_{gas}) daha yüksek hesaplanmasına sebep olmaktadır. Bu iki sonuç kıyaslamalı yorumladığında kumarin türevleri bağlı yada bağlı olmayan komplekslerdeki substrat bağlanma enerjileri (MM-GB/PBSA) birbirine benzer olduğu görülmektedir.

Çizelge 3. 10 *BtEno3*-2PG ve *BtEno3*-2PG-inhibitör komplekslerindeki substratın (2PG) serbest bağlanma enerji hesap bileşenleri

	<i>BtEno3</i>- 2PG	<i>BtEno3</i>- 2PG- K8_1	<i>BtEno3</i>- 2PG- K8_2	<i>BtEno3</i>- 2PG- K9_1	<i>BtEno3</i>- 2PG- K21_1	<i>BtEno3</i>- 2PG- K21_2
ΔVDW_{gas}	3.7167	-6.9999	4.7888	-3.1794	-8.5298	2.1853
ΔEEL_{gas}	-598.999	-372.091	- 405.2618	- 375.1589	-395.1172	- 500.0190
ΔEGB_{solv}	535.1648	371.9992	340.4853	358.4076	401.8396	427.5580
$\Delta ESURF_{\text{solv}}$	-3.2994	-2.7026	-2.5963	-2.9178	-2.7976	-2.5967
ΔEPB_{solv}	543.1500	389.1629	357.0562	378.0613	411.7016	445.2164
$\Delta ECAV_{\text{solv}}$	-	-	-	-	-	-
ΔG_{MMGBSA} ($\pm$ Std hata)	-63.4176 (0.3282)	-9.7949 (0.1474)	-62.5840 (0.2071)	-22.8485 (0.1590)	-4.6051 (0.1743)	-72.8723 (0.4417)
ΔG_{MMPBSA} ($\pm$ Std hata)	-52.1330 (0.3487)	10.0714 (0.2647)	-43.4169 (0.2405)	-0.2771 (0.2266)	8.0545 (0.2878)	-52.6173 (0.5413)
RMSD (ort)	1.38531	1.34144	1.28605	1.27594	1.17404	1.40254

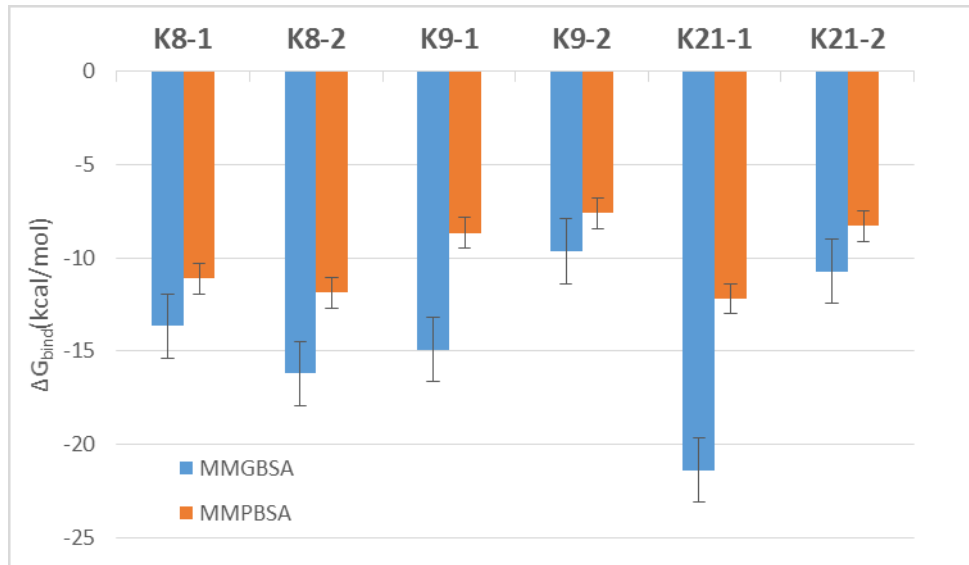


Şekil 3. 59 *BtEno3*-2PG ve *BtEno3*-2PG-inhibitör komplekslerindeki substratın serbest bağlanma enerjisi grafiği

in vitro set göz önüne alınarak izlenen yolda öncelikli olarak enzime kumarin türevleri yanaştırılmıştır ve 50 ns boyunca simule edilmiştir. Oluşan koordinat dosyasından 100 ps aralıklar ile alınan anlık koordinatlar kullanılarak kumarin türevlerinin 2 farklı konumda bağlı oldukları komplekslerin serbest bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. MM-GB/PBSA serbest bağlanma enerjileri kıyasladığında bağlanma afiniteleri yüksekten düşüğe *BtEno3*-K21_1> *BtEno3*-K8_2> *BtEno3*-K9_1> *BtEno3*-K8_1> *BtEno3*-K21_2> *BtEno3*-K9_2 olarak sıralanmaktadır (Çizelge 3. 11) (Şekil 3. 60). Bağlanma afinitesi en düşük olan *BtEno3*-K9_2 kompleksindeki liganda simulasyon sonrası konumuna bakıldığında sistemden tamamen ayrıldığı görülmektedir.

