



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ARILKUMARİN TÜREVLERİNİN BETA-LAKTAMAZ VE
KARBAPENEMAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

BEYZA HAMUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Safiye ERDEM

EŞ-DANIŞMAN

Doç. Dr. Özkan Danış

İSTANBUL, 2019



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ARILKUMARİN TÜREVLERİNİN BETA-LAKTAMAZ
VE KARBAPENEMAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

BEYZA HAMUR
(520816007)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Safiye ERDEM

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. Özkan Danış

İSTANBUL, 2019



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



**INVESTIGATION OF ARYLCOUMARIN DERIVATIVES
FOR β -LACTAMASE AND CARBAPENEMASE ACTIVITIES**

BEYZA HAMUR
(520816007)

MASTER THESIS
Department of Chemistry

Thesis Supervisor
Prof. Dr. Safiye ERDEM

Thesis CO- Supervisor
Doç. Dr. Özkan Danış

ISTANBUL, 2019

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Beyza HAMUR'un "Arilkumarin Türevlerinin Beta-Laktamaz ve Karbapenemaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışması, 24 Mayıs 2019 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Safiye ERDEM
Marmara Üniversitesi

(Danışman)

Prof. Dr. Ayşe OGAN
Marmara Üniversitesi

(Üye)

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ÖZBİL
Arel Üniversitesi

(Üye)

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ^{12/06/2019} tarih ve ^{2019/12-02} sayılı kararı ile Beyza HAMUR'un Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Adı SOYADI

Prof. Dr. Bülent EKİCİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ortaya çıkan her türlü probleme getirmiş olduğu bakış açısı ve yaklaşımları ile bana yol gösteren, bir akademik çalışmanın nasıl yapılması gerektiğini öğreten ve kılavuzluk eden çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Safiye Sağ Erdem'e, Sayın Doç. Dr. Özkan Danış'a, Yüksek Lisans tez çalışmamı FEN-C-YLP-120418-0170 numaralı proje kapsamında destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tüm hayatım boyunca her daim desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve olacaklarını bildiğim canım aileme,

Lisans eğitiminden beri yanımda olan sevgili arkadaşlarım Gamze Koçal, İlknur Yıldız'a, ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen İlke Demir, Lalehan Özalp, Merve Eminoglu başta olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2019

Beyza HAMUR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
1.1 Giriş ve Amaç.....	1
1.2 Antibiyotikler	4
1.2.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırması.....	5
1.2.2 β -laktam Antibiyotikleri	6
1.3 Antibiyotik Direnci.....	9
1.3.1 Antibiyotik Direnç Mekanizması	10
1.4 β -laktamazlar ve Karbapenemazlar	12
1.4.1 Ambler Sınıflandırması: Moleküler Sınıflandırma	14
1.4.2 Bush ve Jacoby Sınıflandırması: Fonksiyonel Sınıflandırma	14
1.5 Serin β -laktamazlar.....	15
1.6 β -laktamaz İnhibitörleri	17
1.6.1 β -laktam Halkası İçeren İnhibitörler	17
1.6.2 Non β -Laktam β -Laktamaz İnhibitörler	18
1.7 Kumarinler.....	20
2.MATERYAL VE YÖNTEM	23
2.1 Moleküler Doking	24
2.1.1 Enzim Dosyalarının Hazırlanması.....	25
2.1.2 Ligand Dosyalarının Hazırlanması.....	26
2.1.3 Konfigürasyon (Config) Dosyasının Hazırlanması	29

2.1.4 Moleküler Doking İşlemi	29
2.1.5 Doking Sonuçlarının Görüntülenmesi	31
2.2 Moleküler Dinamik Simülasyon.....	31
2.2.1 MD Simülasyon Analizi	32
2.3 Arilkumarin Türevlerinin β -Laktamaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin <i>İn Vitro</i> Belirlenmesi	32
3.BULGULAR VE TARTIŞMA	35
3.1 Moleküler Doking Sonuçları	35
3.1.1 Enzim-ligand Bağlanma Etkileşimlerinin İncelenmesi	37
3.1.1.1 Sınıf A Doking Sonuçlarının İncelenmesi.....	37
3.1.1.2 Sınıf C Doking Sonuçlarının İncelenmesi	41
3.1.1.3 Sınıf D Doking Sonuçlarının İncelenmesi.....	43
3.2 Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları	47
3.2.1 Sınıf A KPC-2 İçin MD Sonuçları	47
3.2.2 Sınıf C AmpC İçin MD Sonuçları	52
3.2.3 Sınıf D OXA-1 İçin MD Sonuçları	56
3.3 <i>In Vitro</i> Analiz Sonuçları.....	58
SONUÇLAR.....	60
KAYNAKLAR.....	62
EKLER	70
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖZET

Arilkumarin Türevlerinin Beta-Laktamaz ve Karbapenemaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

β -laktam antibiyotikleri geniş spektrumları ve yüksek antibakteriyel etkileri nedeniyle en önemli ve yaygın olarak kullanılan antibiyotik sınıflarından biridir. Fakat son yıllarda β -laktama karşı görülen çoklu ilaç direncinin (MDR) artması ve genellikle β -laktama dirençli olan Gram negatif patojenlerin yaygınlaşması toplum sağlığını tehdit eder hale gelmiştir. Klinik olarak oldukça önemli olan bu bakterilerde görülen en yaygın direnç mekanizması, bu bakteriler tarafından üretilen β -laktamazlar ile β -laktam halkasının açılarak antibiyotik etkinin ortadan kaldırılmasıdır. β -laktama gösterilen bu direnç ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda görülen ölüm oranının her geçen gün artması sağlık otoritelerini alarm durumuna geçirmiştir. Karbapenemazlar ise, Ambler sınıflamasında A, B ve D sınıfı β -laktamaz içeren geniş bir enzim grubudur ve tedavi edilmesi zor enfeksiyonların hedef enzimleridir. Söz konusu dirence çözüm olarak, β -laktam antibiyotikleri ile birlikte β -laktamaz inhibitörleri olan klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam β -laktamazları inhibe etmek için kullanılmaktadır. Ancak bu inhibitörlerin enzime afiniteleri zayıftır ve ayrıca karbapenemazlar gibi yeni keşfedilen birçok β -laktamazı inaktif hale getiremezler. Bu nedenle, yeni etkili β -laktamaz inhibitörleri geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır.

Bu tezde, daha önce sentezlenmiş olan 39 arilkumarin türevlerinin doking yöntemi ile sınıf A, C ve D β -laktamazlara olan afiniteleri hesaplanmıştır. Bu enzimlere yüksek afinite gösteren bileşikler *in siliko* olarak taranmış ve β -laktamaz aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* biyokimyasal deneyler ile test edilmiştir. Her 3 enzim sınıfına karşı en yüksek afiniteyi gösteren ligandın enzim ile kompleksinin, moleküler dinamik (MD) simülasyonu incelenmiştir. *İn siliko* çalışmalar sonucunda, AmpC ve KPC-2 enzimleri için benzokumarin türevi A10 umut verici etkili bir inhibitör olarak bulunmuş ve ileriki çalışmalar için önerilmiştir.

Mayıs, 2019

Beyza Hamur

ABSTRACT

Investigation of Arylcoumarin Derivatives for β -Lactamase and Carbapenemase Activities

β -lactam derivatives are the most widely used antimicrobial agents due to their extended spectrum and high antibacterial effects. However, in recent years, the increase of multidrug resistance (MDR) seen against β -lactam and the spread of Gram negative pathogens, which are generally resistant to β -lactam drugs, have been threatening the public health. The most common resistance mechanism seen in these clinically important bacteria is the hydrolysis of the β -lactam ring by the β -lactamase produced by these bacteria and the elimination of the antibiotic effect. MDR and the rate of death related to the infections caused by these bacteria keep growing fast and the health authorities are on the alert. Carbapenemase enzymes are a large group of A, B, and D type β -lactamases being the target for difficult-to-treat infections. As a solution to the resistance, β -lactam antibiotics are often given with β -lactamase inhibitors clavulanate, tazobactam, sulbactam. However, the affinity of these inhibitors for the β -lactamase enzymes is weak and also many β -lactamases which have been discovered recently such as carbapenemases can not be inactivated by these inhibitors. Therefore, there is an urgent need to develop new efficient β -lactamase inhibitors.

In this thesis, the affinities of 39 previously synthesized arylcoumarin derivatives were calculated by molecular docking method for class A, C and D β -lactamases. Compounds with high affinity to these enzymes were screened *in silico* and their effects on β -lactamase activity were tested by *in vitro* biochemical experiments. The molecular dynamics (MD) simulations of the enzyme-ligand complexes showing the highest affinity in all 3 enzyme classes were investigated. As a result of *in silico* studies, benzocoumarin derivative A10 was proposed to be the most promising and efficient inhibitor for AmpC and KPC-2 enzymes for further studies.

May, 2019

Beyza Hamur

SEMBOLLER

Nm	: Nanometre
μL	: Mikrolitre
%	: Yüzde
μM	: Mikromolar
$^{\circ}$C	: Santigrad Derece
ns	: Nanosaniye
ΔG	: Reaksiyon Serbest Enerji Değişimi
Kcal	: Kilokalori
π	: Pi
Å	: Angstrom

KISALTMALAR

β-laktam	: Beta-laktam
MDR	: Çoklu İlaç Direnci
β-laktamaz	: Beta-laktamaz
MD	: Moleküler Dinamik
PBP	: Penisilin Bağlayan Proteinler
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
GSBL	: Geniş Spektürlü Beta-laktamaz
γ-lakton	: Gama-lakton
ADME	: Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Ekskresyon
KPC-2	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenamaz-2
OXA-1	: Oksasilinaz-1
t-RNA	: Taşıyıcı Ribo Nükleik Asit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
PG	: Peptidoglikan
MRSA	: Metisiline dirençli olan <i>S aureus</i>
GHSA	: Küresel Sağlık Güvenliği Gündemi
<i>Klebsiella spp.</i>	: <i>Klebsiella</i> türleri
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
MBL	: Metallo β -laktamaz
<i>A. baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BLI	: Beta-laktamaz İnhibitörleri
CADD	: Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
ADMET	: Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Ekskresyon, Toksikite
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PDB	: Protein Data Bank
Ser	: Serin
Asn	: Aspaarajin
Lys	: Lizin
Thr	: Treonin

Tyr : Tirozin
Leu : Lösín
PM6 : Paramtrik method 6
DMSO : Dimatil Sulfoksit



ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1	β -laktam halkası	7
Şekil 1.2	Penisilinlerin ana iskeleti	7
Şekil 1.3	Sefalosporinlerin ana iskeleti	8
Şekil 1.4	Aztreonam yapısı ve monobaktam ana iskeleti.....	8
Şekil 1.5	Karbapenemlerin ana iskeleti	9
Şekil 1.6	Serin β -laktamazların, β -laktam halkasını hidroliz mekanizması.....	13
Şekil 1.7	KPC üreten <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın epidemiolojik özellikleri	16
Şekil 1.8	Klavulanat, Tazobaktam, Sulbaktam yapıları	18
Şekil 1.9	Avibaktam yapısı	19
Şekil 1.10	Relebaktam yapısı	19
Şekil 1.11	Nacubaktam, Zidebaktam yapıları	20
Şekil 1.12	Vaborbaktam (RPX7009)	20
Şekil 1.13	Kumarin halkası	21
Şekil 1.14	Aurapten	21
Şekil 1.15	β -laktamızı inhibe eden γ -lakton bileşiği	22
Şekil 2.1	KPC-2 (1.85Å) AmpC (1.94Å) OXA-1 (1.4Å) kristal yapıları.....	25
Şekil 2.2	AutoDock Vina programı kullanılarak KPC-2(2ov5), AmpC(1L2S) ve OXA-1(3ISG) için hazırlanan konfigürasyon dosyaları	30
Şekil 2.3	KPC-2 (PDB: 2OV5) kristal yapısındaki inhibitörün (bicine) pozunun doking sonrası elde edilen poz ile karşılaştırılması (RMSD: 1.44).....	30
Şekil 2.4	AmpC (PDB: 1L2S) kristal yapısındaki inhibitörün (3-[(4-kloroanilino)sulfonil]tiyofen-2-karboksilik asit) pozunun doking sonrası elde edilen poz ile karşılaştırılması (RMSD: 1.85)	30
Şekil 2.5	OXA-1 (PDB:3ISG) kristal yapısındaki inhibitörün (doripenem, β -laktam halkasının açık hali) pozunun doking sonrası elde edilen poz ile karşılaştırılması (RMSD:1,536).....	30
Şekil 2.6	β -laktamaz inhibitör tarama kitindeki enzim-substrat tepkimesi.....	33
Şekil 3.1	A6 bileşiğinin KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	38
Şekil 3.2	A10 bileşiğinin KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	39

Şekil 3.3 16 bileşiğinin KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	40
Şekil 3.4 29 bileşiğinin KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	41
Şekil 3.5 A5 bileşiğinin AmpC'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	42
Şekil 3.6 A6 bileşiğinin AmpC'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	42
Şekil 3.7 A10 bileşiğinin AmpC'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	43
Şekil 3.8 A5 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	44
Şekil 3.9 A6 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	45
Şekil 3.10 A10 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu..	45
Şekil 3.11 16 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	46
Şekil 3.12 29 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu	47
Şekil 3.13 KPC-2 için ligand molekülünün RMSD grafiği	48
Şekil 3.14 KPC-2 için RMSD grafiği.....	49
Şekil 3.15 KPC-2-ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns'lerdeki görüntüleri....	50
Şekil 3.16 KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile A10 ligandı arasındaki H bağı sayısı grafiği.	51
Şekil 3.17 SER70 aminoasit kalıntısı ile A10 ligand molekülünün H bağı grafiği	51
Şekil 3.18 AmpC için ligand molekülünün RMSD grafiği	52
Şekil 3.19 AmpC için RMSD grafiği	53
Şekil 3.20 AmpC-ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns'lerdeki görüntüleri	54
Şekil 3.21 AmpC'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile A10 ligandı arasında oluşan H bağı sayısı grafiği	55
Şekil 3.22 SER64 aminoasit kalıntısı ile A10 ligand molekülünün H bağı grafiği	55

Şekil 3.23 OXA-1 için ligand molekülünün RMSD grafiği.....	56
Şekil 3.24 OXA-1-ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns'lerdeki görüntüleri ...	57
Şekil 3.25 OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile A10 ligandı arasında oluşan H bağ sayısı grafiği	58
Şekil 3.26 β -Laktamaz aktivitesi ve aktivite üzerine %1 konsantrasyonda DMSO'nun etkisi	59



TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 2.1 KPC-2, AmpC ve OXA-1 enzimlerinin aktif bölgesinde yer alan ve esnek olarak seçilen amino asitler	25
Tablo 2.2 Benzokumarin türevleri.....	26
Tablo 2.3 3-arilkumarin türevleri.....	27
Tablo 2.4 4-arilkumarin türevleri.....	28
Tablo 2.5 Diğer kumarin türevleri	28
Tablo 3.1 Arilkumarin türevlerinin KPC-2, AmpC ve OXA-1 enzimlerine bağlanma enerjileri.....	36
Tablo 3.2 Arilkumarin türevlerinin ve klavulanik asidin β -Laktamaz aktivitesi üzerindeki % inhibisyon değerleri.....	59

1.GİRİŞ

1.1 Giriş ve Amaç

Enfeksiyon hastalıkları her zaman toplum sağlığını tehdit eden en büyük sorunlardan biri olmuştur. Bakteriler, virüsler, funguslar ve parazitler gibi çeşitli mikroorganizmalar enfeksiyon hastalıklarına sebep olurlar. Antibiyotikler ise bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyel ajanlardır. Antibiyotikler hastalığa sebep olan bakterilerin büyümesini durdurarak ya da öldürerek, bağışıklık sistemini desteklerler. Antibiyotikler sentetik olarak elde edilebildikleri gibi biyolojik kaynaklı da olabilen, çok etkili biyoaktif maddelerdir (Fernandes ve Martens, 2017; Topal ve ark., 2015). İnsan ve hayvan enfeksiyonlarında tedavi amacı ile kullanılan antibiyotikler, ayrıca günümüzde hayvanlarda büyüme destekleyici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Topal ve ark., 2015).

Tarihte bilinen ilk antibiyotik olan penisilin, İngiliz bakteriyolog Alexander Fleming tarafından Eylül 1929 yılında tesadüfen bulunmuştur (Fleming, 1929; Fernandes, 2006; Fernandes ve Martens, 2017) ve bu keşif ile antibiyotiklerin altın çağı başlamıştır (Fernandes ve Martens, 2017). 1935 yılında ise ilk sentetik antibiyotik olan Prontosil (Sulfamidochrysoidin), Alman kimyacı Gerhard Domark tarafından sentezlenmiştir. Günümüzde kullanılan antibiyotiklerin pek çoğu da penisilin keşfinden sonra, antibiyotiklerin altın çağı olarak bilinen dönemde bulunmuştur. 1930'larda antibiyotik döneminin başlangıcından bu yana, β -laktam, sülfonamidler, aminoglikozit, makrolid, linkosamidler, tetrasiklinler dahil olmak üzere sayısız antibiyotik sınıfının başarılı terapötik uygulamaları ile toplum sağlığı korunmuştur (Fernandes, 2006; Fernandes ve Martens, 2017; Topal ve ark., 2015). Antibakteriyel ilaçlar çok etkili olmalarına rağmen son yıllarda bakterilerde görülen antibiyotik direnci endişe vericidir. Bu antibiyotik direnci önceleri hastane ortamında ortaya çıksada günümüzde sık sık toplumda görülmeye başlanmıştır (Munita ve Arias, 2016). Bu direncin giderek artması antibiyotik çağından önceki döneme geri dönüleceğine dair endişelerin artmasına neden olmuştur. Antimikrobiyel direncin giderek yaygınlaşıp küreselleşmesi üzerine, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2014 yılında küresel bir rapor yayınlamıştır. Bu raporda özellikle antibakteriyel dirence dikkat çekilmiştir (WHO, 2014).

β -laktamlar, antibiyotik çağının başlangıcından beri en başarılı antibakteriyel ajanlar olmuşlardır. Bakteriler, en etkili antibiyotikler olan β -laktamlara karşı da direnç göstermektedir. Bu direnç Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde sıklıkla görülmektedir. Özellikle, tedavi seçeneklerindeki sınırlamalar nedeniyle Gram negatif bakterilerde görülen direncin hızla artması toplum sağlığını ciddi ölçüde tehdit etmektedir (Bush, 2010).

β -laktam antibiyotiklerine karşı görülen direnç 3 yolla gelişmektedir.

- 1) PBP'lerde (Penisilin bağlayan proteinler) oluşan değişiklikler ile antibiyotiğin bu proteinlere bağlanmasının engellenmesi.
- 2) Gram negatif bakterilerde aktif pompa sistemleri ile ilacın hücre içine etkin konsantrasyonda girişinin önlenmesi veya atılması.
- 3) Bakteri tarafından üretilen β -laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi.

β -laktam antibiyotiklerine karşı oluşan direncin en sık görülen nedeni ise β -laktamaz enzimleri ile antibiyotik etkisinin yok edilmesidir (Essack, 2001; Wilke ve ark., 2005; Bush ve Jacoby, 2010). β -laktamazların yaygın sınıflandırmalarından biri olan Ambler sınıflandırmasında, β -laktamazları dört sınıfa (A, B, C ve D) ayrılır (Hall ve Barlow 2005). Karbapenemazlar ise Ambler sınıflamasında A, B ve D sınıfı β -laktamazlara dahil olan büyük bir enzim grubudur (Queenan ve Bush 2007).

27 şubat 2017 yılında dünya sağlık örgütü (WHO), aşağıda listelenen antibiyotiğe dirençli “öncelikli patojenler” listesini yayınlamıştır. Bu liste insan sağlığına en büyük zararı teşkil eden 12 bakteri familyasından oluşmuştur. Özellikle Gram negatif bakterilerin çoklu ilaç direncine (MDR) sebep olduğu ve halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturduğu listede vurgulanmıştır.