Çizelge 3. 11 *BtEno3*-inhibitör komplekslerindeki kumarinlerin (K8, K9 ve K21) serbest bağlanma enerji hesap bileşenleri (50 ns boyunca)

	<i>BtEno3</i> - K8_1	<i>BtEno3</i> - K8_2	<i>BtEno3</i> - K9_1	<i>BtEno3</i> - K9_2	<i>BtEno3</i> - K21_1	<i>BtEno3</i> - K21_2
ΔVDW_{gas}	-22.7093	-24.502	-21.7994	-16.2011	-24.145	-20.2376
ΔEEL_{gas}	-2.9535	-9.8119	-33.7182	-19.1983	-43.861	-22.2613
ΔEGB_{solv}	14.5193	21.2330	44.0258	27.9846	50.6192	34.5673
$\Delta ESURF_{\text{solv}}$	-2.5110	-3.1094	-3.4411	-2.2365	-4.0046	-2.7968
ΔEPB_{solv}	14.5547	22.4503	46.8600	27.7806	55.8082	34.1971
$\Delta ECAV_{\text{solv}}$	-	-	-	-	-	-
ΔG_{MMGBSA}	-13.6546	-16.190	-14.9328	-9.6512	-21.392	-10.7284
ΔG_{MMPBSA}	-11.1081	-11.864	-8.6576	-7.6187	-12.198	-8.3018
RMSD (ort)	1.2715	1.4103	1.2301	1.40129	1.22242	1.22306

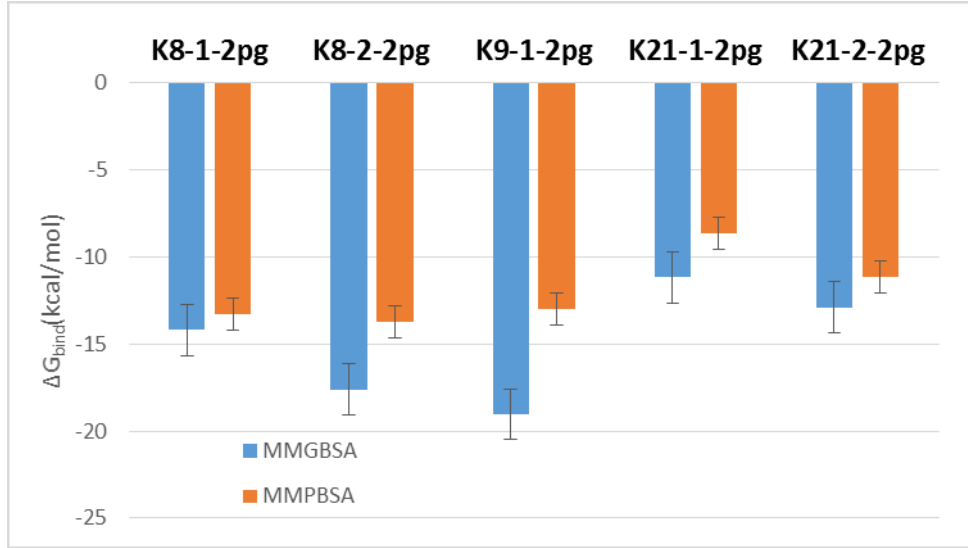


Şekil 3. 60 *BtEno3*-inhibitör komplekslerindeki kumarinlerin serbest bağlanma enerjisi grafiği

in vitro çalışmalara paralel olarak takiben enzim-kumarin kompleksine substrat yanaştırılarak 100 ns boyunca moleküler dinamik yöntemler ile simüle edilmiştir. K9 türevinin 2 numaralı (*BtEno3*-K9_2) konumda iken 50 ns simülasyon sonrasında kompleksten ayrıldığı için bu basamakta komplekse substrat yanaştırılmamıştır. Diğer komplekslere substratı olan 2PG yanaştırıldıktan sonra 100 ns boyunca simüle edilmiştir. simülasyon sonrası oluşan koordinat dosyasından her bir 100 ps aralıklar ile anlık koordinatlar alınarak MM-GB/PBSA metodları ile serbest bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. *BtEno3*-2PG-inhibitör komplekslerindeki kumarin türevlerinin bağlanma afiniteleri yüksek düşüğe *BtEno3*-2PG-K9_1> *BtEno3*-2PG-K8_2> *BtEno3*-2PG-K8_1> *BtEno3*-2PG-K21_2> *BtEno3*-2PG-K21_1 olarak sıralanmaktadır (Çizelge 3. 12).

Çizelge 3. 12 *BtEno3*-2PG-inhibitör kompleksindeki kumarinlerin (K8, K9 ve K21) serbest bağlanma enerji hesap bileşenleri (100 ns boyunca)

	<i>BtEno3</i>- 2PG-K8_1	<i>BtEno3</i>- 2PG-K8_2	<i>BtEno3</i>- 2PG-K9_1	<i>BtEno3</i>- 2PG-K21_1	<i>BtEno3</i>- 2PG-K21_2
ΔVDW_{gas}	-19.7426	-22.5313	-20.5164	-16.1006	-18.5304
ΔEEL_{gas}	-21.8443	-18.3790	-48.8894	-39.8336	-31.5159
ΔEGB_{solv}	30.1036	26.4796	54.1780	47.6965	40.2762
$\Delta ESURF_{solv}$	-2.7242	-3.1788	-3.8021	-2.9239	-3.1308
ΔEPB_{solv}	28.3155	27.1678	56.4146	47.3029	38.9075
$\Delta ECAV_{solv}$	-	-	-	-	-
ΔG_{MMGBSA} ($\pm$ Std hata)	-14.2075 (0.0945)	-17.6095 (0.1886)	-19.0299 (0.0939)	-11.1617 (0.1194)	-12.9010 (0.0908)
ΔG_{MMPBSA} ($\pm$ Std hata)	-13.2715 (0.1302)	-13.7425 (0.1545)	-12.9912 (0.1350)	-8.6314 (0.1392)	-11.1388 (0.1475)
RMSD (ort)	1.34144	1.28605	1.27594	1.17404	1.40254



Şekil 3. 61 *BtEno3*-2PG-inhibitör komplekslerindeki kumarinlerin serbest bağlanma enerjisi grafiği

3.9 Tartışma

Tez çalışması kapsamında *Bos taurus* kas enolaz enzimini kodlayan gen başarılı bir şekilde izole edilmiş ve klonlanmıştır. Klonlanan genin ekspresyon ve saflaştırma optimizasyonları yapılmış ve %95 saflıkta protein eldesi başarılmıştır. Literatürde ilk defa bu çalışma ile *Bos taurus* kas enolaz enziminin karakterizasyonu yapılarak kinetik parametreleri tanımlanmıştır.

In silico çalışmalarda kullanmak amacıyla enzimin 3-boyutlu tanımlanması gerekmektedir. Bu amaçla molekülün homoloji modeli oluşturulmuş ve bu modelin doğruluğu web tabanlı değerlendirme, analiz programları ile doğrulanmıştır. Oluşturulan homoloji modelde substrat-enzim etkileşiminin analizi için moleküler docking metodu ile substratı olan 2PG (2-fosfoglisarat) ligandı enzime yanaştırılmıştır. Yanaştırılan ligandın termodinamik olarak stabilazasyonu ve doğruluğunu artırmak amacıyla moleküler dinamik yöntemler ile sistem simule edilmiştir. Son konformasyon, deneysel olarak belirlenen eş değer moleküller ile kıyaslanıp doğruluğu onaylanmıştır. Bu metod ile zaman ve para harcanan yöntem olan x-ray kristalografi yöntemine gerek kalmadan molekülün 3-boyutlu yapısı tanımlanmıştır ve enzim-substrat etkileşimleri ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışma, *Theileria annulata* parazitinin sebep olduğu ve sığırlarda maddi olarak yüksek miktarda kayıplara neden olan theileriosis hastalığına yönelik ilaç adayları belirlenmesi aşamalarının tamamlayıcısı olarak planlanmıştır. Bu kapsamda grubumuzda yapılan ve TAGEM tarafında desteklenen projede belirlenmiş olan *Theileria annulata* enolazını inhibe eden kumarin türevleri taranmıştır. Belirlenmiş olan K8, K9, K21 ve K23 ligandları bu çalışmada materyal olarak alınmıştır. Bu ligandların parazit enolazını baskılaması fakat konak organizma olan *Bos taurus* enolazını etkilememesi beklenmektedir.

Karşılaştırmalı MM-GB/PBSA metodları ile serbest bağlanma enerjileri ve simulasyon öncesi ve sonrası konumları göz önüne alındığında;

K21 kumarin türevinin 1 numaralı pozisyonda bağlı kompleksin substrat bağlı olmadan bağlanma afinitesi en yüksek olarak hesaplanmıştır fakat substrat bağlandıktan sonra

bağlanma afinitesi en düşük konuma gelmiştir. K21 kumarin türevinin 1 numaralı konumuna simulasyon öncesi ve sonrasına bakıldığında ilk yanaştırmada oyuğa girmiş fakat simulasyon sonrası bu oyuktan çıktığı ve etkileşimlerinin azaldığı görülmektedir. Simulasyon boyunca hesaplanan ortalama RMSD değeri 1.17404 olduğu da dikkate alındığında K21 kumarin türevinin 1 numaralı konumda bağlı kalamayacağı ve inhibisyon özelliği gösteremeyeceği söylenebilmektedir.

K21 kumarin türevinin 2 numaralı konumda iken substrat bağlı olmadan bağlanma enerjisi -10.7284 kcal/mol iken substrat bağlı iken -12,9010 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Simulasyon öncesi ve sonrası konumuna bakıldığında ilk bağlandığı oyukta stabil kaldığı ve konumu enzimin aktif bölge oyuğunda olduğu görülmektedir. K21 kumarin türevinin 2 numaralı konumundan bağlanarak sabit kalacağı ve inhibitör etkisi göstereceği tahmin edilmektedir. *in vitro* inhibisyon çalışmaları sonucu en yüksek inhibisyonu ($IC_{50} = 77,69 \mu M$) gösteren türev K21 olarak rapor edilmiştir.

K8 kumarin türevinin 1 numaralı konumda bağlı iken substrat olmadan ve substrat bağlı iken hesaplanan serbest bağlanma enerjileri sırasıyla -13,6546 ve -14,205 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Simulasyon öncesi ve sonrası K8 kumarin türevinin konumuna bakıldığında yerinin stabil kaldığı fakat bağlanma bölgesi aktif bölge oyuğunun dışında olduğu görülmektedir. *in vitro* inhibisyon çalışmaları sonucu $IC_{50} > 100 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Bu karşılaştırma sonucu K21 kumarin türevinden sonra en az inhibisyon etkisi gösteren K8 kumarin türevi olduğu söylenebilmektedir.

K8 kumarin türevinin 2 numaralı konumda iken substrat bağlı ve bağlı olmadan hesaplanan bağlanma afinitesi olarak en yüksek 2. türev olduğu görülmektedir. Ligandın simulasyon öncesi ve sonrası konumlarına bakıldığında tamamen ilk pozisyonda farklı bir yere konumladığı ve enzim ile etkileşimin zayıfladığı görülmektedir. Bunun sonucu olarak substrat bağlanma afinitesi düşük çıkmaktadır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde simulasyon devamında K8 kumarin türevinin enzimin yüzeyinde dolaşacağı ve enzim aktivitesi bir etksinin olmayacağı görülmektedir.