‘WHO öncelikli patojenler listesi’

Öncelik 1: Kritik

1. *Acinetobacter baumannii*, karbapenem dirençli
2. *Pseudomonas aeruginosa*, karbapenem dirençli
3. *Enterobacteriaceae*, karbapenem dirençli, GSBL üreten

Öncelik 2: Yüksek

1. *Enterococcus faecium*, vankomisine dirençli
2. *Staphylococcus aureus*, metisiline dirençli, vankomisin-ara ve dirençli

3. *Helicobacter pylori*, klaritromisin dirençli
4. *Campylobacter* spp., Fluorokinole dayanıksız
5. *Salmonella*, florokinole dayanıklı
6. *Neisseria gonorrhoeae*, sefalosporine dirençli, fluorokinole dayanıksız

Öncelik 3: Orta

1. *Streptococcus pneumoniae*, penisiline duyarlı olmayan
2. *Haemophilus influenzae*, ampisiline dirençli
3. *Shigella* spp., Fluorokinole dayanıksız

Bu listede dikkat çeken ise kritik seviyede bulunan bakteri familyalarının, karbapenem dirençli olması ve bu bakteri familyalarında giderek artan şekilde β -laktamaz enzimleri görülmesidir.

Uzun zamandır, bu dirençle savaşmak ve β -laktamaz enzimlerini inhibe etmek için β -laktamaz inhibitörleri olan klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam β -laktam antibiyotikleri ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır. (Bonomo ve Drawz, 2010). Fakat bakteriler, çevrelerinde meydana gelen değişikliklere uyum sağlama ve cevap verme yeteneklerinden dolayı bu kombinasyonların aşırı tüketimi sonucunda, direnç geliştiren genlerde mutasyonlar yaparak, antibiyotik ve inhibitör kombinasyonlarına karşı da dirençli hale gelmişlerdir. Bu mutasyonlar sonucunda, β -laktamaz inhibitörlerinin enzime afinitelerinin zayıfladığı ve yeni keşfedilen birçok β -laktamazı inaktif hale getiremediği bulunmuştur. (Thomson ve ark., 1990; Watkins ve ark., 2013).

Yeni keşfedilen β -laktamaz inhibitörleri avibaktam ve vaborbaktam gibi inhibitörler yapılarında β -laktam halkası içermeyen non β -laktam β -laktamaz inhibitörlerdir (Tehrani ve Martin, 2018). Yapılan bir çalışmada, 7-preniloksi kumarinlerin sınıf A β -laktamazlar için güçlü ve seçici inhibitörler olduğu bulunmuştur (Safdari ve ark., 2014). Bir diğer çalışmada ise non β -laktam olan iki γ -lakton bileşiğinin çeşitli β -laktamazları inhibe ettiği keşfedilmiştir (Gál ve ark., 2000). Söz konusu bulgular, bazı kumarin türevlerinin non- β -laktam yapılı, β -laktamaz inhibitörleri olabileceklerini göstermektedir. Ancak, bahsedilen çalışmaların dışında literatürde kumarinlerin β -laktamazlar üzerine etkilerine ait yayınlara rastlanmamıştır.

Yukarıdaki bilgilerden yeni β -laktamaz inhibitörlerine çok acil ihtiyaç olduğu açıkça görülmektedir. Kumarin türevi bileşiklerin ise antikanser, antimikrobiyal, antioksidant ve antikoagulan özellikleri başta olmak üzere pek çok farmakolojik özelliklere sahip

oldukları bilinmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, yakın zamanda bölümümüzde sentezlenen ve çoğu arilkumarin türevi olan 39 bileşik taranmıştır. Söz konusu bileşiklerin daha önce ADME özellikleri de araştırılmış ve arzu edilen kriterleri sağladıkları görülmüştür (Danis ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasının amacı çeşitli kumarin türevlerinin β -laktamazları inhibe etme potansiyellerini *in siliko* ve *in vitro* yöntemlerle araştırmaktır. Akılcı ilaç tasarımında, hesaplamalı ve deneysel stratejilerin entegrasyonu yeni umut verici bileşiklerin tanımlanması ve geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. Bu tezde, karbapenem dirençli bakterilerin birinci derecede kritik öneme sahip olması nedeniyle, özellikle karbapenemaz enzimine odaklanılmıştır. Hedef β -laktamazlar olarak sınıf A grubundan *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz-2 (KPC-2), sınıf C grubundan AmpC ve sınıf D grubundan oksasilinaz-1 (OXA-1) seçilmiştir. Bu enzim sınıflarının hepsinde aktif bölgelerinde bulunan serin aminoasiti önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, tez çalışmasında sınıf A, C, D serin β -laktamaz enzimleri seçilmiştir.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının hedefleri şunlardır:

- 1) Kumarin bileşiklerinin β -laktamaz ve karbapenemaz enzimlerine bağlanma potansiyellerini önce moleküler doking yöntemi ile taramak.
- 2) Bağlanma afinitesi yüksek olan bileşikleri tespit etmek ve *in vitro* olarak β -laktamaz kiti kullanılarak biyokimyasal testler yapmak.
- 3) Yüksek bağlanma afinitesi belirlenen bileşiklerin ligand-enzim komplekslerinin kararlılıklarını moleküler dinamik (MD) simülasyonu ile incelemek.

KPC-2, AmpC ve Oxa-1 β -laktamazlara ait henüz standart protokol bulunmadığından bu enzimler şimdilik yalnızca *in siliko* moleküler doking ve moleküler dinamik (MD) simülasyonu yöntemi ile çalışılarak bu enzimler ile yüksek afinite gösterebilecek potansiyel arilkumarin türevi önerilmiştir.

Bu tez çalışması ile dünyada giderek büyük bir sorun haline gelen ve küreselleşen, sınırlı tedavi seçeneğinden dolayı ölüm oranı yüksek olan Gram negatif bakterilerin neden olduğu çoklu ilaç direnci ile mücadele için katkı sağlanması beklenmektedir.

1.2 Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede kullanılan en önemli ilaçlardır. Yunanca anti (karşı) ve bios (yaşam) kelimelerinin bir araya gelmesi ile antibiyotik kelimesi türemiştir. Bazı antibiyotikler hastalığa sebep olan bakteriyi tamamen öldürürken, bazıları ise hastalığa sebep olan bakterinin büyümesini engelleyerek bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi ederler. Bakterileri doğrudan öldüren antibiyotiklere bakterisidal, büyümesini engelleyen antibiyotiklere ise bakteriyostatik denir (Etebu ve Ariekpar, 2016; Kohanski ve ark., 2010).

Bazı antibiyotikler, sadece kısıtlı sayıdaki bakteri türüne etki ederler. Bu tür antibiyotiklere 'dar spektrumlu antibiyotikler' denir. Bu antibiyotikler hastalığa neden olan bakteri türünün saptanabildiği durumlarda kullanılabilirler. Vücudumuzda bulunan yararlı diğer bakterileri öldürmemesi, bu antibiyotiklerin tercih edilme sebebidir. Bazı antibiyotikler ise pek çok bakteri türüne etki ederler ve 'geniş spektrumlu antibiyotikler' olarak adlandırılırlar. Bu tür antibiyotikler hastalığa neden olan bakteri tam olarak saptanamadığı veya pek çok farklı patojenin bir arada bulunması durumunda tercih edilirler (Acar, 1997). Penisilinin keşfi ve sanayileşmenin artmasıyla pek çok antibiyotik keşfedilerek, günümüzde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin sınıflandırmasının bir kaç yolu vardır. En yaygınları; moleküler yapıları, etki mekanizmaları ve spektrum etkinliklerine göre yapılan sınıflandırmalardır (Etebu ve Ariekpar, 2016).

1.2.1 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotiklerin en yaygın sınıflandırılması etki mekanizmalarına göre yapılan sınıflandırmadır. Etki mekanizmalarına göre antibiyotikler 6 sınıfa ayrılır.

- 1) Bakterinin hücre duvarı sentezinin inhibisyonu; β -laktam ve glikopeptit antibiyotikleridir. Bu antibiyotik sınıfı hücre duvarı biyosentezinde spesifik adımlara etki ederek, hücre şekli ve büyüklüğünde değişikliklere neden olur. Hücresel stres tepkilerini indükler ve hücre liziz olur.
- 2) Protein sentezinin inhibisyonu; Protein sentezini inhibe eden ilaçlar, en geniş antibiyotik sınıfları arasındadır. İki alt sınıfa ayrılır: 50S inhibitörler ve 30S inhibitörleri.

50S ribozom inhibitörler, makrolid, linkosamid, streptogramin, amphenicol, oksazolidinon antibiyotikleridir. Ribozomun 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini durdururlar. Makrolid, linkosamid ve streptogramin antibiyotikleri ise t-RNA ile etkileşime girer ve peptidil transferazı inhibe ederek ribozom ile etkileşimini bloke ederler.

30S ribozom inhibitörler, tetrasiklin ve aminosiklitol antibiyotikleridir. Aminosiklitol antibiyotikleri, ribozomun 30S alt birimine geri dönüşümsüz bağlanırlar ve protein sentezini durdururlar. Tetrasiklinler ise t-RNA'yı bloke ederek ribozom ile etkileşimine engel olurlar.

3)DNA sentezi inhibitörleri; Florokinolonlar ve Metronidazol antibiyotikleridir. DNA enzimlerini hedefleyen bu antibiyotik sınıfı, bu enzimleri DNA bölünmesi aşamasında yakalar ve yeniden birleşmesini önlerler. Böylece replikasyonu inhibe ederler.

4)RNA sentezi inhibitörleri; rifampisin antibiyotikleridir. DNA'ya bağlı ve aktif olarak transkripsiyon yapan RNA polimeraz enziminin alt birimine bağlanarak, mRNA sentezini önler.

5) Mikolik Asit sentezi inhibitörleri; İzoniazid antibiyotikleridir. Bakterinin metabolizması için gerekli olan mikolik asitin sentezini önlerler.

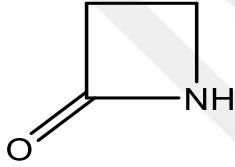
6) Folik Asit sentezi inhibitörleri; Sülfonamidler, trimethoprim antibiyotikleridir. Bakterinin metabolizması için gerekli olan folik asitin sentezini engeller (Kohanski ve ark., 2010, Moore, 2016).

1.2.2 β -laktam Antibiyotikleri

β -laktam antibiyotikleri, etkinlik ve güvenliklerinden dolayı en yaygın olarak kullanılan antibiyotik sınıfıdır. Penisilin keşfinden sonra, pek çok penisilin türevinin de içinde bulunduğu büyük bir antibiyotik grubudur (Ruben ve ark., 2013; Bush ve Bradford, 2016). β -laktam antibiyotikleri, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde, penisilin bağlayan proteinlere (PBP) kovalent olarak bağlanırlar ve bu proteinler tarafından katalize edilen peptid bağ oluşum reaksiyonunu inhibe ederek, peptidoglikan (PG) birimlerinin çapraz bağlanmasını bloke ederler. Böylece hücre duvarı oluşumu engellenir ve bakteri lizise uğrar. Bu mekanizmanın PBP'lerin aktif bölgesinde bulunan serin aminoasit kalıntısına, antibiyotiklerin bağlanmasıyla oluştuğu bilinmektedir

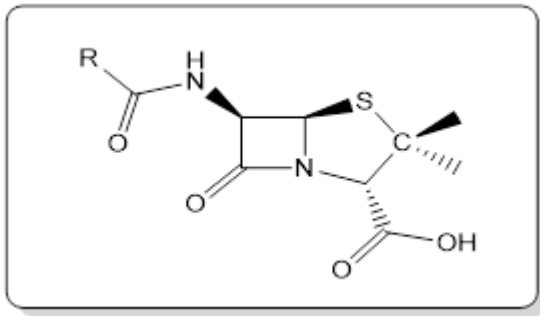
(Kohanski ve ark., 2010; Bush ve Bradford, 2016). Moleküler ağırlıklarına göre PBP'ler, 1-4 arası rakamlar ile adlandırılırlar. Birden fazla PBP aynı molekül ağırlığına sahip olması durumunda rakamların yanına harfler eklenir (PBP 1a gibi). Değişik β -laktamların farklı PBP'lere bağlanma afiniteleri ve etkiledikleri ilaç düzeyleri birbirinden farklıdır. Bu durum β -laktam antibiyotiklerin antibakteriyel etkinliklerinin neden birbirinden farklı olduğunu kısmen açıklayabilir (Gülay, 2001).

Bu grup içerisinde yer alan antibiyotik grupları; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemlerdir. Bu antibiyotik sınıfının ortak özellikleri ise tümünün yapısında β -laktam halkası (Şekil 1.1) bulunması ve etki mekanizmalarının aynı olmasıdır (Ruben, 2013).



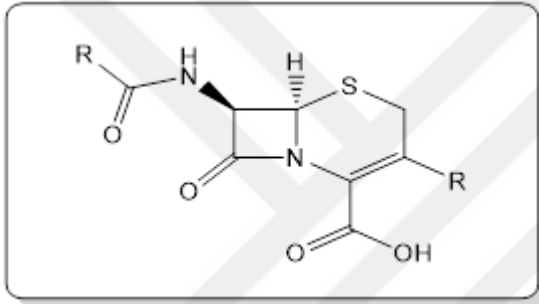
Şekil 1.1 β -laktam halkası

Penisilinler; Penisilin 1928 yılında, Alexander Fleming tarafından keşfedilen ilk antibiyotiktir. Başlarda doğal olarak elde edilsede sentetik olarak da pek çok penisilin türevi ilaçlar geliştirilmiştir. Penisilin sınıfı üyeleri arasında penisilin G, penisilin V, oksasilin (dikloxasilin), metisilin, nafilin, ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, piperasilin, mezlosilin ve ticarsilin antibiyotikleri vardır (Etebu ve Arikekpar, 2016). Gram pozitif ve negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılan penisilinlerin yapılarında ortak olarak, bir β -laktam halkası ve bir tiazolidin halkası vardır (Şekil 1.2) (Nathwani ve Wood 1993).



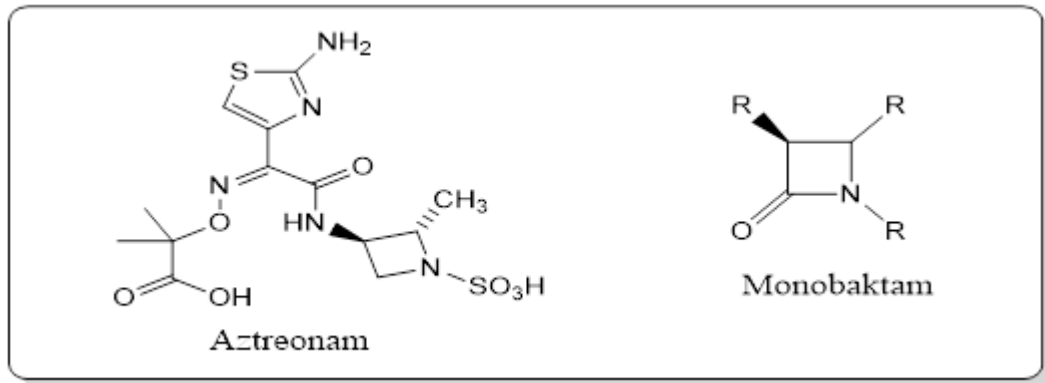
Şekil 1.2 Penisilinlerin ana iskeleti

Sefalosporinler; 1970'den beri yaygın olarak kullanılan sefalosporinler en etkili antibiyotik sınıflarındandır (Şekil 1.3) (Ruben ve ark., 2013). Penisilinler ile benzer yapıya sahip olan sefalosporinlerin etki mekazması β -laktam antibiyotikleri ile aynıdır. Sefalosporinler, *E. coli* gibi yaygın gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Ancak metisiline dirençli olan *S. aureus* (MRSA) gibi bakteriler sefalosporinlere karşı dirençlidir (Harrison ve Bratcher, 2008). Sefalosporinler genel olarak antibakteriyel etkinliklerine göre 5'e ayrılır nesil başlığı ile gruplandırılır. Genel olarak düşük nesil (1. Nesil, 2. Nesil) sefalosporinler daha çok Gram pozitif bakterilerde, yüksek nesil (4. Nesil, 5. Nesil) sefalosporinler ise gram-negatif bakterilerde etkilidir (Harrison ve Bratcher, 2008; Ruben ve ark., 2013).



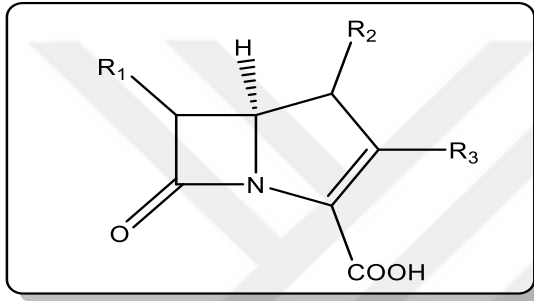
Şekil 1.3 Sefalosporinlerin ana iskeleti

Monobaktamlar; monosiklik β -laktam halkasına sahip olan antibiyotiklerdir ve bu yüzden monosiklik β -laktamlar olarak bilinirler. Bu antibiyotik sınıfında klinik olarak kullanılan ilk antibiyotik aztreonamdır (Şekil 1.4). Gram negatif bakterilere karşı etkili olan monobaktamlar, gram pozitif bakterilere ve anaeroblara karşı etkili değildir (Ruben ve ark., 2013; Sykes ve Bonner, 1985).



Şekil 1.4 Aztreonam yapısı ve monobaktam ana iskeleti

Karbapenemler; yüzlerce farklı β -laktam antibiyotikleri içinde en geniş etki alanına sahip olan gruptur (Şekil 1.5). Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı en yüksek etkiye sahiptirler. Bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda, hastalar ağır hastalandığında veya vücudunda dirençli bakteri bulunduğundan şüphelenildiği durumlarda “son çare antibiyotik” olarak sıklıkla kullanılırlar. Klinik olarak ilk kullanıma giren karbapenem antibiyotiği imipenem, daha sonra kullanıma giren ise meropenemdir (Krisztina ve ark., 2011, Bush ve Bradford, 2016). Daha geniş spektrumlu ve daha kararlı karbapenemler olan biapenem, ertapenem ve doripenem antibiyotikleri sonradan klinik kullanıma girmiştir.



Şekil 1.5 Karbapenemlerin ana iskeleti

Son zamanlarda çoklu ilaç dirençli (MDR) patojenlerin ortaya çıkması, bu hayat kurtarıcı antibiyotik sınıfının etkisini yok etmekte ve halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Özellikle en yüksek etkiye sahip olan ve bu özelliklerinden dolayı son çare antibiyotik olarak kullanılan karbapenemlere karşı görülen direnç, dünya genelinde sıklıkla görülmekte ve toplum sağlığı için büyük bir sorun oluşturmaktadır (Krisztina ve ark., 2011; Codje ve Donkor, 2018).

1.3 Antibiyotik Direnci

Bakteriler, antibiyotik moleküllerin varlığı da dahi olmak üzere varlıklarını tehlikeye atabilecek çeşitli çevresel tehditlere cevap vermelerini sağlayan olağanüstü bir genetik yapıya sahiptir. Antibiyotiklerin etkili bir şekilde bakteriyel büyümeyi durdurma kabiliyetini yitirdiği durumlarda ‘antibiyotik direnci’ meydana gelir ve bakteriler antibiyotiklerin varlığında çoğalmaya devam ederler. Antibiyotiklerin varlığında bile çoğalan bu bakterilere, dirençli bakteriler adı verilir (Zaman ve ark., 2017). Bakterilerde görülen bu direnç doğal ya da edinsel olabilir. Doğal yoldan kazanılan direnç, genellikle

bileşimin etki mekanizmasıyla ilişkili (gen)lerdeki mutasyonlarla olur. Edinsel direnç ise aynı veya farklı türdeki bakteriden, direnç mekanizmasını kodlayan genin yatay gen transferi yoluyla alınması ile olur (MacGowan ve Macnaughton, 2017; Munita ve Arias, 2016).

Antibiyotiklerin geçmişlerine bakıldığında başarısızlıkları az olan bu ajanlara karşı direncin artması, küresel bir endişe haline gelmiştir. Geçmişte bir antibiyotik başarılı olmadığı durumda bir diğeri kullanılabilirdi. Fakat günümüzde bu direnç giderek artmakta ve yeni ilaç keşifleri olmadan bu direncin üstesinden gelmek oldukça zorlaşmıştır. (MacGowan ve Macnaughton, 2017). Direnç tek bir antibiyotik ile sınırlı kalmayıp diğere benzer yapıdaki antibiyotiklere karşı da görülebilir. Bakteriler zamanla çoklu ilaç direncine sahip olup, farklı antibiyotik sınıflarına karşı dirençli hale gelebilirler. Bu durumun bir sonucu olarak, günümüzde bu direnç sadece hastane enfeksiyonlarının da değil toplumda da sıklıkla görülmeye başlanmıştır (Zaman ve ark., 2017).

Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda yaygın bir şekilde antibiyotik direncinin görülmesinin yanı sıra, Gram negatif bakterilerde de direnç giderek artan şekilde görülmektedir. (Bush, K., 2010). Özellikle en güçlü antibiyotik grubu olan karbapenemlere karşı *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* gibi Gram negatif bakterilerde görülen direnç dünya çapında artmakta ve toplum sağlığı için tehdit oluşturmaktadır (Codje ve Donkor, 2018). *Enterobacteriaceae* familyası, toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların ana kaynağıdır. İnsanlar arasında kolayca yayılabilir (el, bulaşık, yiyecek ve su) ve genetik materyalleri yatay gen transferi yoluyla elde edebilirler (Nordmann ve ark., 2011).

Küresel Sağlık Güvenliği Gündemi (GHSA) Şubat 2014'te bulaşıcı hastalık salgınlarını önleme, tespit etme ve bu salgınlarla mücadele etme çabalarını küresel çapta artırmak için 5 yıllık bir plan başlatmıştır (Toner ve ark., 2015). Dünya sağlık örgütü (WHO), 2014 yılında antimikrobiyel direnç ile ilgili bir rapor yayınlamış ve giderek büyük bir tehdit haline gelen antibakteriyel dirence dikkat çekmiştir (WHO, 2014). Ve yine Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotik direncine karşı harekete geçilmediği takdirde küçük yaralanmaların dahi ölümle sonuçlanabileceği konusunda uyarıda bulunmuştur (WHO, 2017). Tüm bunlar antibiyotik direncinin toplum sağlığı için ne kadar büyük bir tehdit oluşturduğunu gözler önüne sermektedir.

1.3.1 Antibiyotik Direnç Mekanizması

Bakteriler, antimikrobiyal moleküller tarafından öldürülmelerini ya da büyümelerinin durdurulmasını önlemek için antibiyotik direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç mekanizmasını anlamak, bu sorunla mücadele için son derece önemlidir.

Antibiyotik direnç mekanizmalarının kapsamlı sınıflandırması için, dirence neden olan biyokimyasal yolların bilinmesi gerekir. Bu biyokimyasal yollar; antibiyotiğin hedefine ulaşmasının önlenmesi (antibiyotiğin hücre içine alınımı azaltarak veya bileşiğin aktif olarak atılması), hedef bölgelerin değişmesi, antimikrobiyal molekülün modifikasyonları, olarak kategorize edilebilir. (Munita ve Arias, 2016)

a) Antibiyotiğin hedefine ulaşmasının önlenmesi; bu mekanizma 2 yolla olur.

1)Azalan geçirgenlik; antibiyotiklerin etki edebilmesi için dış ve/veya sitoplazmik membrana nüfus etmeleri gerekir. Örneğin β -laktam antibiyotikleri PBP'lere bağlanabilmek için sitoplazmik zarın dış yüzüne ulaşırlar. Fakat gram negatif bakterilerin dış zarında yarı geçirgen bir engel, içi su dolu bir kanal olan porinler vardır. Antibiyotik molekülleri gibi hidrofilik moleküller dış zardan ancak porinler aracılığı ile geçebilir. Bu kanallardan geçen β -laktam antibiyotik molekülleri PDB'lere bağlanabilir. Ancak porinlerde meydana gelen değişiklikler, antibiyotiklerin dış zardan girişini engellemektedir. Porin değişiklikleri genelde 3 yolla olur; porin tipinde bir değişiklik, porin ekspresyon seviyesindeki bir değişiklik ve porin fonksiyonunda bozulma. Bu mekanizmaların herhangi biri vasıtasıyla meydana gelen zarın geçirgenliğindeki değişiklikler, genellikle düşük seviyeli dirence neden olur. β -laktam antibiyotiklerin çoğu hidrofilik yan zincirler içerdiklerinden dolayı porin proteinlerindeki değişimlerden etkilenmekte ve bu durum antibiyotik direncine neden olmaktadır (Munita ve Arias, 2016; Gülay, 2001).

2)Aktif (akış/ efluks) pompa sistemi; hücreden antibiyotik atan ve düşük hücre içi aktif madde konsantrasyonunu koruyan zar proteinlerine akış pompaları denir. Bu pompalar antibiyotikleri hedeflerine ulaşmadan önce hücreye girdikleri hızla hücre dışına pompalarlar (Kapoor ve ark., 2017). İlk defa 1980 yılında *E.coli*'de tanımlanan pompa

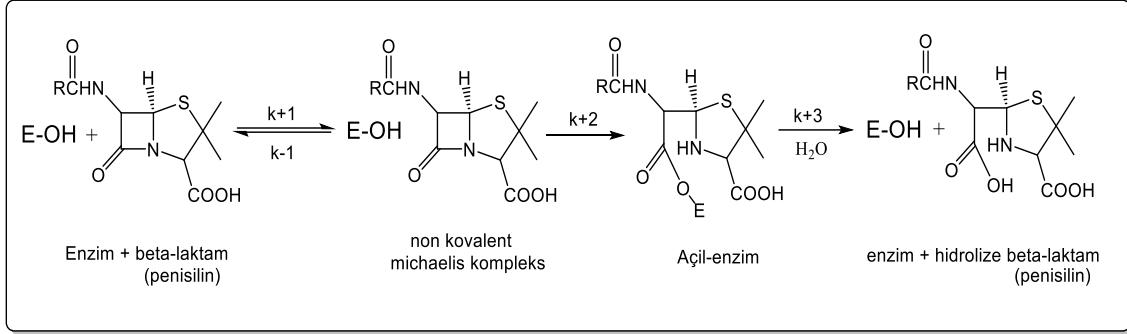
sistemi, o zamandan beri hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde tanımlanmıştır. Bu sistemler substrata özgü olabilirler veya MDR gösteren bakterilerde geniş substrat spesifikliğine sahip olabilirler (Munita ve Arias, 2016).

b) Hedef bölgelerin değişmesi; bakterilerde antibiyotiğe karşı görülen direncin sebeplerinden biri de, hedef bölgelerindeki değişiklikler ile antibiyotiğin etkilerinden kendilerini korumalarıdır. Bu amaçla bakteriler ya antibiyotiğin hedef bölgeye bağlanmasını engelleyerek hedef bölgeyi korurlar ya da hedef bölgenin antibiyotik molekülüne için afinite azalmasına neden olan modifikasyonlar yaparlar (Munita ve Arias, 2016). Hedef molekül ile antibiyotik etkileşimi genellikle oldukça spesifik olduğundan, hedef moleküldeki ufak bir değişikliğin, antibiyotiğin bağlanması üzerinde önemli bir etkisi olur. Örneğin; β -laktam antibiyotikleri için PBP'lerdeki ufak bir değişim sonucunda antibiyotiğin bağlanamaması, antibiyotiklere karşı görülen dirençte önemli bir mekanizmadır. Penisilin bağlayan proteinde mutasyonun varlığı, β -laktam antibiyotiklere afinitenin azalmasına neden olur (Gülay, 2001; Kapoor ve ark., 2017).

c) Antimikrobiyal molekülün modifikasyonları; Bakteriler tarafından antimikrobiyel moleküller üzerinde kimyasal modifikasyonlar gerçekleştiren enzimlerin ekspresyonu, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde iyi bilinen bir antibiyotik direnç mekanizmasıdır. β -laktamazlar, aminoglikozit modifiye edici enzimler ve kloramfenikol asetil transferazlar gibi antibiyotikleri etkisizleştiren üç ana enzim vardır (Kapoor ve ark. 2017)

1.4 β -laktamazlar ve Karbapenemazlar

β -laktamazlar, β -laktam halkasının amid bağını hidroliz ederek, β -laktam antibiyotiklerinin etkilerini inaktive ederler (Şekil 1.6). Bu direnç mekanizması, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin, β -laktam antibiyotiklerine karşı gösterdiği direncin ana mekanizmasıdır. β -laktamazlar, penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler gibi tüm β -laktam antibiyotiklerini inaktive edebilirler (Munita ve Arias, 2016; Wilke ve ark., 2005).



Şekil 1.6 Serin β-laktamazların, β-laktam halkasını hidroliz mekanizması

Yeni β-laktam antibiyotiklerinin keşfi ve klinik kullanıma sunulması onları inaktive eden yeni β-laktamazların ortaya çıkmasına neden olmuş ve β-laktamazların evrimi yeni β-laktamların keşfi ve gelişimi için önemli bir itici güç olmuştur. Bu enzimlere, β-laktam antibiyotiklerinin tıp ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmalarından önce nadir olarak rastalanırdı. Fakat karbapenem, monobaktam ve sefalosporin gibi β-laktam antibiyotiklerinin yaygın olarak kullanılması yeni bir evrime yol açarak, geniş spektrumlu β-laktamazların (GSBL) ortaya çıkmasına neden olmuştur (Wilke ve ark., 2005). Geniş spektrumlu β-laktamaz (GSBL) enzimleri, aztreonam gibi monobaktamları ve sefotaksim, seftriakson gibi oksiminio sefalosporinleri inaktive ederler. Bu enzimler, neredeyse tüm *Enterobacteriaceae* ailesinde, çoğunlukla da *Klebsiella spp.* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerde görülürler (Bektaş ve ark., 2018).

2016 yılına kadar yaklaşık 1000'den fazla, farklı β-laktamaz tanımlanmış ve daha pek çok yeni β-laktamazın, bakteriyel evrim sürecinin normal bir parçası olarak rapor edilmesi beklenmektedir (Munita ve Arias, 2016). Bu çeşitlilik antibiyotik direncine karşı mücadelenin boyutlarını ortaya koyarak, bu mücadelenin zorluğunu gözler önüne sermektedir. Çok sayıdaki bu enzimleri daha iyi inceleyebilmek ve kavrayabilmek amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılan 2 sınıflandırma vardır; Ambler sınıflandırması (sınıf A,B,C,D), Bush ve Jacoby sınıflandırması (grup 1,2,3) (Ambler, 1980, Bush ve Jacoby, 2010).

Karbapenemazlar, Ambler sınıflandırmasında sınıf A, B ve D β-laktamazlardan oluşan büyük bir enzim grubudur. Karbapenem ve çoğu β-laktam antibiyotiklerini hidroliz

edebilirler. Buna ek olarak, ticari olarak kullanılan β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibisyona karşı dirençlidir (Queenan ve Bush 2007).

1.4.1 Ambler Sınıflandırması: Moleküler Sınıflandırma

Ambler başlangıçta β -laktamazları, sınıf A ve sınıf B olarak 2 sınıfa ayırmıştır. Sınıf A, aktif bölgelerinde serin aminoasit kalıntısı bulunduran serin β -laktamazlar, sınıf B ise aktivite için iki değerlilik bir metal iyonuna ihtiyaç duyan metalo β -laktamazlardır. Daha sonraki yıllarda sınıf A ile az dizi benzerliği gösteren farklı serin β -laktamazların bulunması ile 1980 yılında tekrar bir sınıflandırma yapmıştır ve bu sınıflandırma hala yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ambler β -laktamazları aminoasit sekanslarına dayalı, sınıf A, B, C, D olarak dört sınıfa ayırmıştır (Ambler, 1980). A, C ve D sınıfı β -laktamazlar, aktif bölgelerinde serin aminoasit kalıntısı ile β -laktamaları hidroliz ederler. Bu β -laktamazlara, serin β -laktamazlar da denir. B sınıfı β -laktamazlar ise aktif bölgede +2 değerlikli bir metal iyonu içerirler (genellikle çinko) ve metallo-beta-laktamaz (MBL) olarak adlandırılırlar. MBL ise aktif bölgelerindeki çinko ile β -laktamaları hidroliz ederler (Munita ve Arias, 2016; Wilke ve ark., 2005).

1.4.2 Bush ve Jacoby Sınıflandırması: Fonksiyonel Sınıflandırma

İlk olarak 1989'da Bush tarafından yapılan bu fonksiyonel sınıflandırma, 1995'de geliştirilmiştir. Bakterilerde görülen bu direncin artması ve yaygınlaşmasının bir sonucu olarak yeni β -laktamazların tanımlanması üzerine, 2010 yılında yeni alt gruplar eklenerek en son halini almıştır. Bu sınıflandırmada β -laktamazlar, inhibitörlere duyarlılık, substrat profilleri gibi işlevsel özelliklerinin de değerlendirildiği yeni bir fonksiyonel sınıflandırma ile 3 gruba ayırır.

Grup 1: sefalosporinazlar; moleküller sınıfı olarak sınıf C β -laktamazlardır. Gram negatif bakterilerin plazmid kökenli enzimleridir. *Enterobacteriaceae* ve birkaç diğer organizmada genel olarak görülür. Sefalosporinleri ve benzilpenisilinleri aktif şekilde hidroliz ederler. Yeni bir alt sınıf olarak 1e enzimleri, oksiminio β -laktamaları hidroliz edebilirler.

Grup 2: serin β -laktamazlar; bu sınıflandırmadaki en büyük grubudur. Ambler sınıflandırmasında, sınıf A ve D β -laktamazları kapsar. Grup 2 β -laktamazlar substrat profillerindeki farklılık nedeni ile 12 ayrı alt gruba ayrılır.(2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2ce, 2d,

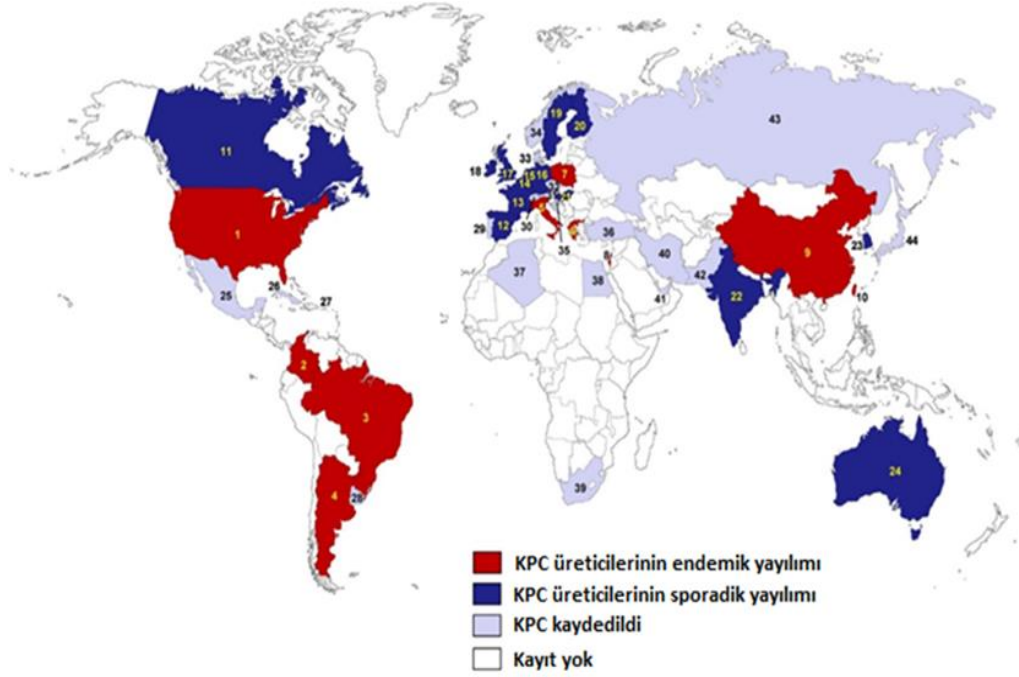
2df, 2e, 2f) Penisilinleri, sefolasporinleri, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz edebilirler. Gram negatif bakterilerde çok yaygın olarak görülen bu grup enzimlerin sayıları dünya çapında hızla artmaktadır.

Grup 3: metallo β -laktamazlar (MBLs); moleküler sınıf olarak B sınıfı β -laktamazlardır. Hem fonksiyonel hem de yapısal olarak diğer β -laktamazlardan farklılardır. Aktif bölgede genellikle çinko iyonuna gereksinim duydukları için diğer β -laktamazlardan yapısal olarak farklılardır. Monobaktam haricindeki pek çok β -laktamı hidroliz edebilirler. Genellikle karbapenemlere ilgileri yüksektir (Bush ve Jacoby, 2010).

1.5 Serin β -laktamazlar

SINIF A; Klinik olarak önemli β -laktamazların çoğunun sınıf A serin β -laktamazlara ait olduğu bilinmektedir. Sınıf A β -laktamazlar, penisilin, geniş spektrumlu sefalosporin, karbapenem ve monobaktam (aztreonam) gibi pek çok β -laktam sınıfı antibiyotikleri hidroliz edebilirler. Bu karbapenemazlar plazmid kodlu (KPC, GES, FRI-1), kromozomal kodlu (SME, NmcA, SFC-1, BIC-1, PenA, FPH-1, SHV-38) veya her ikisi tarafından kodlu (IMI) olabilirler (Nass ve ark., 2016; Codje ve Donkor, 2018).

KPC'ler (*K. Pneumoniae* karbapenemaz) en yaygın görülen sınıf A enzimlerdir. İlk KPC enzimi olan KPC-2, 1966 yılında Amerika Bileşik Devletlerinde *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır. Başlangıçta *Klebsiella Pneumoniae*'da görülen bu enzim, *Enterobactericea* ailesine ait bakterilerde de yaygın olarak görülmeye başlanmıştır. Günümüzde *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'de de giderek artan şekilde görülmektedir. KPC'ler keşfedildikten birkaç yıl sonra dünyaya yayılmış ve birçok Asya, Kuzey Amerika ve Avrupa ülkesinde ve Afrika'da enfeksiyonlara neden olmuştur (Şekil 1.7). KPC üreten bakterilerde β -laktamlara karşı çoklu ilaç direnci görülmesi, tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır. Buna bağlı olarak bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda görülen ölüm oranı yüksektir (Nass ve ark., 2016, Nordmann ve ark., 2011, Papp-Wallace ve ark., 2011). KPC'nin 22 varyantı vardır ve bu enzimlerde birbirlerinden farklı olarak birkaç aminoasit değişikliği görülür. (KPC-2 – KPC-24) (Nass ve ark., 2016; Nordmann ve ark., 2009). KPC-2 enzimi enterik bakterilerde yaygın olması nedeniyle de klinik olarak oldukça önemlidir. Biyokimyasal veriler KPC-2'nin penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemleri hidroliz edebildiğini göstermiştir (Mehta ve ark., 2015).



Şekil 1.7 KPC üreten *Klebsiella pneumoniae*'nin epidemiolojik özellikleri. (1) ABD; (2) Kolombiya; (3) Brezilya; (4) Arjantin; (5) İtalya; (6) Yunanistan; (7) Polonya; (8) İsrail; (9) Çin; (10) Tayvan; (11) Kanada; (12) İspanya; (13) Fransa; (14) Belçika; (15) Hollanda; (16) Almanya; (17) İngiltere; (18) İrlanda; (19) İsveç; (20) Finlandiya; (21) Macaristan; (22) Hindistan; (23) Güney Kore; (24) Avustralya; (25) Meksika; (26) Küba; (27) Porto Riko; (28) Uruguay; (29) Portekiz; (30) İsviçre; (31) Avusturya; (32) Çek Cumhuriyeti; (33) Danimarka; (34) Norveç; (35) Hırvatistan; (36) Türkiye; (37) Cezayir; (38) Mısır; (39) Güney Afrika; (40) İran; (41) Birleşik Arap Emirlikleri; (42) Pakistan; (43) Rusya; (44) Japonya (Lee ve ark., 2016).

SINIF C; Birçok *Enterobacteriaceae* ve diğer bazı bakterilerin kromozomları üzerinde kodlanan β -laktamazlardır (Bush ve Jacoby, 2010). Sınıf C, tüm sefalosporin ve penisilin antibiyotiklerini hidroliz edebilir ve bu β -laktamazlara sefalosporinazlar da denir. Klinik olarak en yaygın sınıf C enzimleri, genellikle kromozom üzerinde kodlanan AmpC'dir (Munita ve Arias, 2016). Penisilini yok ettiği bildirilen ilk bakteri enzimi, 1940 yılında isimlendirilmemiş olmasına rağmen *Escherichia coli*'de tanımlanmış AmpC β -laktamazdır. AmpC, sefalotin, sefazolin, sefoksitin, pek çok penisilin ve β -laktam- β -laktamaz inhibitörlerine karşı direnç gösteren ve klinik olarak önemli bir β -laktamazdır (Jacoby, 2009).