K9 kumarin türevinin 1 numaralı konumda bağlı iken substra bağlı ve bağlı olmadan hesaplanan serbest bağlanma enerjileri sırasıyla -14,9328 ve -19,0299 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Ligandın 100 ns simulasyon öncesi ve sonrası konumlarına bakıldığında

pozisyonunun değişmediği fakat konum olarak enzim aktif oyuğuna uzak olduğu görölmektedir. *in vitro* inhibisyon çalışmaları sonucu $IC_{50} > 100 \mu M$ olarak belirlenen K9 kumarin türevinin en düşük inhibisyon özelliği olan ligand olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde K9 kumarin türevinin 2 numaralı konumdan 50 ns sonra sistemden ayrıldığı görölmüştür. Bu sonuçlara göre K9 kumarin türevinin *in siliko* ve *in vitro* alışmaları sonrası inhibitör adayı olarak gösterilebileceği öngörülmektedir.

Tüm sonuçlar dikkate alındığında K8 ve K9 türevlerinin konak organizmanın enolaz aktivitesine etkisi *Theileria annulata* enolazına kıyasla çok düşüktür. Bununla beraber K21 ve K23 türevlerinin de konak organizma enolazının aktivitesine etkisi *Theileria annulata* enolazına oranla düşük konsantrasyonlardadır. Ancak çalışılan bu dört kumarin türevi kendi arasında değerlendirildiğinde ve ayrıca *in siliko* alışmalarda göz önüne alındığında hastalığa sebep olan parazitin enolazını inhibe eden ama konak organizmanın eşdeğer enzimi olan enolazı inhibe etmeyen aday olarak K8 ve K9 olabileceği açığa çıkmaktadır.

3.10 Öneriler

- *Bos taurus* enolazının 3-boyutlu yapısı deneysel olarak X-ray kristalografi ile tanımlanmalıdır.
- Kumarin türevlerinin *Theileria annulata* enolaz ile etkileşimlerinin deneysel olarak tanımlanabilmesi için kristal yapıları tanımlanmalıdır.
- Seçilen kumarin türevlerinin hücre kültür çalışmalarının yapılmalıdır.
- Hücre kültürü çalışmalarından olumlu sonuç elde edilmesi durumunda belirlenen ligandlar ile *in vivo* testler yapılmalıdır.
- Bu tez çalışması, farklı ligand setleri ile yapıya dayalı ilaç tasarımı çalışılmalarına ve aynı şekilde farklı hastalık ve organizmalarda benzer çalışmaların yapılmasına bir basamak oluşturmaktadır.
- Bu tez çalışmasında takip edilen metodlar ile daha iyi ilaç adaylarının tespiti amacıyla farklı ligand kütüphanelerinin analizinin yapılması;

KAYNAKLAR

-
- [1] Ahmed, J.S. Glass, E.J. Salih, D.A. ve Seitzer, U., (2008). "Innate immunity to tropical theileriosis", *Innate Immunity*, 14: 5-12.
 - [2] Brown, C., (1990). "Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle", *Parassitologia*, 32: 23-31.
 - [3] Dolan, T., (1989). "Theileriosis: a comprehensive review", *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, 8: 11-36.
 - [4] Amira, A.-H. Ahmed, L. Ahmed, J. Nijhof, A. ve Clausen, P.-H., (2018). "Epidemiological study on tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Egyptian Oases with special reference to the molecular characterization of *Theileria* spp", *Ticks and tick-borne diseases*.
 - [5] Ascencio, M.E. Florin-Christensen, M. Mamoun, C.B. Weir, W. Shiels, B. ve Schnittger, L., (2018). "Cysteine Proteinase C1A Paralog Profiles Correspond with Phylogenetic Lineages of Pathogenic Piroplasmids", *Veterinary sciences*, 5: 41.
 - [6] Martínez-Ocampo, F., (2018). *Genomics of Apicomplexa*, ed. Farm Animals Diseases, Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment. InTech.
 - [7] Sharma, R. Choudhary, N. Agrawal, V. Mehta, H. Singh, A. ve Choudhary, K., (2017). "Theileriosis In Buffalo: A Case Study", *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 7: 216-217.
 - [8] Saruhan, B., (2007). Theileriosisli sığırlarda Buparvaquone'un terapötik etkinliği, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Adnan Menderes Üniversitesi.
 - [9] Robinson, P., (1982). "*Theileria annulata* and its transmission—a review", *Tropical animal health and production*, 14: 3-12.
 - [10] LuĂsa, M., (2017). "Tick-borne bacteria and protozoa detected in ticks collected from domestic animals and wildlife in central and southern Portugal", *Ticks and tick-borne diseases*.
 - [11] Mohmad, A., (2018). " Development of a recombinant TaSP-based Dot-ELISA for detection of *Theileria annulata* infection in cattle " , *Ticks and Tick-borne Diseases*.