SINIF D; Diğer β -laktamazlardan farklı olarak oksasilini (dar spektrumlu bir penisilin antibiyotiği) hidroliz etme özelliklerinden dolayı bu enzimlere OXA β -laktamazlarda denir. 3. nesil sefalosporinleri, penisilinleri ve karbapenemleri hidroliz edebilen enzimleri de olduğu için birçok OXA varyantı vardır. D sınıfı enzimler başlangıçta *A. baumannii*'de özellikle yaygın olarak görülmesine rağmen, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* gibi klinik olarak önemli birçok organizmada da tanımlanmıştır (Munita ve Arias, 2016; Evans ve Amyes, 2014). Yapılan araştırmalar sonucu, 102 farklı OXA sekansı tanımlanmış olup, 9'u GSBL, 37 tanesinin de karbapenemaz olduğu bulunmuştur (Codje ve Donkor, 2018).

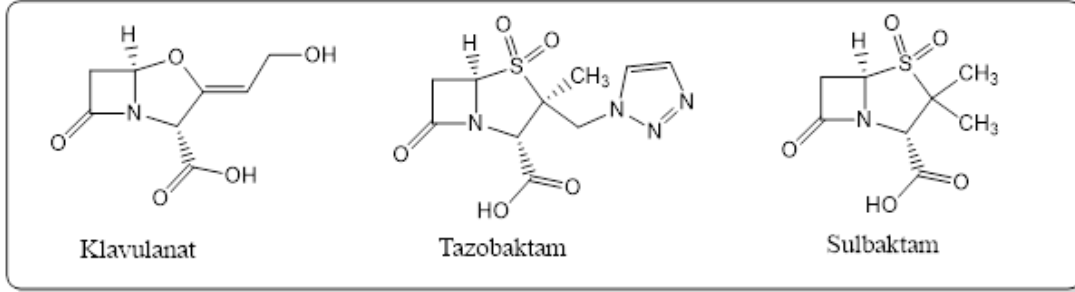
1.6 β -Laktamaz İnhibitörleri

Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde β -laktamazların neden olduğu β -laktamlara karşı görülen direncin üstesinden gelmek için, β -laktamaz inhibitörleri (BLI) keşfedilerek klinik uygulamaya sokulmuştur. Bu inhibitörler sayesinde β -laktam antibiyotikleri hedefi olan PBP'lere ulaşabilirler ve dolayısıyla etkinliklerini geri kazanırlar. β -laktamaz inhibitörleri, enzimlerin aktif bölgesindeki aminoasit kalıntıları ile etkileşerek onları inhibe ederler. Bu inhibitörler, klavulanat, sulbaktam ve tazobaktamdır. Bu inhibitörlerin yapılarında ortak olarak β -laktam halkası bulunur ve β -laktam yapılı inhibitörler olarak da bilinirler. Uzun zamandır β -laktamaz inhibitörleri, β -laktam antibiyotikleri ile birlikte kombinasyon halinde β -laktamazları inhibe etmek için kullanılmaktadır (Bonomo ve Drawz, 2010; Olsen, 2015; Drawz ve ark., 2014). Fakat bakterilerin bu inhibitörlere karşı direnç göstermesiyle, β -laktam antibiyotiklerine aktivitelerini geri kazandırabilecek etkili inhibitörlere duyulan ihtiyaç artmıştır (Bonomo ve Drawz, 2010; Drawz ve ark., 2014). Hız kazanan yeni inhibitör çalışmaları sonucu keşfedilen avibaktam, MK-7655 ve RPX7009 gibi inhibitörlerin yapılarında β -laktam halkası yoktur ve non β -laktam β -laktamaz inhibitörler olarak bilinirler. Bu inhibitörlerin klinik çalışmaları hala devam etmektedir.

1.6.1 β -Laktam Halkası İçeren İnhibitörler

Klavulanik asit (klavulanat); 1970 yılında *Streptomyces clavuligerus* bakterisinden izole edilmiş ilk β -laktamaz inhibitörüdür. Daha sonra 1978'de sulbaktam, 1984 yılında ise tazobaktam sentetik olarak keşfedilmiştir. Bu inhibitörler sınıf A β -laktamazlara karşı

etkiliyken genellikle sınıf B, C ve D β -laktamazlara karşı daha az etkilidirler (Bonomo ve Drawz, 2010; Bush ve Bradfor, 2016; Olsen, 2015). β -laktamaz inhibitörleri, enzimin aktif bölgesinine geri dönüşümsüz bağlanarak, enzimleri inhibe ederler (Şekil 1.8) (Bonomo ve Drawz, 2010; Docquier ve Magnani, 2018).



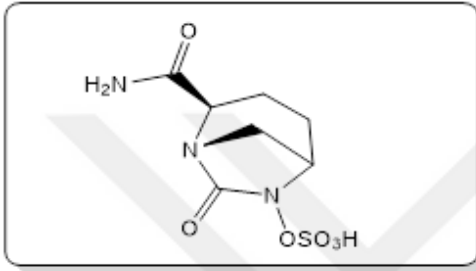
Şekil 1.8 Klavulanat, Tazobaktam ve Sulbaktam yapıları

Genel olarak bu inhibitörler PBP'leri etkisizleştiremezler. Antibakteriyel etkileri daha zayıf olduğu için β -laktam antibiyotikleri ile kombinasyon halinde kullanılırlar. Şu anda, mevcut beş β -laktam- β -laktamaz inhibitör formülasyonu bulunmaktadır. Bunlar; amoksisilin-klavulanat, tikarsilin-klavulanat, ampisilin-sulbaktam, sefaperazon-sulbaktam ve piperasilin-tazobaktamdır. Bu kombinasyonlar bazı sınıf A β -laktamazlara (KPC-2, SHV ve IRT harici) karşı etkili olabilirler. Fakat sınıf B, C ve D enzimlerin çoğuna karşı etkili değildirler (Olsen, 2015; Docquier ve Magnani, 2018). Uzun yıllardır β -laktamaz inhibitörlerinin enzime afinitelerinin zayıf olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu inhibitörler sınıf A karbapenemaz KPC-2'yi etkili şekilde inhibe edemezler (Khan ve ark., 2014). Yapılan araştırmalarda yeni keşfedilen birçok β -laktamazın, uzun zamandır kullanılan bu β -laktamaz inhibitörleri tarafından inaktif hale getirilemediği tespit edilmiştir (Thomson,1990; Watkins ve ark., 2013).

1.6.2 Non β -Laktam β -Laktamaz İnhibitörler

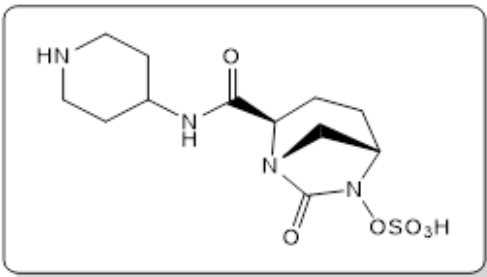
Üç BLI'lerin ve karbapenem gibi son çare olarak görülen antibiyotiklerin zayıflıklarından dolayı görülen çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek için, yeni inhibitörlerin bulunmasına duyulan ihtiyaç artmıştır. β -laktamazların etki mekanizmasının anlaşılmasında sonra, Sanofi-Avent'teki bilim insanları küçük bir molekül iskeleti tasarlamışlardır. Bu molekül her ne kadar β -laktam taklitçisi olsada yapısal olarak β -laktamdan farklıdır ve bu fark sayesinde β -laktam yapılı BLI'lere karşı dirençten kaçabileceği düşünülmüştür. Bu bileşik bisiklo (3.2.1) diazabisiklo-oktanon, yani

avibaktam'tır ve ilk non β -laktam BLI'dür. Klavulanik asit ile karşılaştırıldığında daha geniş spektrumlu olduğu bulunmuştur. Avibaktamın sınıf A β -laktamazları etkili şekilde inhibe ettiği (KPC' de dahil) aynı zamanda sınıf C ve bazı sınıf D β -laktamazları da inhibe ettiği bulunmuştur (Docquier ve Magnani, 2018; Bonnefoy ve ark., 2004). Avibaktam (Şekil 1.9) kovalent ve geri dönüşümlü inhibitördür. Seftazidime-avibaktam, seftaroline-avibaktam, aztreonam-avibaktam kombinasyon çalışmaları 2010'dan beri klinik olarak devam etmektedir. Bu kombinasyon çalışmalarından seftazidime-avibaktam Amerika ve Avrupa da onaylanmıştır (Docquier ve Magnani, 2018).



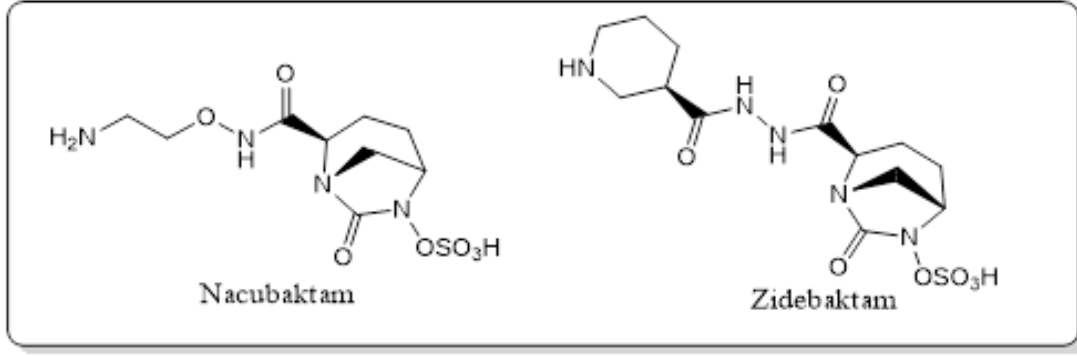
Şekil 1.9 Avibaktam yapısı

MK-7655 (Relebaktam) diğer bir bisiklik diazabisiklo-oktanon olup, klinik gelişimdeki non β -laktam BLI'dir. (Şekil 1.10) Yapı ve etki mekanizması olarak avibaktamlara benzer. Sınıf A ve C β -laktamazları inhibe edebildiği *in vitro* olarak kanıtlanmıştır. İmipenem-kilastatin ile kombinasyon çalışmaları devam etmektedir (Olsen, 2015; Docquier ve Magnani, 2018).



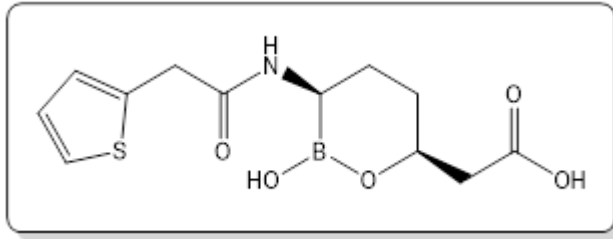
Şekil 1.10 Relebaktam yapısı

Nacubaktam (FPI-1459, RG6080, OP0595), zidebaktam (sefepime ile kombinasyon çalışmaları devam etmekte) ve ETX2514 diğer bisiklik diazabisiklo-oktanon inhibitörler (Şekil 1.11) olup klinik gelişim altındadır (Docquier ve Magnani, 2018).



Şekil 1.11 Nacubaktam ve Zidebaktam yapıları

30 yıl önce boronik asit türevlerinin serin β -laktamazlara karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur (Kiener ve Waley, 1978). O zamandan beri çeşitli türevleri sentezlenerek β -laktamazlara karşı inhibitör aktiviteleri test edilmiştir (Docquier ve Magnani, 2018). 2015 yılında bilim insanları güçlü bir serin β -laktamaz inhibitörü bulmak için bir program başlatmış ve borik asit farmokoforu içeren bileşikler tasarlayarak bir seri oluşturmuşlardır. Potansiyel yapıları serin β -laktamazların aktif bölgesine modelleyerek, *in siliko* doking aracılığıyla taramışlardır. Bu taramalar sonucunda umut vaat eden bileşikleri sentezleyerek *in vitro* ve *in vivo* testlerini yapmışlardır. Bu araştırma sonucunda da vaborbaktam'ın (Şekil 1.12, RPX7009) halk sağlığını tehdit eden ve giderek yaygınlaşan KPC üreten bakterilere karşı karbapenemlerin aktivitesini geri kazandırdığını bulmuşlardır (Hecker ve ark., 2015).

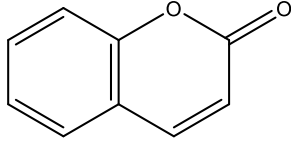


Şekil 1.12 Vaborbaktam (RPX7009)

1.7 Kumarinler

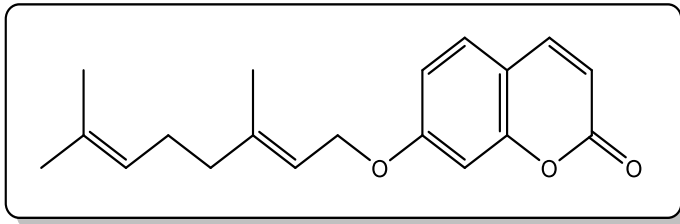
Bir piron halkası ve bir benzen halkası sisteminin birleşmesiyle oluşan kumarinler çeşitli farmakolojik özellikler gösterirler (Şekil 1.13). Birçok doğal üründe bulunan kumarinler, bitkilerin meyve, kabuk, gövde ve yapraklarında bulunurlar. Bunun yanı sıra sentetik ve yarı sentetik kumarin türevleri de vardır. Kumarinler enzim inhibitörü olarak davranma, toksik maddeleri önleme gibi önemli biyokimyasal etkiye sahiptirler. Sahip oldukları

fonksiyonel yapıları sayesinde kumarin türevleri; antialerjik, antitümör, antiastım, analjezik, antidiyabetik, antihipertansif, antiviral, antifungal, antimikrobiyal, anti-koagülan, anti-inflamatuar, anti-kanser ve antidepresan olarakta biyolojik aktiviteye sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı kumarinler ilaç endüstrisinde oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır (Vardar, 2012; Srikrishna ve ark., 2018).



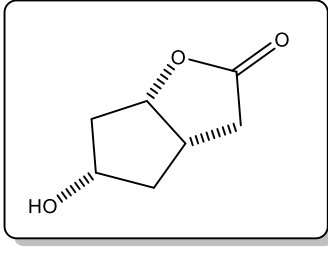
Şekil 1.13 Kumarin halkası

Kumarinlerin β -laktamazlar üzerindeki inhibitör aktiviteleri ilk defa 2014 yılında araştırılmıştır ve 7-preniloksi kumarinlerin sınıf A β -laktamazlar için güçlü ve seçici inhibitörler olduğu bulunmuştur. Aurapten, umbelliprenin, galbanik asit ve 7-izopenteniloksikumarin (7IPC) ile yaptıkları çalışmalarda, auraptenin (Şekil 1.14), Sınıf A β -laktamaza karşı en güçlü inhibitör aktivite gösterdiğini, sınıf D β -laktamaza karşı ise inhibisyon aktivitesi göstermediğini bulmuşlardır. Bahsedilen bileşiklerin yapı aktivite ilişkisini ve enzim inhibitör sonuçlarını anlayabilmek için, her iki β -laktamaz grubu için doking analizi gerçekleştirmişlerdir. Doking analizi, bileşiklerin sınıf A β -laktamaza göre, sınıf D β -laktamaza 100-500 kat düşük bağlanma derecesine sahip olduğunu göstermiştir (Safdari ve ark., 2014).



Şekil 1.14 Aurapten

Ayrıca, 2000 yılında da kumarinler gibi yapısında lakton halkası bulunan 7 adet γ -lakton bileşiğinin (Şekil 1.15) β -laktamazlar üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu bileşiklerden, 2 tanesinin çeşitli bakterilerden izole edilen β -laktamazları inhibe ettiği bulunmuştur.



Şekil 1.15 β -laktamazı inhibe eden γ -lakton bileşiği (Gal ve ark., 2000)

Yapılan bu çalışmalar kumarinlerin potansiyel β -laktamaz inhibitörleri olabileceğini göstermektedir.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

Bilgisayar destekli ilaç keşfi/ tasarımı (CADD: computer-aided drug desing) ve geliştirilmesi için yardımcı olan ve aynı zamanda bu uzun süreci kısaltan, maliyeti düşüren yöntemlerdir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı ile deneysel olarak taranması gereken ligand sayısı azaltılarak, potansiyeli en yüksek bileşiklerin hayvan deneyleri için belirlenmesi sağlanır. Böylece hem maliyet azalır hem de ilacın piyasaya çıkma süresi kısalmış olur. Ayrıca bu yöntemler ile öncü ligand bileşikleri belirlenebilir, etkinliği ve olası yan etkileri tahmin edilebilir ve olası ilaç moleküllerinin biyoyararlarının artırılmasına yardımcı olunur (Leelananda ve Lindert, 2016).

Genel olarak bir ilacın keşfinde CADD 3 amaç için kullanılır;

- 1) Büyük bir molekül kütüphanesinden deneysel olarak test edilebilecek daha küçük molekül kümeleri elde etme,
- 2) Emilim (absorbsiyon), dağılım, metabolizma, atılım ve toksitite (ADMET) dahil olmak üzere, afinitesinin artırılması, ilaç metabolizması
- 3) Farmokinetik özelliklerinin optimizasyonu, yeni bileşiklerin tasarlanması (Sliwoski ve ark., 2014).

Bu yöntemler genel olarak yapı bazlı ve ligand bazlı yöntemler olarak sınıflandırılırlar. Ligand bazlı CADD, hedef yapıya bağlandığı bilinen moleküllerin bilgisinden yararlanılır ve hedef protein yapısının bilgisine ihtiyaç yoktur. Bu yöntemlere örnek olarak kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (KYAİ) verilebilir. Yapı bazlı CADD, test edilecek tüm bileşiklerin hedefe bağlanma enerjilerini hesaplamak için hedef protein yapısının bilgisine dayanır. Moleküler doking ve moleküler dinamik simülasyon (MD) bu yöntemlere örnek olarak verilebilir. Hedef protein yapısı genellikle X-ışını kristalografisi ve ya NMR(nükleer manyetik rezonans) ile elde edilir (Leelananda ve Lindert, 2016; Sliwoski ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında, daha önce bölümümüz Organik kimya ve Biyokimya laboratuvarlarında sentezlenmiş olan çoğu arilkumarin türevi olan 39 bileşik ile çalışılmış ve ilk kez bu bileşiklerin β -laktamazlar üzerine etkileri araştırılmıştır. Akılcı ilaç tasarımında hesapsal ve deneysel yöntemlerin bir arada kullanılması ile inhibitör de dahi olmak üzere, pek çok yeni bileşiklerin tanımlanması ve geliştirilmesi sağlanmıştır. Bu amaçla bu bileşiklerin öncelikle moleküler doking yöntemi ile β -laktamaz ve

karbapenemaz enzimlerine karşı afiniteleri hesaplanmış ve potansiyel aday bileşikler belirlenmiştir. Belirlenen bileşiklerin β -laktamaz üzerindeki etkileri *in vitro* biyokimyasal yöntem ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen öncü bileşiğin moleküler dinamik (MD) yöntem ile enzim-ligand kompleksinin simülasyonu incelenmiştir.

2.1 Moleküler Doking

Moleküler doking yöntemi, ilaç keşfedilmesinde bir araç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem, moleküllerin belirli bir biyolojik hedefe olan afinitelerini moleküler mekanik teorisine göre hesaplar. Bu moleküllerin yani ligandların, hedef makromolekülün (enzim, reseptör, DNA, RNA, vs.) bağlanma bölgelerindeki, konformasyonlarını tespit eder. Yani bu yöntem, bir molekülün başka bir molekül ile kararlı bir kompleks oluşturması sonucunda atomların uzaydaki tercih edebileceği pozisyonları tahmin etmede kullanılır (Ferreira ve ark., 2015; Thiriot ve Monard, 2009). Ligandın bir proteine bağlandığında kurduğu elektrostatik etkileşimler sonucunda oluşabilecek konformasyonları tahmin eder ve bu etkileşimler sonucunda bağlanma potansiyelini temsil eden bir skor oluşturur. Bu skor, elektrostatik ve Van der Waals enerjilerinin toplamı ile bulunur ve konformasyonları sıralamak için kullanılır (Ferreira ve ark., 2015; Pagadala ve ark., 2017).

Moleküler doking hesapları ligand esnek (flexible), makromolekül ise sabit (rijid) ya da kısmen esnek tutularak gerçekleştirilir.

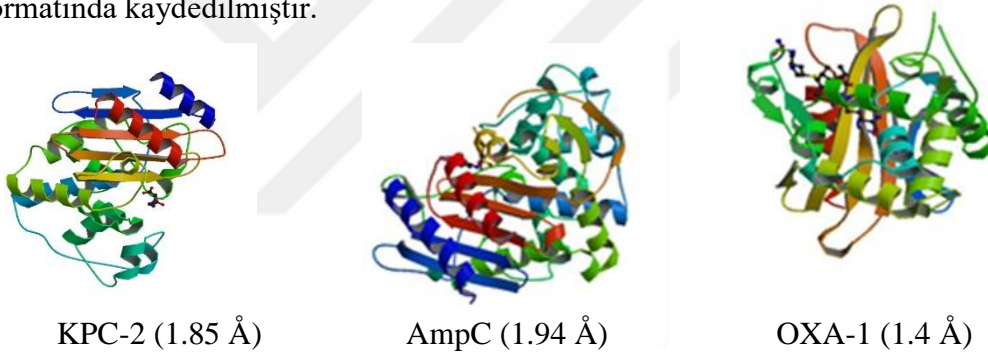
Bu tez çalışmasında, açık lisanslı bir doking programı olan ve Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş AutoDock Vina kullanılarak, esnek protein-ligand doklamaları yapılmıştır (Trott ve Olson, 2010).

Bu tez çalışmasında izlenen moleküler doking basamakları;

- Enzim dosyalarının hazırlanması,
- Ligand dosyalarının hazırlanması,
- Konigürasyon dosyasının hazırlanması
- AutoDock Vina ile doking,
- Doking sonuçlarının görüntülenmesi şeklindedir.

2.1.1 Enzim Dosyalarının Hazırlanması

Doking için gerekli olan Sınıf A *Klebsiella pneumoniae* KPC-2'nin (PDB kodu: 2OV5) (Ke ve ark., 2007), sınıf C *Escherichia coli* AmpC (PDB kodu: 1L2S) (Powers ve ark., 2002), sınıf D *Escherichia coli* OXA-1'in (PDB kodu: 3ISG) (Schneider ve ark., 2009) yüksek çözünürlüklü x-ışını kristal yapıları protein data bankasından PDB formatında indirilmiştir. KPC-2'nin trimer halinde bulunan enzimdeki zincirlerden ikisi silinerek A zincirine ait monomerik yapı elde edilmiştir. AmpC ve OXA-1 enzimlerinin dimer halinde bulunan zincirlerinden biri silinerek monomerik yapı elde edilmiştir. Her 3 enzim için de, kristal yapısında enzime bağlı olan ligand yapıdan silinip gerekli diğer düzeltmeler yapıldıktan sonra aktif bölgesi boş enzim pdb olarak kaydedilmiştir. Bu dosyalar, AutodockTools 1.5.6 (Morris ve ark., 2009) programında açılarak belirlenen aktif bölgedeki amino asitler (Tablo 2.1) doking işlemi için esnek olarak seçilmiş ve dönebilen bağ sayıları tanımlandıktan sonra Gasteiger yükleri hesaplanarak pdbqt dosya formatında kaydedilmiştir.



Şekil 2.1 KPC-2, AmpC ve OXA-1 enzimleri için kullanılan kristal yapılar ve çözünürlük değerleri.

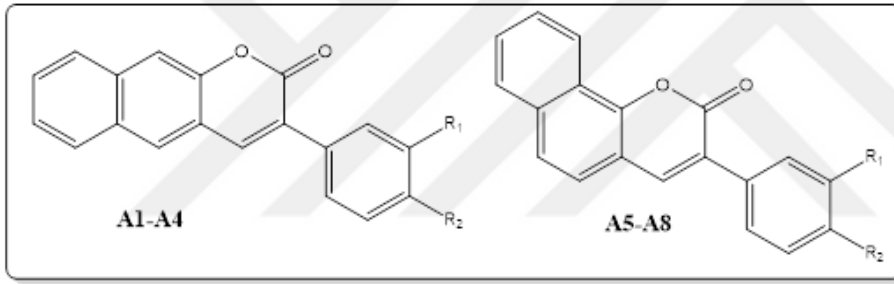
Tablo 2.1 KPC-2, AmpC ve OXA-1 enzimlerinin aktif bölgesinde yer alan ve esnek olarak seçilen amino asitler

KPC-2	AmpC	OXA-1
SER70	SER64	SER67
SER130	LYS67	LYS70
ASN132	TYR150	SER115
ASN170	ASN152	LYS212
LYS234	TYR221	THR213
THR235	LYS315	LEU255
THR237		

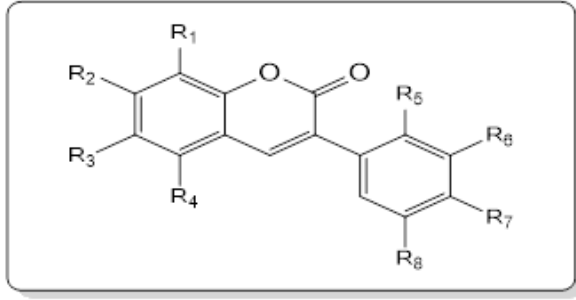
2.1.2 Ligand Dosyalarının Hazırlanması

Daha önceki çalışmalarda (Erzincan ve ark., 2015) kumarin bileşiklerinin (Tablo 2.2, Tablo 2.3, Tablo 2.4) Spartan programı (Wavefunction Inc., 2010) ile konformasyon taraması yarı-deneysel PM6 yöntemi (Stewart, 2007) ile yapılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında, seçilen en kararlı konformasyon kullanılarak daha yüksek seviye bir yöntem olan M062X/6-31G(d,p) (Zhao ve Truhlar, 2008) ile bileşikler optimize edilmiştir ve bu işlem için Gaussian09 yazılımı (Frisch ve ark., 2010) kullanılmıştır. Optimize olmuş kumarin yapıları pdb formatında kaydedilmiştir. AutodockTools programı (Morris ve ark., 2009) kullanılarak her bir ligand yapısı doking işlemine hazır hale getirilerek, pdbqt formatında kaydedilmiştir.

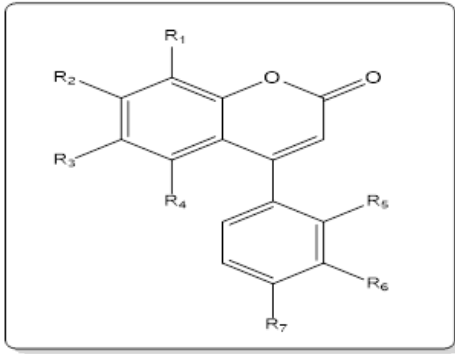
Tablo 2.2 Benzokumarin türevleri



Benzokumarin Türevleri	R ₁	R ₂
A1	-OAc	-OAc
A2	-OCH ₃	-OCH ₃
A3	-H	-OCH ₃
A4	-H	-Ph
A5	-OAc	-OAc
A6	-OCH ₃	-OCH ₃
A7	-H	-OCH ₃
A8	-H	-Ph

Tablo 2.3 3-arilkumarin türevleri

3-arilkumarin türevleri	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
1	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
2	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OAc	-OAc	-H
3	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OH	-OH	-H
4	-H	-OAc	-OAc	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
5	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H
6	-H	-OAc	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
10	-OH	-OH	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
11	-OAc	-OAc	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
12	-OH	-OH	-H	-H	-CH ₃	-H	-H
14	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H
16	-OH	-OH	-H	-H	-H	-CH ₃	-H
22	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
23	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
24	-H	-OH	-H	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
25	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
26	-H	-OAc	-H	-OAc	-OAc	-OAc	-H
27	-H	-OAc	-OAc	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃

Tablo 2.4 4-arilkumarin türevleri

4-arilkumarin türevleri	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
7	-OH	-OH	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
8	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
9	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH
18	-H	-OH	-H	-H	-H	-H
21	-H	-OH	-OH	-OH	-OH	-O

Tablo 2.5 Diğer kumarin türevleri

Kumarin türevleri	Yapıları
A10	
A11	
17	
19	
20	

2.1.3 Konfigürasyon (Config) Dosyasının Hazırlanması

Docking hesaplamasının yapılabilmesi için öncelikle konfigürasyon dosyasının hazırlanması gerekir (Şekil 2.2). Bir konfigürasyon dosyasında; protein molekülünün, ligandın adı, bağlanmanın gerçekleşeceği atom merkez alınarak oluşturulan küpün boyutları (size) ve proteinin aktif bölgesi üzerinde bağlanmanın gerçekleşeceği atomun kartezyen koordinatlarını (center) tanımlayan parametreler yer alır. Proteinin aktif bölgesi ve bu bölgedeki bağlanmanın gerçekleşeceği atomun koordinatları, doklama yapılacak proteine göre farklılık gösterir. Ayrıca bağlanmanın gerçekleşeceği atom merkez alınarak oluşturulan küpün boyutları da proteinin aktif bölgesi ve ligand moleküllerinin boyutuna göre farklılık gösterir.

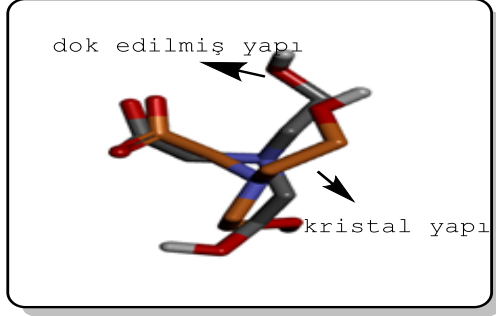
Receptor = 2ov5_rigid.pdbqt flex = 2ov5_flex.pdbqt ligand = 3_opt.pdbqt center_x = 56.9 center_y = -21.5 center_z = -4.4 size_x = 40 size_y = 40 size_z = 40	receptor=112s_rigid.pdbqt flex = 112s_flex.pdbqt ligand = 2_opt.pdbqt center_x = 25.8 center_y = 5 center_z = 16.1 size_x = 40 size_y = 40 size_z = 40	Receptor = 3isg_rigid.pdbqt flex = 3isg_flex.pdbqt ligand = 2_opt.pdbqt center_x = -11.7 center_y = 13.9 center_z = -43.1 size_x = 40 size_y = 40 size_z = 40
--	--	---

Şekil 2.2 AutoDock Vina programı kullanılarak KPC-2 (2ov5), AmpC (1L2S) ve OXA-1 (3ISG) için hazırlanan konfigürasyon dosyaları

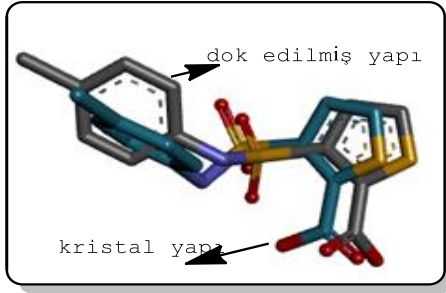
2.1.4 Moleküler Docking İşlemi

Konfigürasyon dosyalarının hazırlanmasından sonra AutoDock Vina programının validasyonu için enzimlerin kristal yapılarındaki inhibitörün enzime rigid olarak doklanması ile elde edilen konformasyonların, X-ray yapısından sapması (Root Mean Square Deviation, RMSD) incelenmiştir. Tüm enzimler için yapılan bu işlemde, inhibitörlerin docking pozisyonları ile kristal yapı pozisyonları üst üst karşılaştırılarak, RMSD < 2 kriterini sağladığı bulunmuştur (Trott ve Olson, 2010). RMSD hesabı için Discovery Studio 4.1 programı kullanılmıştır (Accelrys Software Inc., 2013). Sınıf A KPC-2 (PDB: 2OV5) için RMSD değeri 1.448 Å bulunmuştur. Sınıf C AmpC (PDB:

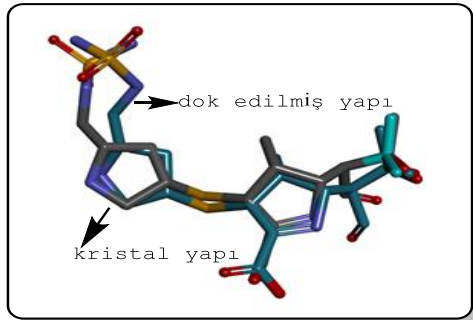
1L2S) için RMSD değeri 1.850 Å, sınıf D (PDB: 3ISG) için RMSD değeri 1.536 Å olarak bulunmuştur (Şekil 2.3, 2.4 ve 2.5).



Şekil 2.3 KPC-2 (PDB: 2OV5) kristal yapısındaki inhibitörün (bicine) pozunun doking sonrası elde edilen poz ile karşılaştırılması (RMSD: 1.44 Å)



Şekil 2.4 AmpC (PDB: 1L2S) kristal yapısındaki inhibitörün (3-[(4-kloroanilino)sulfonyl]tiyofen-2-karboksilik asit) pozunun doking sonrası elde edilen poz ile karşılaştırılması (RMSD: 1.85 Å)



Şekil 2.5 OXA-1 (PDB:3ISG) kristal yapısındaki inhibitörün (doripenem, β-laktam halkasının açık hali) pozunun doking sonrası elde edilen poz ile karşılaştırılması (RMSD: 1.536 Å)

2.1.5 Doking Sonuçlarının Görüntülenmesi

Moleküler doking sonucunda elde edilen düşük bağlanma enerjisine sahip ligandlar AutoDock Tools programı kullanılarak görüntülenmiş ve aktif bölge ile etkileşen konformasyonlar seçilmiştir. Seçilen konformasyonlar BIOVIA Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0 - 2013 görüntüleme yazılımı ile enzim-ligand etkileşimleri ayrıntılı olarak incelenmiştir (Accelrys Software Inc., 2013).

2.2 Moleküler Dinamik Simülasyon

Moleküler doking yönteminde, hedef bağlanma bölgesinin esnekliği göz önünde bulundurulması gereken önemli fakat sıklıkla gözden kaçan bir özelliktir. Enzimler ve reseptörleri, moleküler tanıma işlemi sırasında konformasyonel değişikliklere uğrayabilir. Bu esneklik sorunu MD ile çözülebilir. Bu simülasyon yöntemi ile proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin davranışları atomik detayda ve zamana bağlı olarak izlenebilir. MD ile biyomoleküllerin hareketleri hakkında bilgiler edinilir ve bilgiler biyolojik sistemlerin anlaşılabilmesine katkı sağlar (Adcock ve McCammon, 2006). En yaygın kullanılan moleküler dinamik yazılım paketleri NAMD, Gromacs ve Amber'dir. Mangoni vd. (1999) küçük esnek ligandları suda esnek hedeflere yerleştirmek için bir MD protokolü geliştirmişlerdir. Proteinlerin küçük moleküllü ligantlar veya inhibitörler ile kompleks halinde simülasyonu, enzim katalizini anlamının önemli bir parçasıdır (Lemkul, 2018). Bu tez çalışmasında Gromacs 2016.3 (Abraham ve ark., 2015; van der Spoel ve ark., 2005) programı kullanılarak, protein-ligand kompleksinin 30 ns boyunca moleküler dinamik simülasyonu yapılmıştır.

Simülasyon çalışması için izlenen basamaklar,

- Topoloji oluşturma; öncelikle enzimin ve ligandın topolojisi oluşturulmuştur.
- Kutu oluşturma ve solvent ekleme; kompleksin içinde bulunduğu birim hücre oluşturulmuş ve bu hücreye solvent (su) molekülleri eklenmiştir.
- İyon ekleme; sisteme iyon eklenerek nötralize hale getirilmiştir.
- Enerji minimizasyonu; sistemin minimizasyon işlemidir. 50000 adımda gerçekleştirilmiştir.

•Denge; su molekülleri ve iyonların dengelenmesi işlemidir. Sistemin hacmi, basıncı 1 bar ve sıcaklığı 300 Kelvin’de dengeye getirilmiştir. (NVT ve NPT; N: moleküllerin sayısı, V: sistemin hacmi, P: sistemin basıncı, T: sistemin sıcaklığı)

•MD 30 ns’lik simülasyonu ve analizi şeklindedir (Lemkul, 2018).

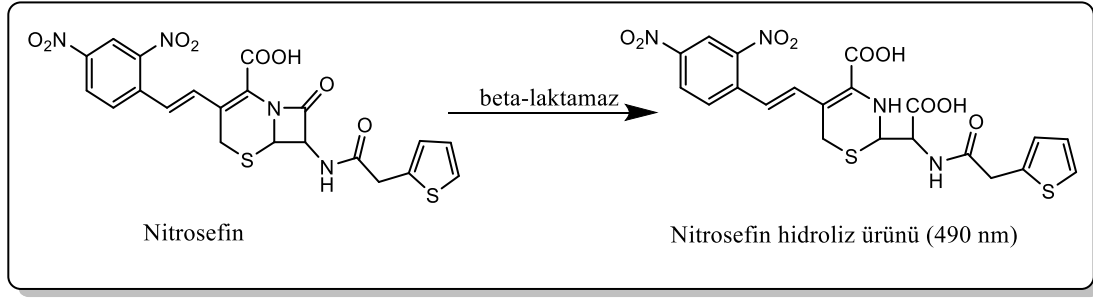
2.2.1 MD Simülasyon Analizi

MD simülasyonları Gromacs 2016.3 programı ile Charmm36 kuvvet alanı kullanarak standart protokol ile gerçekleştirilmiştir. Ligandın simülasyon boyunca bağlanma pozunun ne kadar değiştiğini ve ilk pozundan ne kadar saptığını öğrenmek için RMSD grafiği oluşturulmuş ve incelenmiştir. MD simülasyonu VMD 1.9.3 (Humphrey, 1996) programı kullanılarak izlenmiştir. Program kullanılarak istenilen pozlar PDB olarak kaydedilmiş ve BIOVIA Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0-2013 Studio görüntüleme yazılımı kullanılarak ayrıntılı olarak incelenmiştir. Simülasyon boyunca aktif bölgedeki aminoasit kalıntıları ile ligand molekülü ve serin aminoasit kalıntıları arasında oluşan hidrojen bağları sayısını veren grafik Gromacs 2016.3 programı kullanılarak elde edilmiştir.

2.3 Arilkumarin Türevlerinin β -Laktamaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin *In Vitro* Belirlenmesi

Arilkumarin türevlerinin β -laktamaz enzim aktivitesi üzerine etkileri Sigma Aldrich Chemical Co.’dan (St., Louis, ABD) firmasından temin edilen β -Laktamaz İnhibitör Tarama Kiti kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (MAK222). Bu kitin içeriğinde aktivite ölçümü için gerekli olan, β -Laktamaz çalışma tamponu, β -Laktamaz enzimi, nitrosefin substratı (DMSO içinde), pozitif kontrol olarak kullanılacak olan klavulanik asit bulunmaktadır. Aktivite çalışmaları 96 kuyulu mikropalakalarda, Epoch çoklu plaka okuyucu spektrofotometre (Biotek) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemde β -laktamaz substratı olarak kullanılan nitrosefin kromojenik bir sefalosporin türevidir ve reaksiyon hızı enzim etkisi ile oluşan hidroliz ürününün 490 nm dalga boyundaki absorbansının artışı ile takip edilir (Şekil 2.6) (O’Callaghan ve ark., 1972).



Şekil 2.6 β -laktamaz inhibitör tarama kitindeki enzim-substrat tepkimesi

Enzimin inhibe edilmesiyle 490 nm'deki absorbansta dolayısı ile enzim aktivitesinde azalma beklenmektedir.

Arilkumarin türevlerinin β -Laktamaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için öncelikle β -laktamaz enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Bu amaçla 1 μ L β -laktamaz çalışma tamponu, 2 μ L β -Laktamaz enzimi ve 67 μ L β -laktamaz çalışma tamponu 96 kuyulu plakalara konularak karanlıkta 25 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon 1 μ L nitrocefim (16 mM) ve 29 μ L β -laktamaz çalışma tamponundan oluşan substrat çalışma çözeltisinin eklenmesi ile başlatılmıştır. Enzim aktivitesi çoklu mikropolanın 2 saniye boyunca hızla karıştırılmasından sonra 490 nm'de, 20 dakika boyunca, her 1 dakikada bir absorban ölçümü alınarak belirlenmiştir. Kumarin türevlerinin çözünmesi için kullanılan DMSO'nun enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla deneme 1 μ L β -laktamaz çalışma tamponu yerine 1 μ L DMSO kullanılarak tekrarlanmıştır.