- [12] Cheeseman, K. ve Weitzman, J., (2017). "What makes a parasite" transforming"? Insights into cancer from the agents of an exotic pathology, *Theileria spp*", *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 110: 55-60.
- [13] Inci, A. Ica, A. Yildirim, A. Vatansever, Z. Cakmak, A. Albasan, H. Cam, Y. Atasever, A. Sariozkan, S. ve Duzlu, O., (2007). "Economical impact of tropical theileriosis in the Cappadocia region of Turkey", *Parasitology research*, 101: 171-174.
- [14] El-Hussein, A. El Ghali, A. ve Mohammed, S., "Efficacy of Buparvaquone in the Treatment of Malignant Theileriosis of Sheep", in *Ed-Damer Province Nile State Sudan: a field trial. Sudan J Vet Res* 12:51-57.
- [15] Abidin, Z. Binti, N.I. Arunaman, C. ve Chandrasekaran, D., (2017). "Successful Management Of Theileriosis In A Jersey Cross Cow", *TANUVAS 9th Clinical Case Conference Abstract 3rd - 4th August 2017*
- [16] Korsinczky, M. Chen, N. Kotecka, B. Saul, A. Rieckmann, K. ve Cheng, Q., (2000). "Mutations in Plasmodium falciparum Cytochrome b That Are Associated with Atovaquone Resistance Are Located at a Putative Drug-Binding Site", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44: 2100-2108.
- [17] McFadden, D.C. Tomavo, S. Berry, E.A. ve Boothroyd, J.C., (2000). "Characterization of cytochrome b from Toxoplasma gondii and Qo domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance", *Molecular and biochemical parasitology*, 108: 1-12.
- [18] 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.
- [19] Chen, G.S. ve Chern, J.-W., (2007). *Computer-aided drug design: Wiley, NY, USA.*
- [20] Anderson, A.C., (2003). "The process of structure-based drug design", *Chemistry & biology*, 10: 787-797.
- [21] Stocks, M., (2013). *The small molecule drug discovery process—from target selection to candidate selection, Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development, Elsevier*, 81-126.
- [22] Staker, B.L. Buchko, G.W. ve Myler, P.J., (2015). "Recent contributions of structure-based drug design to the development of antibacterial compounds", *Current opinion in microbiology*, 27: 133-138.
- [23] Klebe, G., (2000). "Recent developments in structure-based drug design", *Journal of Molecular Medicine*, 78: 269-281.
- [24] Vyas, V. Ukawala, R. Ghate, M. ve Chintla, C., (2012). "Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives", *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74: 1-5.

- [25] Floudas, C. Fung, H. McAllister, S. Mönnigmann, M. ve Rajgaria, R., (2006). "Advances in protein structure prediction and de novo protein design: A review", *Chemical Engineering Science*, 61: 966-988.
- [26] Cavasotto, C.N. ve Phatak, S.S., (2009). "Homology modeling in drug discovery: current trends and applications", *Drug discovery today*, 14: 676-683.
- [27] Liu, T. Guerquin, M. ve Samudrala, R., (2008). "Improving the accuracy of template-based predictions by mixing and matching between initial models", *BMC Structural Biology*, 8: 24.
- [28] Eswar, N. Eramian, D. Webb, B. Shen, M.-Y. ve Sali, A., (2008). Protein structure modeling with MODELLER, *Structural proteomics*. Springer, 145-159.
- [29] Inc., C.C.G., (2016). Molecular operating environment (MOE), Chemical Computing Group Inc 1010 Sherbooke St. West, Suite# 910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7.
- [30] Schrödinger, P., (2014). "Version 3.5", New York, LLC.
- [31] Chivian, D. ve Baker, D., (2006). "Homology modeling using parametric alignment ensemble generation with consensus and energy-based model selection", *Nucleic acids research*, 34: e112-e112.
- [32] 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.
- [33] Webb, B. ve Sali, A., (2017). Protein structure modeling with MODELLER, ed. *Functional Genomics*. Springer, 39-54.
- [34] Maier, J.K. ve Labute, P., (2014). "Assessment of fully automated antibody homology modeling protocols in molecular operating environment", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82: 1599-1610.
- [35] Taboureau, O. Baell, J.B. Fernández-Recio, J. ve Villoutreix, B.O., (2012). "Established and emerging trends in computational drug discovery in the structural genomics era", *Chemistry & biology*, 19: 29-41.
- [36] Lavecchia, A. ve Di Giovanni, C., (2013). "Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review", *Current medicinal chemistry*, 20: 2839-2860.
- [37] Tran, Q.N. ve Arabnia, H., (2015). *Emerging trends in computational Biology, Bioinformatics and System Biology*: Elsevier.
- [38] Meng, X.-Y. Zhang, H.-X. Mezei, M. ve Cui, M., (2011). "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery", *Current computer-aided drug design*, 7: 146-157.
- [39] 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.

- [40] Dar, A. ve Mir, S., (2017). "Molecular docking: approaches, types, applications and basic challenges", *J Anal Bioanal Tech*, 8: 2.
- [41] Pagadala, N.S. Syed, K. ve Tuszynski, J., (2017). "Software for molecular docking: a review", *Biophysical reviews*, 9: 91-102.
- [42] Kramer, B. Metz, G. Rarey, M. ve Lengauer, T., (1999). "Part 1--Docking and Scoring: Methods Development-Ligand Docking And Screening With FLEXX", *Medicinal chemistry research*, 9: 463-478.
- [43] Durrant, J.D. ve McCammon, J.A., (2011). "Molecular dynamics simulations and drug discovery", *BMC biology*, 9: 71.
- [44] Doss, C.G.P. Chakraborty, C. Narayan, V. ve Kumar, D.T., (2014). Computational approaches and resources in single amino acid substitutions analysis toward clinical research, ed. *Advances in protein chemistry and structural biology*. Elsevier, 365-423.
- [45] Mortier, J. Rakers, C. Bermudez, M. Murgueitio, M.S. Riniker, S. ve Wolber, G., (2015). "The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand–macromolecule complexes", *Drug discovery today*, 20: 686-702.
- [46] Donev, R., (2014). *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*: Academic Press.
- [47] Zwier, M.C. ve Chong, L.T., (2010). "Reaching biological timescales with all-atom molecular dynamics simulations", *Current opinion in pharmacology*, 10: 745-752.
- [48] Case, D. Darden, T. Cheatham III, T. Simmerling, C. Wang, J. Duke, R. Luo, R. Walker, R. Zhang, W. ve Merz, K., (2012). "Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER) 12", University of California, San Francisco.
- [49] Genheden, S. ve Ryde, U., (2015). "The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities", *Expert opinion on drug discovery*, 10: 449-461.
- [50] Hayes, J.M. ve Archontis, G., (2012). MM-GB (PB) SA calculations of protein-ligand binding free energies, ed. *Molecular Dynamics-Studies of Synthetic and Biological Macromolecules*. InTech.
- [51] Bello, M., (2014). "Binding free energy calculations between bovine β -lactoglobulin and four fatty acids using the MMGBSA method", *Biopolymers*, 101: 1010-1018.
- [52] Lodish, H. Berk, A. Darnell, J.E. Kaiser, C.A. Krieger, M. Scott, M.P. Bretscher, A. Ploegh, H. ve Matsudaira, P., (2008). *Molecular cell biology*: Macmillan.
- [53] Zadvornyy, O.A. Boyd, E.S. Posewitz, M.C. Zorin, N.A. ve Peters, J.W., (2015). "Biochemical and structural characterization of enolase from *Chloroflexus aurantiacus*: evidence for a thermophilic origin", *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3: 74.

- [54] Nelson, D.L. Lehninger, A.L. ve Cox, M.M., (2008). Lehninger principles of biochemistry: Macmillan.
- [55] Merkulova, T. Dehaupas, M. Nevers, M.C. Créminon, C. Alameddine, H. ve Keller, A., (2000). "Differential modulation of α , β and γ enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle", European Journal of Biochemistry, 267: 3735-3743.
- [56] Garret, R.H. ve Grisham, C.M., (2007). "Biochemistry with a Human Focus", Australia–United States.
- [57] 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.
- [58] Pancholi, V., (2001). "Multifunctional α -enolase: its role in diseases", Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 58: 902-920.
- [59] Lung, J. Chen, K.-L. Hung, C.-H. Chen, C.-C. Hung, M.-S. Lin, Y.-C. Wu, C.-Y. Lee, K.-D. Shih, N.-Y. ve Tsai, Y.H., (2017). "In silico-based identification of human α -enolase inhibitors to block cancer cell growth metabolically", Drug design, development and therapy, 11: 3281.
- [60] Akat, A. Aktas, M. Dumanli, N. ve Turgut-Bauk, D., (2014). "Isolation, cloning and sequence analysis of enolase enzyme encoding gene from *Theileria annulata* for assessment of important residues of this enzyme", Kafkas Univ Vet Fak Derg, 20: 243-248.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] Fromm, H.J. ve Hargrove, M., (2012). Essentials of biochemistry: Springer Science & Business Media.
- [64] Cook, P.F. ve Cleland, W.W., (2007). Enzyme kinetics and mechanism: Garland Science.
- [65] Moran, L.A. Horton, H.R. Scrimgeour, K.G. ve Perry, M.D., (2012). Principles of biochemistry: Pearson Boston.
- [66] Menten, L. ve Michaelis, M., (1913). "Die kinetik der invertinwirkung", Biochem Z, 49: 333-369.
- [67] Cornish-Bowden, A. ve Cornish-Bowden, A., (2012). Fundamentals of enzyme kinetics: Wiley-Blackwell Weinheim, Germany.

- [68] Hayakawa, K. Guo, L. Terentyeva, E.A. Li, X.-K. Kimura, H. Hirano, M. Yoshikawa, K. Nagamine, T. Katsumata, N. ve Ogata, T., (2006). "Determination of specific activities and kinetic constants of biotinidase and lipoamidase in LEW rat and *Lactobacillus casei* (Shirota)", *Journal of Chromatography B*, 844: 240-250.
- [69] Jain, P. ve Joshi, H., (2012). "Coumarin: chemical and pharmacological profile", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2: 236-240.
- [70] Poumale, H.M.P. Hamm, R. Zang, Y. Shiono, Y. ve Kuete, V., (2013). *Coumarins and related compounds from the medicinal plants of Africa*, ed. Medicinal Plant Research in Africa. Elsevier, 261-300.
- [71] Musa, M.A. Cooperwood, J.S. ve Khan, M.O.F., (2008). "A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer", *Current medicinal chemistry*, 15: 2664-2679.
- [72] Rohini, K. ve Srikumar, P., (2014). "Therapeutic role of coumarins and coumarin-related compounds", *Journal of Thermodynamics & Catalysis*, 5: 1.
- [73] Genscript, (2017). "pcDNA™3.1 (+) Mammalian Expression Vector", https://www.genscript.com/GenEZ_ORF_cloning_vectors.html, 20.05.2018.
- [74] Scientific, T., (2013). *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System*.
- [75] Aslanidis, C. ve De Jong, P.J., (1990). "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)", *Nucleic acids research*, 18: 6069-6074.
- [76] Studier, F.W. ve Moffatt, B.A., (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes", *Journal of molecular biology*, 189: 113-130.
- [77] Sambrook, J. Russell, D.W. ve Russell, D.W., (2001). *"Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)"*.
- [78] Zimin, A.V. Delcher, A.L. Florea, L. Kelley, D.R. Schatz, M.C. Puiu, D. Hanrahan, F. Pertea, G. Van Tassell, C.P. ve Sonstegard, T.S., (2009). "A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*", *Genome biology*, 10: R42.
- [79] "Novel juice", <https://www.genedirex.com/novel-juice/>, 20.05.2018.
- [80] Goujon, M. McWilliam, H. Li, W. Valentin, F. Squizzato, S. Paern, J. ve Lopez, R., (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI", *Nucleic acids research*, 38: W695-W699.
- [81] Altschul, S.F. Gish, W. Miller, W. Myers, E.W. ve Lipman, D.J., (1990). "Basic local alignment search tool", *Journal of molecular biology*, 215: 403-410.
- [82] 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", *European Journal of Biochemistry*, 271: 4845-4854.