Kumarin türevlerinin β -Laktamaz aktivitesi üzerine olan etkileri 100 μ M inhibitör konsantrasyonunda belirlenmiştir. Bu amaçla 1 μ L kumarin türevi (DMSO içinde çözülmüş, son konsantrasyon 100 μ M), 2 μ L β -Laktamaz enzimi ve 67 μ L β -laktamaz çalışma tamponu 96 kuyulu plakalara konularak karanlıkta 25 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon 1 μ L nitrocefim (16 mM) ve 29 μ L β -laktamaz çalışma tamponundan oluşan substrat çalışma çözeltisinin eklenmesi ile başlatılmıştır. Enzim aktivitesi çoklu mikropolanın 2 saniye boyunca hızla karıştırılmasından sonra 490 nm'de, 20 dakika boyunca, her 1 dakikada bir absorban ölçümü alınarak belirlenmiştir.

Her bir kumarin türevi için yüzde inhibisyon değerleri aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_{enz} - A_{inh}}{A_{enz}} \times 100$$

A_{enz} : İnhibitörsüz enzim aktivitesi

A_{inh} : İnhibitör varlığında enzim aktivitesi

Benzer şekilde bilinen β -Laktamaz inhibitörü klavulanik asidin 100 μ M konsantrasyonda enzim aktivitesi üzerine etkisi 490 nm'de, 20 dakika boyunca, her 1 dakikada bir absorbans ölçümü alınarak belirlenmiştir.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında bölümümüzde daha önce sentezlenmiş olan arilkumain türevlerinin serin β -laktamaz ve karbapenemaz enzimleri üzerine etkileri ilk defa incelenmiştir. Günümüzde sayıları binlere ulaşan çeşitli β -laktamaz enzimlerine ait ayrı kitler bulunamadığından, *in vitro* deneylerimizi satın aldığımız kit içinde yer alan ve hangi sınıfa ait olduğu hakkında bilgi bulunmayan bir enzim ile çalışarak gerçekleştirdik. Bu yüzden bu çalışmada moleküler doking yöntemi ile her 3 enzimde en etkili olan bileşik tespit edilerek, moleküler dinamik çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar neticesinde sınıf A KPC-2 ve sınıf C AmpC için potansiyel olarak belirlenmiştir.

3.1 Moleküler Doking Sonuçları

Serin β -laktamaz enzimleri olan KPC-2, AmpC ve OXA-1 ile yapılan esnek doking hesaplamaları her bir kumarin türevi için 10 kez tekrarlanmıştır. Enzime en yüksek afinite (en düşük serbest bağlanma enerjisi; ΔG) ile bağlanan konformasyonların bağlanma enerjileri aşağıda Tablo 3.1’de verilmiştir. Ayrıca β -laktamaz inhibitörü olan ve satın alınan enzim kitinde bulunan klavulanik asit ile yapılan moleküler doking çalışmasının sonucu da Tablo 3.1’e eklenmiştir. K_i değerleri $\Delta G = RT \ln K_i$ ($R=1,988$ cal/mol.K, $T=298K$) formülü kullanılarak hesaplanmış ve Tablo 3.1’de verilmiştir. Genel olarak benzokumarin türevleri A1-A11’in kuvvetli bağlanma potansiyelleri göze çarpmaktadır. Tüm benzokumarinlerin özellikle AmpC enzimine çok kuvvetli bir şekilde (bağlanma enerjileri -10 ile -12 kcal/mol arasında) bağlanma eğilimi gösterdikleri, A10 ve A11’in ise üç enzime de çok iyi bağlanabildiği tahmin edilmiştir. Her üç enzimde de en yüksek afiniteye sahip bileşik A10 olarak belirlenmiştir. Ayrıca klavulanik asit inhibitörü ile yapılan doking sonucuna bakıldığı zaman enzimlere bağlanma afinitesinin arilkumarin türevlerine göre daha az olduğu görülmektedir.

Tablo 3.1 Arilkumarin türevlerinin KPC-2, AmpC ve OXA-1 enzimlerine bağlanma enerjileri (kcal/mol) ve K_i (mikro molar) değerleri.

Arilkumarin Türevi	KPC-2		AmpC		OXA-1	
	ΔG	K_i	ΔG	K_i	ΔG	K_i
A1	-8,3	0,82	-10,1	0,03	-9,1	0,21
A2	-8,8	0,35	-9,9	0,05	-8,8	0,35
A3	-8,9	0,29	-10,0	0,04	-8,7	0,41
A4	-8,5	0,58	-11,7	0,00	-9,8	0,06
A5	-9,2	0,18	-10,1	0,03	-10,0	0,04
A6	-9,2	0,18	-10,1	0,03	-10,2	0,03
A7	-8,6	0,49	-10,0	0,04	-8,8	0,35
A8	-8,7	0,41	-10,5	0,02	-8,8	0,35
A10	-11,2	0,00	-11,7	0,01	-11,1	0,01
A11	-10,1	0,03	-11,6	0,01	-10,4	0,02
1	-8,0	1,36	-8,2	0,97	-8,1	1,15
2	-7,8	1,91	-8,7	0,42	-8,2	0,97
3	-8,2	0,97	-9,5	0,11	-7,9	1,61
4	-8,2	0,97	-8,2	0,97	-8,6	0,49
5	-8,8	0,35	-9,3	0,15	-7,8	1,91
6	-8,4	0,69	-8,1	1,15	-8,4	0,69
7	-8,5	0,58	-8,2	0,97	-7,7	2,26
8	-8,0	1,36	-8,4	0,69	-7,6	2,68
9	-8,0	1,36	-9,1	0,21	-8,5	0,58
10	-9,1	0,21	-8,6	0,49	-8,0	1,36
11	-7,9	0,61	-8,8	0,35	-8,5	0,58
12	-9,1	0,21	-8,4	0,69	-8,5	0,58
13	-9,1	0,21	-8,7	0,41	-8,1	1,15
14	-8,8	0,35	-7,9	1,61	-8,1	1,15
15	-7,8	1,91	-8,2	0,97	-8,0	1,36
16	-9,1	0,21	-8,3	0,82	-9,9	0,05
17	-6,6	14,51	-6,4	20,33	-5,9	47,29
18	-7,5	3,17	-7,6	2,68	-7,2	5,27
19	-7,0	7,38	-7,0	7,38	-6,4	20,33
20	-6,3	24,07	-6,5	17,17	-6,0	39,95
21	-8,4	0,69	-8,3	0,82	-8,1	1,15
22	-8,7	0,41	-7,9	1,61	-8,0	1,36
23	-8,5	0,58	-9,0	0,25	-7,9	1,61
24	-8,1	1,15	-8,1	1,15	-7,6	2,68
25	-8,7	0,41	-8,3	0,82	-7,8	1,91
26	-9,0	0,25	-9,0	0,25	-8,8	0,35
27	-8,5	0,59	-8,0	1,36	-8,3	0,82
28	-7,9	1,62	-8,5	0,58	-8,1	1,15
29	-9,7	0,08	-9,3	0,15	-9,1	0,21
Ertapenem	-9,1	0,213	-10,1	0,03	-10,6	0,01
Klavulanik Asit	-6,5	17,17	-6,8	10,35	-6,5	17,17

Her üç enzimde de en yüksek afiniteye sahip bileşik A10 olarak belirlenmiştir. Karbapenem antibiyotikleri arasında β -laktamaz enzimlerine afinitesi en yüksek olan antibiyotiğin ertapenem olduğu bilinmektedir (Pina-Vaz ve ark., 2016). Klavulanik asit inhibitörünün ise KPC-2 ve AmpC enzimlerine etki etmediği rapor edilmiştir (Watkins ve ark., 2013). Doking yöntemini test amacıyla ertapenem ve klavulanik asit ile de doking yapılmıştır. Beklendiği gibi ertapenem bu enzimlere çok güçlü afinite göstermiş, klavulanik asit ise çok zayıf bağlanmıştır. Ertapenem ile yapılan doking sonucunda bulunan bağlanma enerjisi ile A10 bileşiği karşılaştırıldığında, A10 bileşiğinin enzimlere afinitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

3.1.1 Enzim-ligand Bağlanma Etkileşimlerinin İncelenmesi

Esnek doking çalışmaları sonucunda yüksek bağlanma afinitesine sahip bileşiklerin, enzim-substrat etkileşimleri BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5 - 2013 programı kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma da potansiyel, seçici serin β -laktamaz inhibitörü araştırıldığından her 3 enzimde de yüksek afiniteye sahip bileşikler; A5, A6, A10, A11, 16 ve 29 olarak belirlenmiştir. Bu bileşiklerin bağlanma mekanizmaları aşağıda detaylı bir şekilde incelenmiştir.

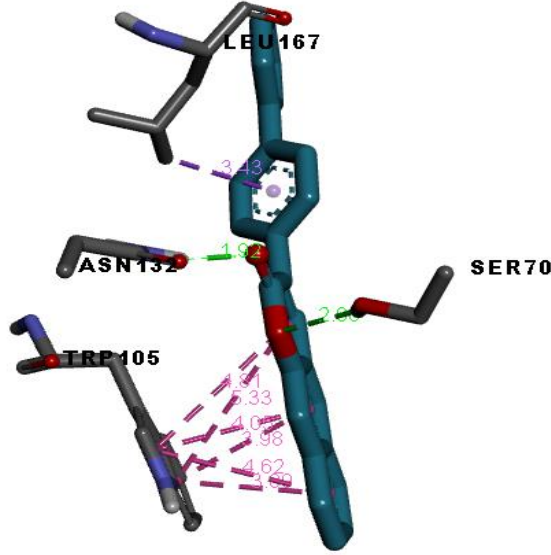
3.1.1.1 Sınıf A KPC-2 Doking Sonuçları

Ertapenem'in karbapenem antibiyotikleri arasında β -laktamaz enzimlerine en yüksek afinite gösterdiği bilinmektedir (Pina-Vaz ve ark., 2016). KPC-2 enzimine doklanması - 9.1 kkal/mol bağlanma enerjisi ile olmuştur. Kumarin bileşiklerinden A5, A6, A10 ve 29 ertapenem'den daha iyi bağlanma gösterirken 10, 12, 13, 16 aynı derecede bağlanmıştır. Sınıf A β -laktamazlar KPC-2'de dahil olmak üzere aktif bölgesinde yer alan SER70 aminoasit kalıntısı ile β -laktam antibiyotiklerini hidroliz ederler (Nass ve ark., 2016). Bu yüzden doking sonuçlarını incelerken özellikle SER70 aminoasit ile etkileşen bileşikler potansiyel olarak belirlenmiştir. Bu nedenle A6, A10, 16 ve 29 bileşikleri incelenmiştir.

Şekil 3.1'de A6'nın KPC-2'ye iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimlerin SER70, ASN132 ile H-bağları ve TRP105 ile de π - π istifleşme etkileşimleri olduğu görülmektedir. Şekil 3.2'de de görüldüğü gibi A10'nun KPC-2'ye iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER70 ve SER130 ile H-bağları, TRP105 ile de π - π istifleşme etkileşimleridir. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi 16'nın KPC-2'ye iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER70,

THR235, ASN132, ASN170, LYS73 ile H-bağlarının yanı sıra TRP105 ile de yaptığı π - π istifleşme etkileşimleridir. Şekil 3.4’de görüldüğü gibi 29’un enzime iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER70 ve ASN132 ile H-bağları, TRP105 ile de π - π istifleşme etkileşimleridir.

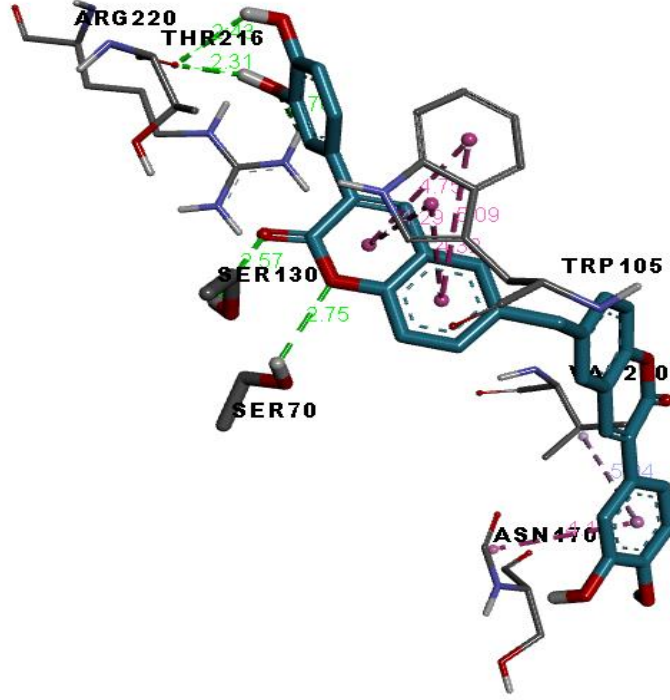
A6- ΔG : -9.2 kcal/ mol



SER70-OH (H) A6: Kum-O (O) (H bağı 2.95)
ASN132-NH2 (H) A6: Kum-C=O (O) (H bağı 1.92)
LEU167 A6: Fenil (π -sigma 3.43)
TRP105 A6: Kum (π - π stacked 4.81)
TRP105 A6: Kum (π - π stacked 5.33)
TRP105 A6: KumFenil (π - π stacked 4.05)
TRP105 A6: KumFenil (π - π stacked 3.98)
TRP105 A6: BitişikFenil (π - π stacked 4.62)
TRP105 A6: BitişikFenil (π - π stacked 3.89)

Şekil 3.1 A6 bileşiğinin KPC-2’nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

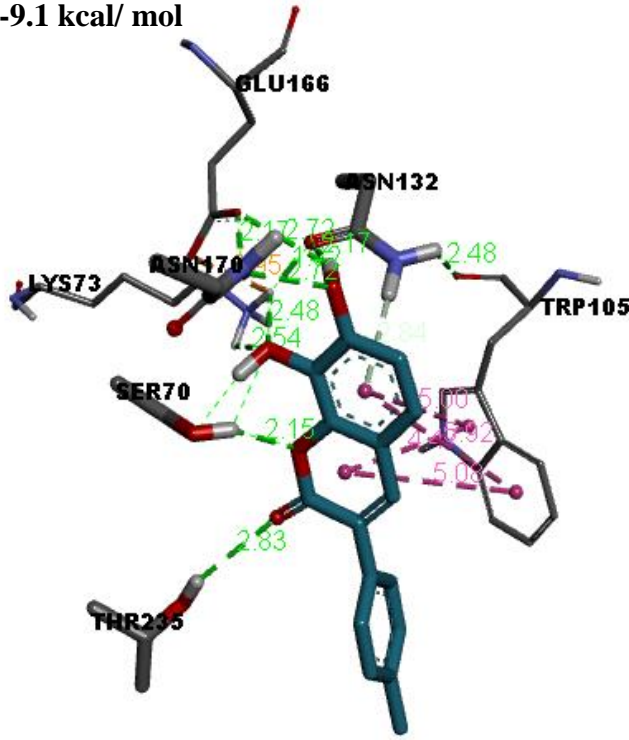
A10- ΔG : -11.2 kcal/ mol



- SER70-OH A10: Kum-O (H bağı 2.75)
SER130-OH(H) A10: Kum-C=O(O) (H bağı 2.57)
ARG220-NH₂(H) A10: Fenil-OH(O) (H bağı 2.76)
THR216-C=O(O) A10: Fenil-OH(H) (H bağı 2.31)
THR216-C=O(O) A10: Fenil-OH(H) (H bağı 2.43)
GLU168-C=O(O) A10: Fenil-OH(H) (H bağı 2.73)
TRP105 A10: Kum (π - π stacked 4.75)
TRP105 A10: Kum (π - π stacked 5.09)
TRP105 A10: KumFenil (π - π stacked 4.32)
TRP105 A10: KumFenil (π - π stacked 4.29)

Şekil 3.2 A10 bileşiğinin KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

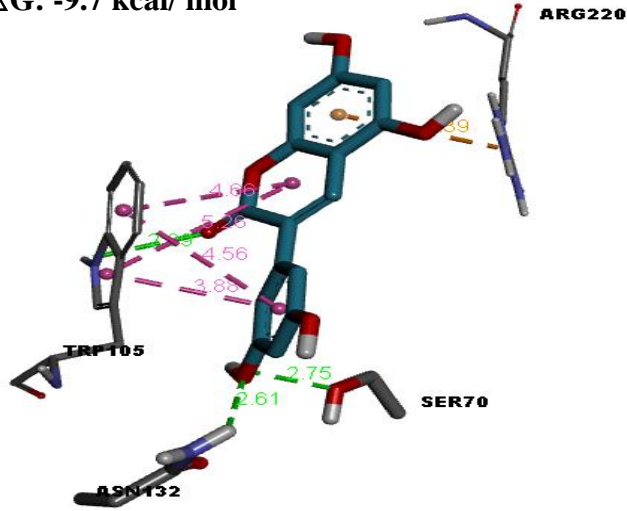
16- ΔG : -9.1 kcal/ mol



SER70-OH (H).... 16: Kum-O (H bağı 2.15)
SER70-OH (O).... 16: KumFenil-OH (H) (H bağı 2.23)
SER70-OH (H) 16: KumFenil-OH (H bağı 2.23)
THR235-OH (H) 16: : Kum-C=O (O) (H bağı 2.82)
LYS73-NH₃ (H) 16: KumFenil-OH (H bağı 2.48)
LYS73-NH₃ (H) 16: KumFenil-OH (H bağı 2.54)
ASN132-C=O (O) 16: KumFenil-OH (H bağı 2.17)
ASN170-NH₂ (H) 16: KumFenil-OH (H bağı 2.72)
GLU166-O 16: KumFenil-OH (H) (H bağı 2.72)
ASN132-NH₂ (H) BitişikFenil (π -Donör H bağı)
TRP105 A10: Kum (π - π stacked 5.08)
TRP105 A10: Kum (π - π stacked 4.47)
TRP105 A10: KumFenil (π - π stacked 5.92)
TRP105 A10: KumFenil (π - π stacked 5.00)

Şekil 3.3 16 bileşiğinin KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

29- ΔG : -9.7 kcal/ mol



- SER70-OH (O) 29: Fenil-OH (H) (H bağı 2.75)
ASN132-NH₂ (H) 29: Fenil-OH (O) (H bağı 2.61)
TRP-105- NH (H) 29: Kum-C=O (O) (H bağı 2.99)
ARG220 29: KumFenil (π -katyon 4.39)
TRP105 29: Kum (π - π stacked 4.66)
TRP105 29: Kum (π - π stacked 5.26)
TRP105 29: Fenil (π - π stacked 4.56)
TRP105 29: Fenil (π - π stacked 3.88)

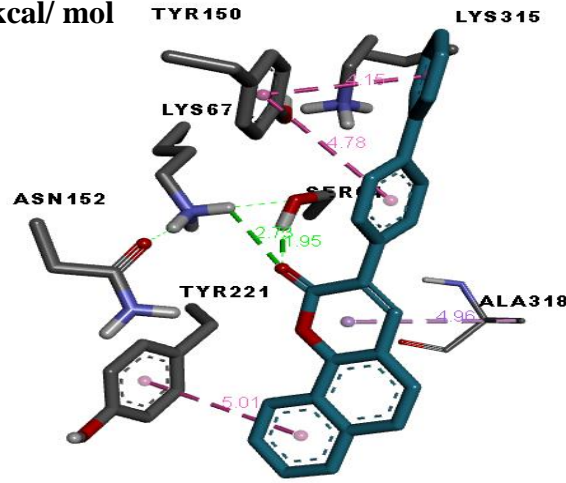
Şekil 3.4 29 bileşiğinin KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

3.1.1.2 Sınıf C AmpC Doking Sonuçları

Ertapenem'in AmpC enzimine doklanması -10.1 kkal/mol bağlanma enerjisi tahmin etmiştir. Kumarin bileşiklerinden A4, A8, A10 ertapenem'den daha iyi bağlanma gösterirken. A1, A5 ve A6 aynı derecede bağlanmıştır. Sınıf C β -laktamazlar AmpC'de dahil olmak üzere aktif bölgesinde yer alan SER64 aminoasit kalıntısı ile β -laktam antibiyotiklerini hidroliz ederler (Jacoby, 2009). Bu yüzden özellikle SER64 ile etkileşen bileşikler potansiyel olarak belirlenmiştir. Bu bileşiklerden A5, A6 ve A10 bileşiklerinin bağlanma mekanizmaları incelenmiştir. Şekil 3.5'de A5 numaralı bileşiğin AmpC'ye iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER64 ve LYS67 ile H-bağları ve TYR160 ile de π - π istifleşme etkileşimleridir. Şekil 3.6'de görüldüğü gibi A6'nın AmpC'ye iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER64 ASN346, THR316 ile H-bağları, LEU293 ile de π -alkil etkileşimleridir. Şekil 3.7'de A10'nun AmpC'ye iyi bağlanmasını sağlayan

etkileşimlerin SER64, LYS315, THR316 ile H-bağları, TYR150 ve TYR221 ile de π - π istiflemeleri olduğu görülmektedir.