- [83] Webb, B. ve Sali, A., (2016). "Comparative protein structure modeling using MODELLER", Current protocols in protein science, 86: 2.9. 1-2.9. 37.
- [84] Morris, A.L. MacArthur, M.W. Hutchinson, E.G. ve Thornton, J.M., (1992). "Stereochemical quality of protein structure coordinates", Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 12: 345-364.
- [85] Colovos, C. ve Yeates, T.O., (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions", Protein science, 2: 1511-1519.
- [86] 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.
- [87] Morris, G.M. Huey, R. Lindstrom, W. Sanner, M.F. Belew, R.K. Goodsell, D.S. ve Olson, A.J., (2009). "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility", Journal of computational chemistry, 30: 2785-2791.
- [88] Morris, G.M. Goodsell, D.S. Halliday, R.S. Huey, R. Hart, W.E. Belew, R.K. ve Olson, A.J., (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function", Journal of computational chemistry, 19: 1639-1662.
- [89] Wang, J. Wang, W. Kollman, P.A. ve Case, D.A., (2006). "Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations", Journal of molecular graphics and modelling, 25: 247-260.
- [90] Jakalian, A. Jack, D.B. ve Bayly, C.I., (2002). "Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation", Journal of computational chemistry, 23: 1623-1641.
- [91] Wang, J. Wolf, R.M. Caldwell, J.W. Kollman, P.A. ve Case, D.A., (2004). "Development and testing of a general amber force field", Journal of computational chemistry, 25: 1157-1174.
- [92] Fletcher, R. ve Powell, M.J., (1963). "A rapidly convergent descent method for minimization", The computer journal, 6: 163-168.
- [93] Fletcher, R. ve Reeves, C.M., (1964). "Function minimization by conjugate gradients", The computer journal, 7: 149-154.
- [94] Pastor, R.W. Brooks, B.R. ve Szabo, A., (1988). "An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms", Molecular Physics, 65: 1409-1419.
- [95] Berendsen, H.J. Postma, J.v. van Gunsteren, W.F. DiNola, A. ve Haak, J., (1984). "Molecular dynamics with coupling to an external bath", The Journal of chemical physics, 81: 3684-3690.
- [96] Akat, A. Aktaş, M. Dumanlı, 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 Univ Vet Fak Derg, 20: 243-248.

- [97] 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.
- [98] Lebioda, L. ve Stec, B., (1991). "Mechanism of enolase: the crystal structure of enolase-magnesium-2-phosphoglycerate/phosphoenolpyruvate complex at 2.2-Å resolution", *Biochemistry*, 30: 2817-2822.
- [99] 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.
- [100] 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.
- [101] 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.
- [102] Pietkiewicz, J. Gamian, A. Staniszewska, M. ve Danielewicz, R., (2009). "Inhibition of human muscle-specific enolase by methylglyoxal and irreversible formation of advanced glycation end products", *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24: 356-364.
- [103] Hannaert, V. Albert, M.A. Rigden, D.J. Theresa da Silva Giotto, M. Thiemann, O. Garratt, R.C. Van Roy, J. Opperdoes, F.R. ve Michels, P.A., (2003). "Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase", *The FEBS Journal*, 270: 3205-3213.
- [104] Oliferenko, P.V. Oliferenko, A.A. Poda, G.I. Osolodkin, D.I. Pillai, G.G. Bernier, U.R. Tsikolia, M. Agramonte, N.M. Clark, G.G. ve Linthicum, K.J., (2014). "Correction: Promising *Aedes aegypti* Repellent Chemotypes Identified through Integrated QSAR, Virtual Screening, Synthesis, and Bioassay", *PloS one*, 9: 10.1371

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emrah SARIYER
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.01.1985, ELAZIĞ
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : esaryer@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Teknik Üniversitesi	2009
Lise	Fen	Elazığ Gazi Lisesi	2002

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2018-halen	Gümüşhane Üniversitesi	Araştırma görevlisi
2011-2018	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma görevlisi
2010	Gümüşhane Üniversitesi	Araştırma görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Sinem Yakarsonmez, Ozkan Danis, Ozal Mutlu, Murat Topuzogullari, **Emrah Sariyer**, Basak Yuce-Dursun, Dilek Balik (2018). "Inhibition of *Theileria annulata* Enolase by Arylcoumarin Derivatives", Molecular and Biochemical Parasitology, **revizyonda**
2. **Sariyer Emrah**, Yakarsonmez Sinem, Daniş Özkan, Balik Dilek (2018). "A study of *Bos taurus* muscle specific enolase biochemical characterization, homology modelling and investigation of molecular interaction using molecular docking and dynamics simulations", International Journal of Biological Macromolecules.
3. Yakarsönmez Sinem, Mutlu Özal, **Sariyer Emrah**, DANIŞ Özkan, Yüce-Dursun Başak, Topuzoğullari Murat, Akbulut Ekrem, Balik Dilek (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.
4. Yakarsönmez Sinem, Çayır Ebru, Mutlu Özal, Nural Belma, **Sariyer Emrah**, Topuzoğullari Murat, Milward Mike, Cooper Paul, Erdemir Ayşegül, Balik Dilek (2016). "Cloning expression and characterization of the gene encoding the enolase from *Fusobacterium nucleatum*", Applied Biochemistry and Microbiology, 52(1): 23-30.