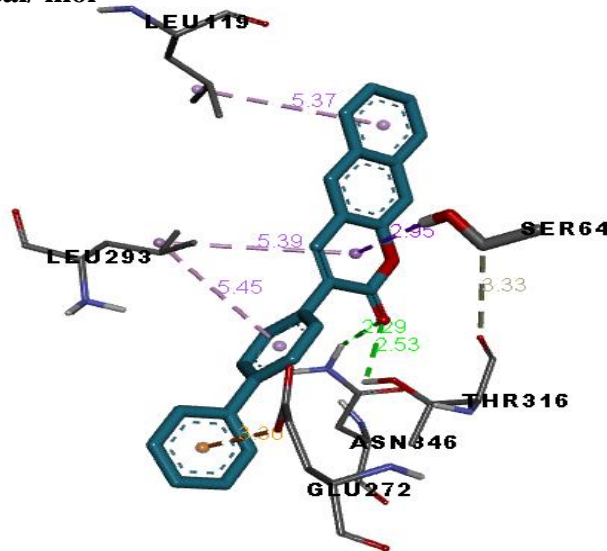
A5- ΔG : -10.1 kcal/ mol



SER64-OH (H) A5: Kum-C=O (O) (H bağı 1.95)
 LYS67-NH3 (H) A5: Kum-C=O (O) (H bağı 2.73)
 ALA318 A5: Kum (π -Alkil 4.96)
 TYR150 A5: Fenil (π - π stacked 4.78)
 TYR150 A5: Fenil (π - π stacked 4.15)
 TYR221 A5: Fenil (π - π T-shaped 5.01)

Şekil 3.5 A5 bileşiğinin AmpC'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu

A6- ΔG : -10.1 kcal/ mol

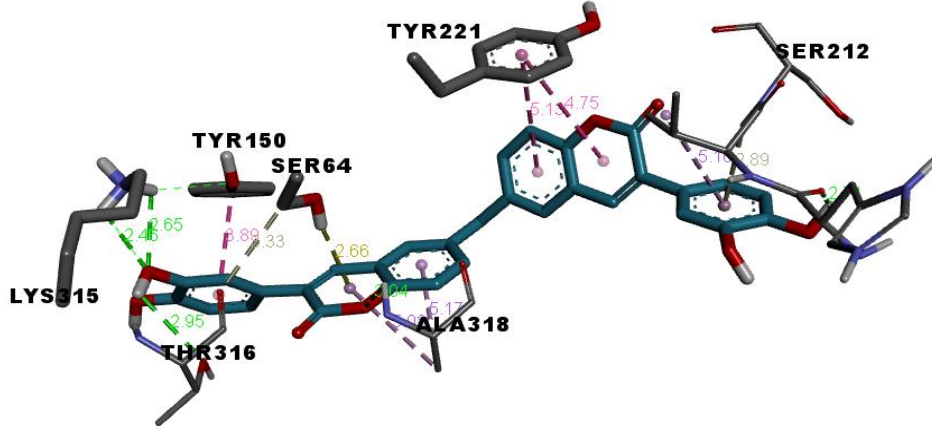


SER64-OH (H) A6: Kum (π) (π -donor H bağı 2.95)
 ASN346-NH2 (H) A6: Kum-C=O (O) (H bağı 2.29)
 THR316-OH (H) A6: Kum-C=O (O) (H bağı 2.53)

LEU293 A6: Fenil (π) (π -Alkil 5.45)
LEU293 A6: Kum (π) (π -Alkil 5.39)
LEU119 A6: BitişikFenil (π) (π -Alkil 5.37)
GLU272 A6: Fenil (π) (π -Anyon 3.30)

Şekil 3.6 A6 bileşiğinin AmpC'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

A10- ΔG : -11.7 kcal/ mol



SER64-OH (H) A10: Kum (π) (π -donor H bağı 2.66)
TYR150 A10: Fenil (π - π stacked 3.89)
THR316-OH (O) A10: Fenil-OH (H) (H bağı 2.95)
LYS315-NH3 (H) A10: Fenil-OH (O) (H Bağı 2.65)
LYS315-NH3 (H) A10: Fenil-OH (O) (H Bağı 2.46)
THR316-OH (H) A10:Fenil-OH (O) (H bağı 2.95)
ALA318 A10: Kum (π) (π -Alkil 5.08)
ALA318 A10: BitişikFenil (π) (π -Alkil 5.17)
ALA318-NH (H) A10: Kum-O (O) (H bağı 3.04)
TYR221 A10: BitişikFenil (π) (π - π stacked 5.13)
TYR221 A10: Kum (π) (π - π stacked 4.75)
SER212-NH (H) A10: Fenil (π) (π -donor H bağı 2.89)

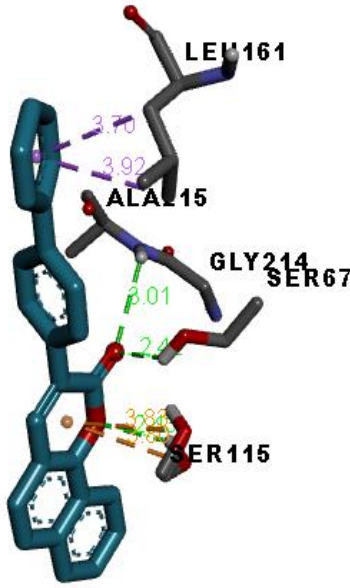
Şekil 3.7 A10 bileşiğinin AmpC'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

3.1.1.3 Sınıf D OXA-1 Doking Sonuçları

Ertapenem'in OXA-1 enzime doklanması sonucunda bu enzime diğer enzimlerden çok daha kuvvetli bağlandığı (-10.6 kkal/mol) ve seçici olduğu görülmüştür. Kumarin bileşiklerinden A5, A6, A10 ve A11 ertapenem'e en yakın bağlanma afinitesi gösteren ligandlardır. Sınıf D β -laktamazlar OXA-1' de dahil olmak üzere aktif bölgesinde yer alan SER67 aminoasit kalıntısı ile β -laktam antibiyotiklerini hidroliz ederler (Jacoby, 2009). Bu yüzden doking sonuçları incelenirken özellikle SER67 aminoasidi ile etkileşen

bileşikler potansiyel olarak belirlenmiştir. Bu bileşiklerden A5, A6, A10, 16 ve 29 için bağlanma mekanizması incelenmiştir. Şekil 3.8’de görüldüğü gibi A5’in OXA-1’e iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER67, ALA215, SER115 ile H-bağları, LEU161 ile yaptığı π -sigma etkileşimidir. Şekil 3.9’da A6’nın OXA-1’e iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER67, ALA215 ve SER115 ile H-bağlarının yanı sıra SER115 ile yaptığı π -kasyon etkileşimleri olduğu görülmektedir. Şekil 3.10’da A10’nun OXA-1’e iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER67, LEU255, SER115 ile H-bağları, LEU161 ile de π -alkil etkileşimleridir. Şekil 3.11’de görüldüğü gibi 16’nın OXA-1’e iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER67, ALA215 ile H-bağları ve ALA215 ile de π -alkil, LEU161 ile π -alkil ve alkil-alkil etkileşimleridir. Şekil 3.12’de 29 numaralı bileşiğin OXA-1’e iyi bağlanmasını sağlayan etkileşimler SER67, SER258 ile H-bağları, ALA215 ve LEU161 ile de π -alkil etkileşimleridir.

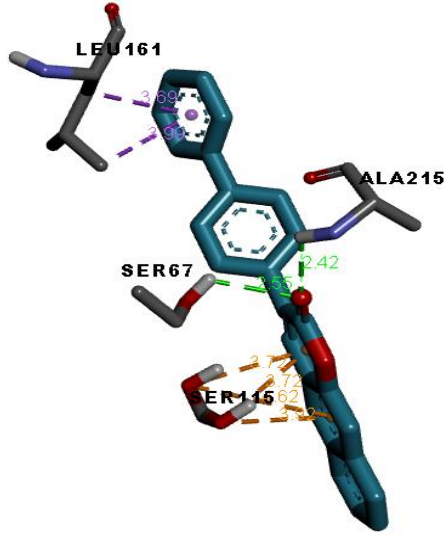
A5- ΔG : -10 kcal/ mol



SER67-OH (H) A5: Kum-C=O (O) (H bağı 2.42)
 ALA215-NH (H) A5: Kum-C=O (O) (H bağı 3.02)
 SER115-OH (H) A5: Kum-O (O) (H bağı 2.43)
 SER115-OH A5: Kum (π -Kasyon 3.83)
 SER115-OH A5: Kum (π -Kasyon 3.80)
 LEU161 A5: Fenil (π -Sigma 3.92)
 LEU161 A5: Fenil (π -Sigma 3.70)

Şekil 3.8 A5 bileşiğinin OXA-1’in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

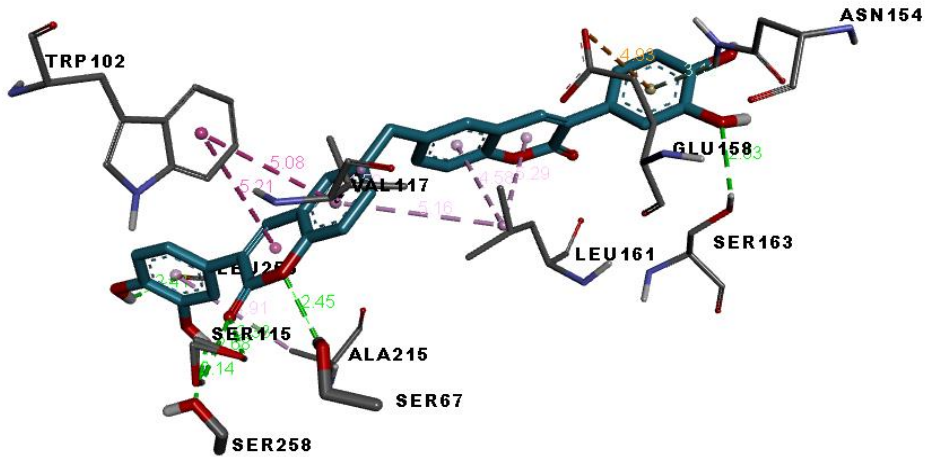
A6- ΔG : -10.2 kcal/ mol



SER67-OH (H) A6: Kum-C=O (O) (H bağı 2.55)
SER115-OH A6: Kum (H bağı 3.92)
SER115-OH A6: Kum (π -Katyon 3.72)
SER115-OH A6: Kum (π -Katyon 3.72)
SER115-OH A6: Kum (π -Katyon 4.62)
ALA215-NH A6: Kum-C=O (O) (H bağı 2.42)
LEU161 A6: Fenil (π -Sigma 3.69)
LEU161 A6: Fenil (π -Sigma 3.99)

Şekil 3.9 A6 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

A10- ΔG : -11.1 kcal/ mol

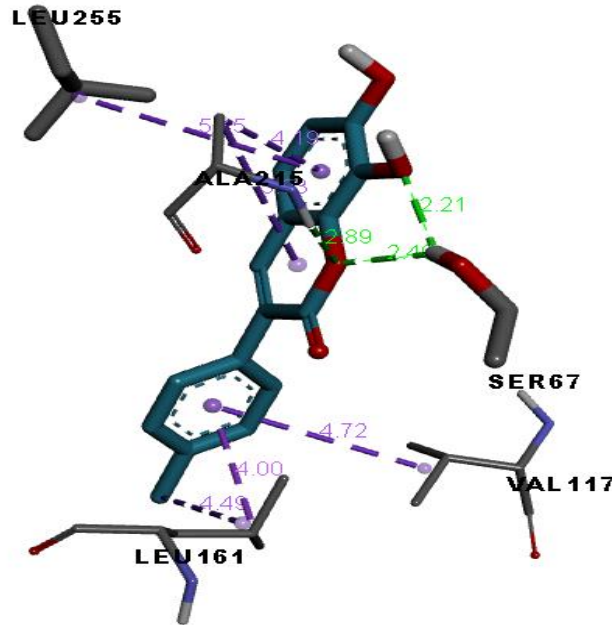


SER67-OH (H) A10: Kum-O (O) (H bağı 2.45)
SER258-OH (O) A10: Fenil-OH (H) (H bağı 2.14)
LEU255-OH (O) A10: Fenil-OH (H) (H bağı 2.41)
SER115-OH (H) A10: Kum-C=O (O) (H bağı 2.68)

SER115-OH (H) A10: Kum-C=O (O) (H bağı 2.33)
 ALA215 A10: Fenil (π -Alkil 4.91)
 TRP102 A10: Kum (π - π T-shaped 5.21)
 TRP102 A10: KumFenil (π - π T-shaped 5.08)
 VAL117 A10: KumFenil (π -Alkil 4.50)
 LEU161 A10: KumFenil (π -Alkil 5.16)
 LEU161 A10: KumFenil (π -Alkil 4.58)
 LEU161 A10: Kum (π -Alkil 5.29)
 GLU158 A10: Fenil (π -Anyon 4.93)
 ASN154 A10: Fenil (π -Donör H bağı 3.12)
 SER163-OH (H) A10: Fenil-OH (O) (H bağı 2.63)

Şekil 3.10 A10 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

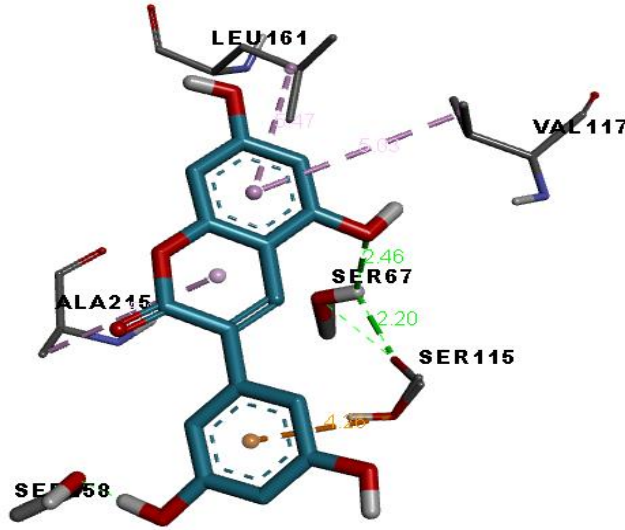
16- ΔG : -9.9 kcal/ mol



SER67-OH (H) 16: Kum-O (O) (H bağı 2.40)
 SER67-OH (H) 16: KumFenil-OH (O) (H bağı 2.21)
 ALA215-NH (H) 16: Kum-O (O) (H bağı 2.89)
 ALA215 16: Kum (π -Alkil 5.03)
 ALA215 16: KumFenil (π -Alkil 4.19)
 LEU255 16: KumFenil (π -Alkil 4.45)
 VAL117 16: Fenil (π -Alkil 4.72)
 LEU161 16: Fenil (π -Sigma 4.00)
 LEU161 16: Fenil (Alkil-Alkil 4.49)

Şekil 3.11 16 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

29- ΔG : -9.1 kcal/ mol



- SER67-OH (H) 29: KumFenil-OH (O) (H bağı 2.48)
SER258-OH (O) 29: Fenil-OH (H) (H bağı 2.07)
SER115 29: Fenil (π -Kation 4.26)
ALA215 29: Kum (π -Alkil 5.05)
VAL117 29: KumFenil (π -Alkil 5.03)
LEU161 29: KumFenil (π -Alkil 5.47)

Şekil 3.12 29 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi ve bağlanma modu.

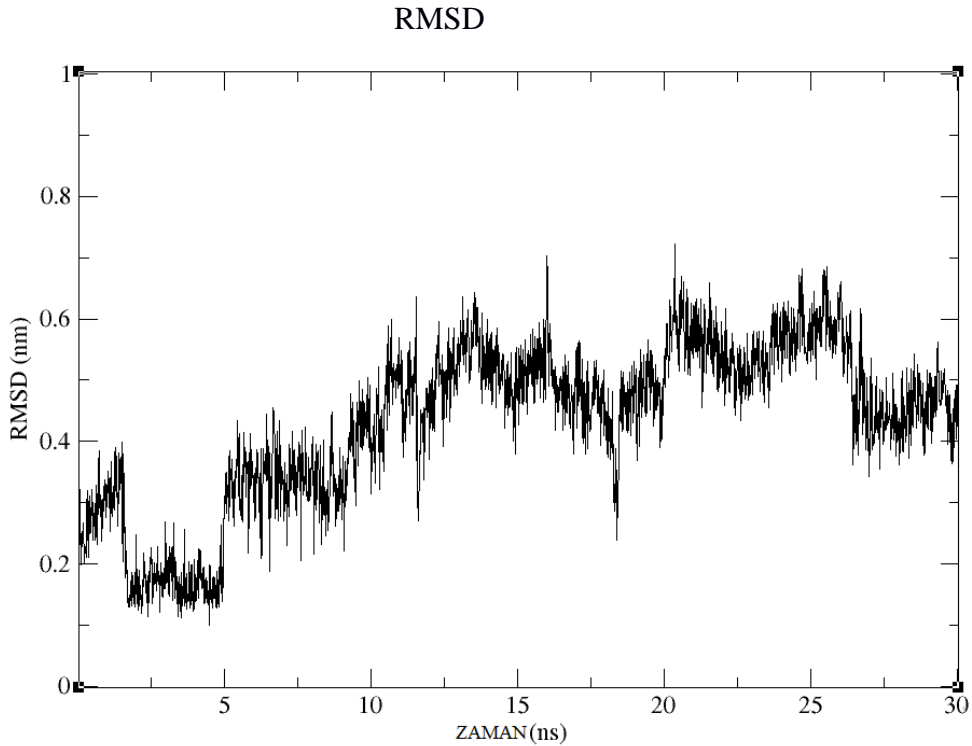
Yapılan incelemeler sonucunda her 3 enzimde A6 ve A10 bileşiklerinin katalitik etki gösteren sınıf A için SER70, sınıf C için SER64, sınıf D için SER67 aminoasit kalıntısı ile etkileştiği tespit edilerek potansiyel olarak belirlenmişlerdir.

3.2 Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları

Bu çalışmada sınıf A KPC-2, sınıf C AmpC, sınıf D OXA-1 enzimleri için potansiyel olarak belirlenen A10 bileşiğinin, doking çalışmalarında elde edilen enzim-ligand komplekslerinin 30 ns boyunca simülasyonu incelenerek, ligandın enzimin aktif bölgesindeki hareketleri, aktif bölgeden ayrılıp ayrılmadığı tespit edilmiştir.