Bildiri

1. **Sariyer E.**, Yakarsonmez S., Danis Ö., Balik D., "A Structure-Based Drug Design Study; Interactions of *Bos taurus* Enolase and Coumarin Derivatives Through Molecular Docking and Molecular Dynamic Simulation", (Kabul edildi) 6th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, 13-15 December 2018, İstanbul.
2. Ugurel E., Yakarsonmez S., **Sariyer E.**, Mutlu O, Ugurel OM , Balik D., "Comparative Modelling and Molecular Dynamic Simulation of *Bacteriodes fragillis* Enolase" (Kabul edildi) 6th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, 13-15 December 2018, İstanbul.
3. Sipahi S., **Sariyer E.**, Mutlu O., Yakarsonmez S., Balik D., "In silico Analyses of both Wild Type and Mutant TaPIN1 towards New Drug Discovery", 5th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, 19-21 Ekim 2017, İstanbul.
4. **Sariyer E.**, Balik D., "*Bos taurus* Kas Enolazını Kodlayan Genin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu", 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 1-3 Aralık 2017, Eskişehir.
5. **Sariyer E.**, Turgut-Balik D., "*Bos taurus* Enolase- Substrate Interactions By Homology Modelling, Molecular Docking and Molecular Dynamic Simulation", UGM & Conference 2017', 16-20 Mayıs 2017, Kopenhag, 23-23
6. Sipahi S., Erdemir A., Yakarsonmez S., **Sariyer E.**, Uğurel E., Aktaş M., et al., "Cloning of Peptidyl Prolyl cis/trans isomerase from *Theileria annulata*", IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, 22-22

7. Mutlu O., Yakarsonmez S., **Sariyer E.**, Danis O., Dursun B.Y., Topuzoğullari M., et al., "Comprehensive computational analysis of *Theileria annulata* enolase by comparative modeling and docking", 17th European Congress on Biotechnology, 3-6 Temmuz 2016, Krakow, 33:S171-S171
8. Yakarsönmez S., Daniş Ö., Mutlu Ö., Yüce Dursun B., Topuzoğulları M., Akbulut E., et al., "*Theileria annulata* Enolaz Enziminin Uygun Stabilizatörler Kullanılarak Depolama Koşullarının Belirlenmesi", IV. Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi , Ağustos 2015
9. Yakarsönmez S., Nural B., **Sariyer E.**, Turgut-Balik D., "Optimum pH Determination and Thermostability Analysis of Recombinant *Fusobacterium nucleatum* Enolase Enzyme", Aralık 2014
10. Yakarsönmez S., Çayır E., **Sariyer E.**, Balık D., "*Fusobacterium Nucleatum*'un Enolaz Enziminin Yüksek Safılıkta Üretilmesi", 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir.
11. Yakarsönmez S., Çayır E., **Sariyer E.**, Balık D., "Kinetic Evaluation Of Enolase Enzyme From *Fusobacterium Nucleatum* Towards New Drug Design Studies", 2nd International Bau-Drug Design Symposium, Nisan 2014, İstanbul.
12. **Sariyer E.**, Balık D., "Binding Site Identification and Molecular Docking Studies of *Fusobacterium nucleatum* Lactate Dehydrogenase", 2 nd International Bau-Drug Design Symposium, Nisan 2014, İstanbul.
13. **Sariyer E.**, Balık D., "Molecular Modelling of Enolase From *Trypanosoma cruzi* that Causes Chagas' Disease", International Symposium On Molecular Chemistry, 19 Aralık 2014, 1-1, İSTANBUL.
14. **Sariyer E.**, Balık D., "*Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enziminin homoloji modellemesi", XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2013, Aydın
15. **Sariyer E.**, Milward M., Cooper P.R., Balık D., "Purification and characterization of lactate dehydrogenase enzyme from *Fusobacterium nucleatum*", V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2013, Eylül 2013, Madrid.
16. **Sariyer E.**, Erdemir A., Milward M.R., Cooper P.R., Balık D., "Expression of Lactate Dehydrogenase Gene From *Fusobacterium nucleatum*", 38 th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013, 617-617, 6-11 Temmuz 2013, Saint Petersburg.
17. Yakarsönmez S., Çayır E., Milward M., Cooper P.R., **Sariyer E.**, Balık D., "Cloning And Sequence Analysis Of Enolase Gene From *Fusobacterium Nucleatum*", II. Uluslararası Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi, Kasım 2013, Antalya
18. **Sariyer E.**, Erdemir A., Milward M., Cooper P.R., Balık D., "*Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Klonlanması", 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Kasım 2012, Antalya.

Projeler

1. Theileriosis in tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilaç adayı tespit etmek için kumarin türevlerinin *Theileria annulata* nın enolaz enzimini inhibisyon potansiyelinin araştırılması, (Yıldız Teknik Üniversitesi BAPK) **Araştırmacı**, 01/10/2014 - 01/10/2016
2. *Bos taurus* Enolaz enzimininYapıya Dayandırılmış İlaç Tasarımı Yönünde Yapısal Moleküler ve Enzimatik Analizlerinin Yapılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, **Araştırmacı**, Yürütücü: BALIK DİLEK, 01/09/2015 - 26/09/2017 (TAGEM)
3. “*Bacteroides fragilis* Enolazının *In vitro* ve *in silico* Analizleri”, **Araştırmacı**, (Yıldız Teknik Üniversitesi BAPK) 18/05/2018-devam ediyor.

Ödül

1. TÜBİTAK kongre katılım bursu, XIII.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, TÜRKİYE, 2013