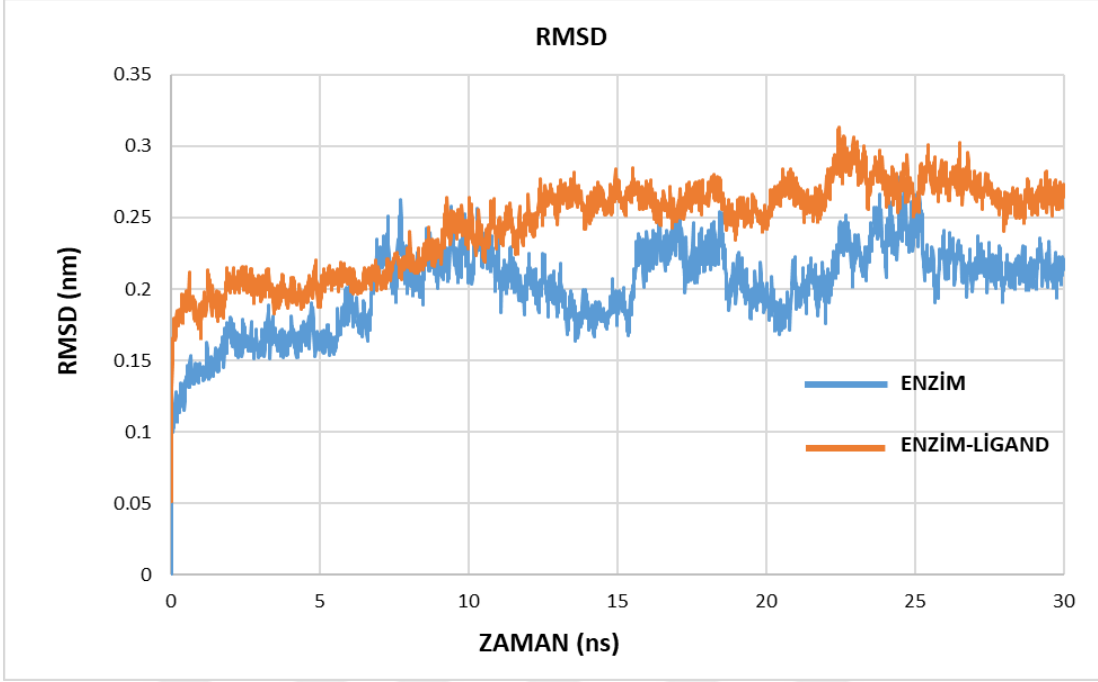
3.2.1 Sınıf A KPC-2 İçin MD Sonuçları

Ligandın bağlanma pozunun simülasyon boyunca ne kadar değiştiğini ölçmek için RMSD (root mean square deviation) grafiğine bakılmıştır. RMSD sonucu, ligandın bağlanma pozunun simülasyon sırasında ne kadar iyi korunduğunun anlaşılması için iyi bir göstergedir. Şekil 3.13' teki RMSD grafiğinde A10 ligand molekülünün bağlanma pozu, simülasyonun 12 ns- 25 ns arasında yaklaşık 0.4 nm'lik bir değişime uğradığı, daha sonraki 5 ns'lik süre boyunca büyük bir değişime uğramadığı görülmektedir.



Şekil 3.13 KPC-2 için A10 ligand molekülünün RMSD grafiği

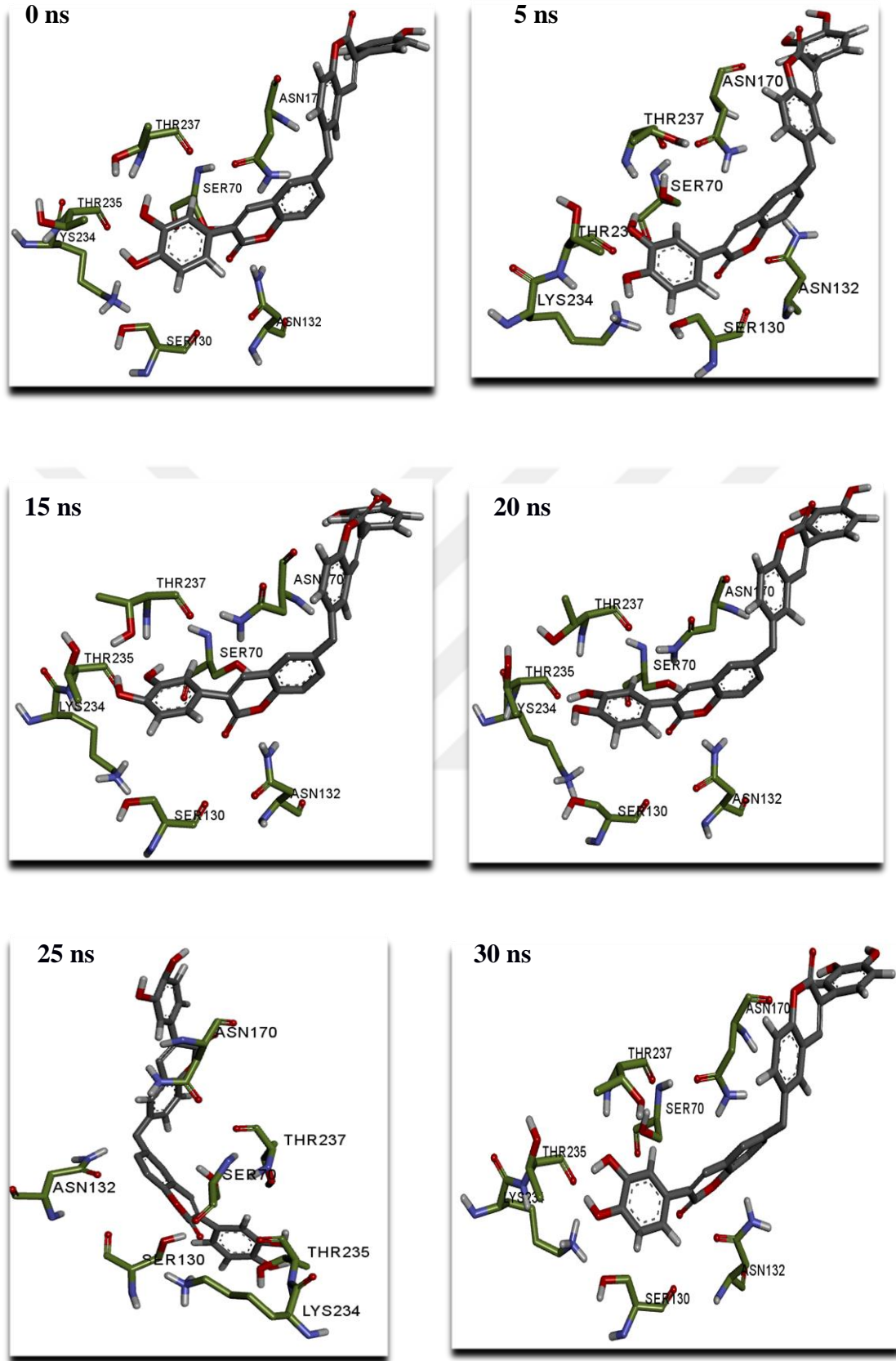
Şekil 3.14'deki grafikte, KPC-2 enziminin, hem enzim-ligand kompleksindeki hem de boş enzimdeki RMSD analizi verilmiştir. Bu analiz, enzimin başlangıç yapısındaki konumundan 30 ns'lik simülasyon boyunca ne kadar uzaklaştığı hakkında bilgi almamızı sağlar. Yani bu değerlere bakılarak yapı kararlılığı hakkında bazı ipuçları elde edilebilir. Bu amaçla enzimin, simülasyon zamanına bağlı olarak elde edilen grafik incelendiğinde, her iki yapının yaklaşık 0-7 ns arasında benzer şekilde ilk konumundan uzaklaştığı ve 25 ns'den sonra daha kararlı yapıya dönüştüğü, yaklaşık 10-15 ve 19-24 ns arasında boş enzimin komplekse göre daha kararlı yapıya dönüştüğü söylenebilir.



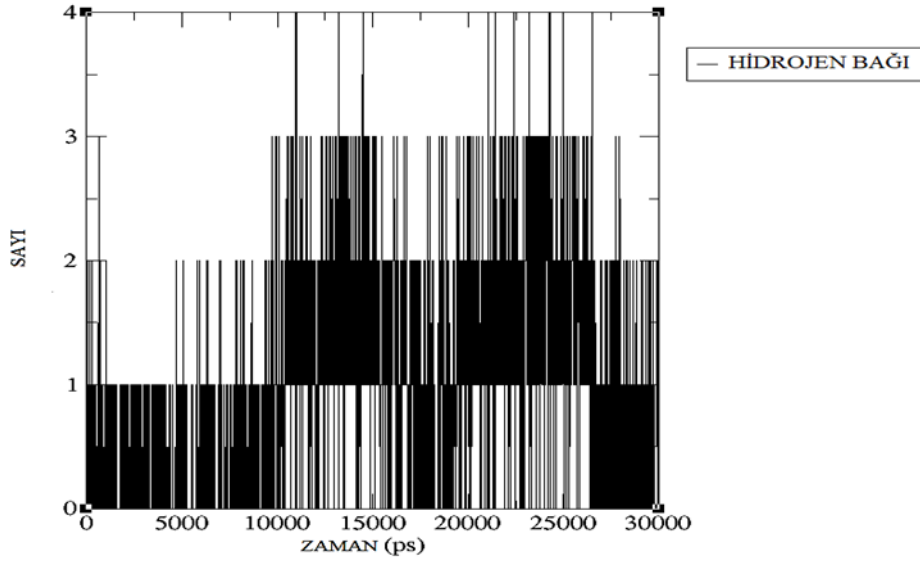
Şekil 3.14 KPC-2 için RMSD grafiği

Şekil 3.15’de enzim-ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns’deki görüntüleri incelendiğinde ligandın simülasyon boyunca aktif bölgeden ayrılmadığı görülmektedir.

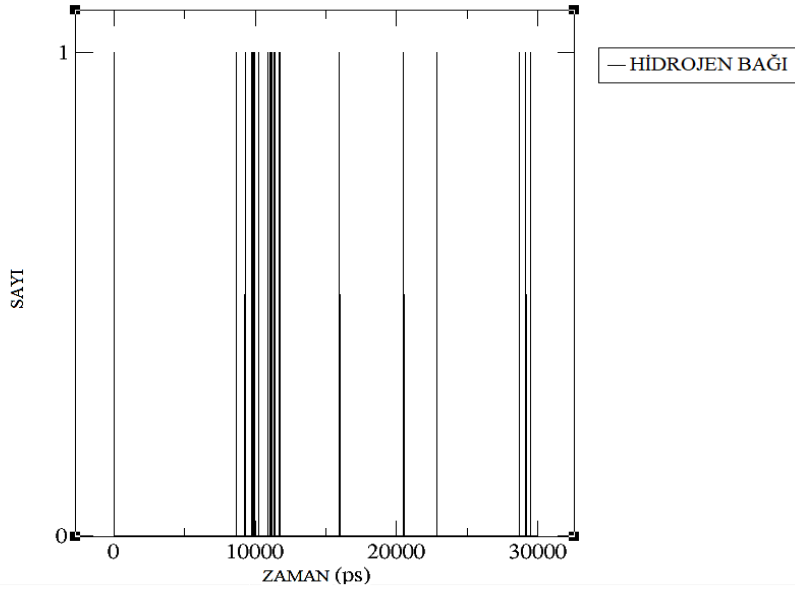
Şekil 3.16’daki grafikte, dikey eksen aktif bölgedeki aminoasitler ile ligand molekülü arasındaki H bağı sayısını, yatay eksen ise simülasyon süresini gösterir. Siyah çizgiler H bağı bulunduran en az bir veya daha fazla konformasyonu temsil eder. Siyah renk şiddetinin artması, o andaki H-bağı yapan konformasyon sayısının fazla olduğu anlamına gelir. Ligand molekülü simülasyon boyunca aktif bölgeden ayrılmadığı için, buradaki çeşitli aminoasitlerle H bağları yapmaktadır.



Şekil 3.15 KPC-2 veA10 ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns'lerdeki görüntüleri



Şekil 3.16 KPC-2'nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile A10 ligandı arasındaki H bağı sayısı grafiği. Hidrojen bağı sınır mesafe değeri ≤ 3.5 Å olarak ayarlanmıştır.

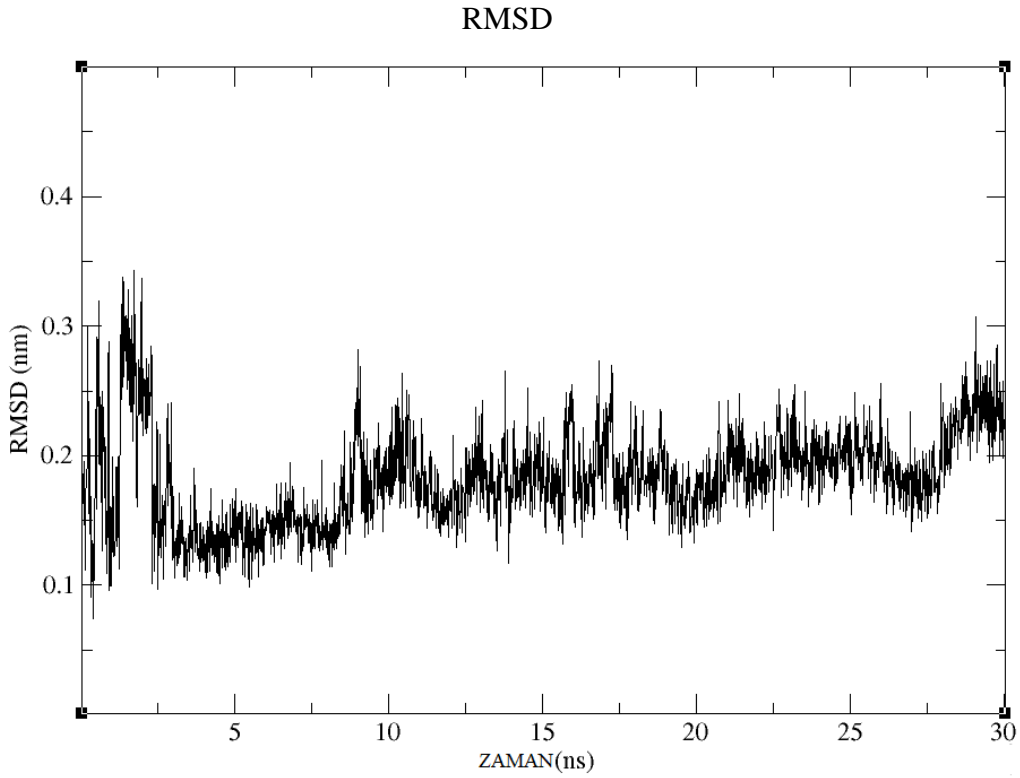


Şekil 3.17 SER70 aminoasit kalıntısı ile A10 ligand molekülünün H bağı grafiği. SER70 OH grubu ile kumarin iskeleti arasındaki hidrojen bağı sınır mesafe değeri ≤ 3.5 Å olarak ayarlanmıştır.

Şekil 3.17'de, β -laktam antibiyotiklerini hidroliz eden ve aktif bölgede bulunan SER70 aminoasit kalıntısı ile ligand molekülü arasında oluşan hidrojen bağı sayısı verilmiştir. Başlangıçta gözlenen H bağı kaybolduğu, simülasyonun ilerleyen zamanlarında, 10000 ps ve 30000 ps arasında H bağı tekrar oluştuğu görülmektedir.

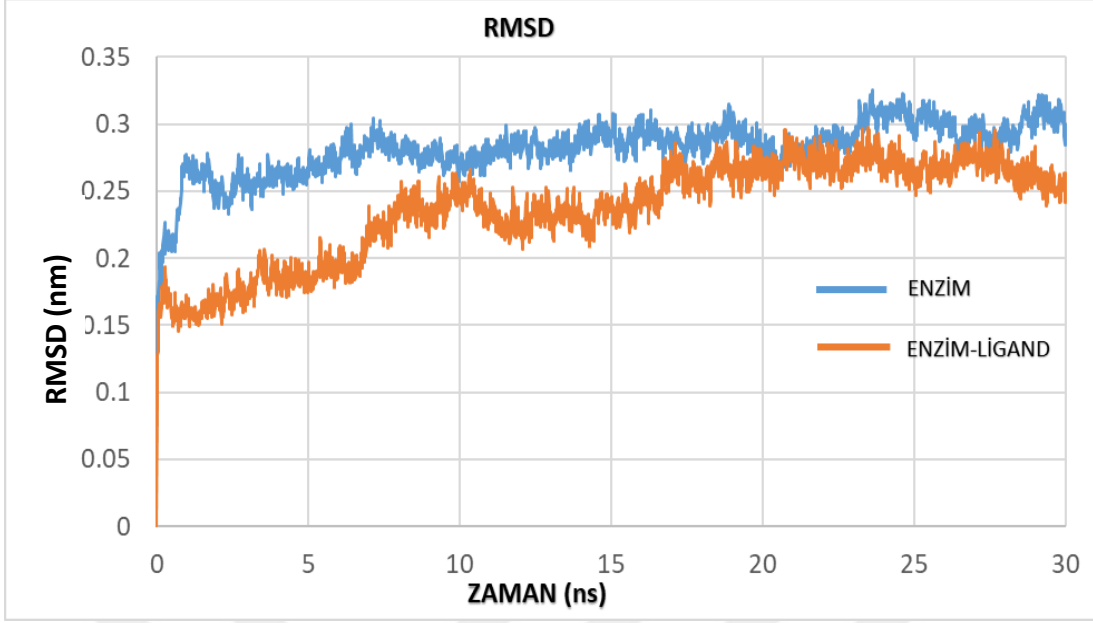
3.2.2 Sınıf C AmpC İçin MD Sonuçları

Şekil 3.18'deki RMSD grafiği incelendiğinde A10 ligand molekülünün ilk pozundan, simülasyon baŐlangıcında yaklaşık 0.2 nm (2Å) deđiŐtiđi ve daha sonra ise başlangıç pozuna yaklaŐtıđı ve son adımlarda ise ligandın pozunda ufak bir değişim olduğu (yaklaşık 0.15 nm= 1.5 Å) görülmüştür. Simülasyon incelendiğinde, Şekil 3.20'deki pozlarda görüldüğü gibi ligand aktif bölgeden ayrılmamakta ve konumunu büyük oranda korumaktadır.



Şekil 3.18 AmpC için A10 ligand molekülünün RMSD grafiği

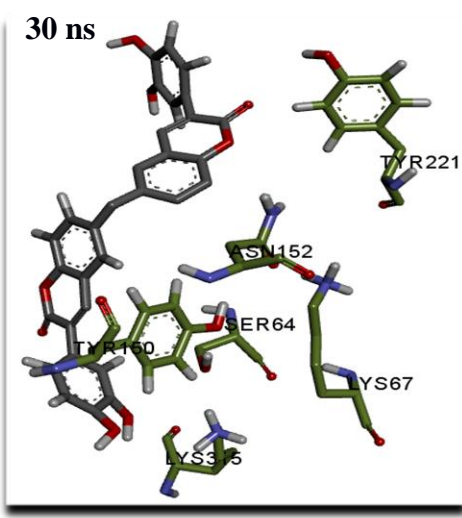
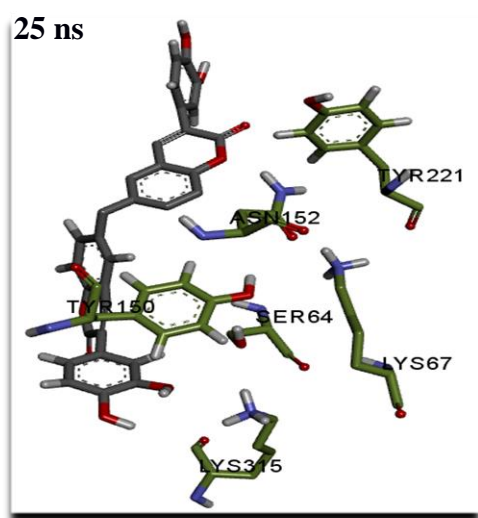
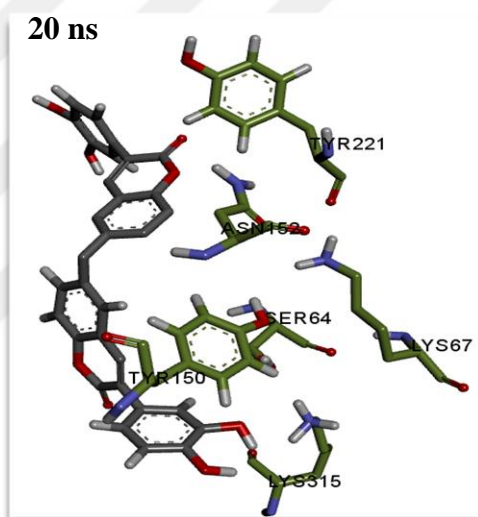
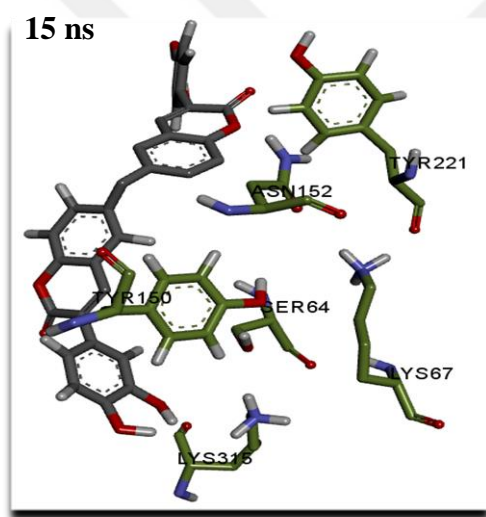
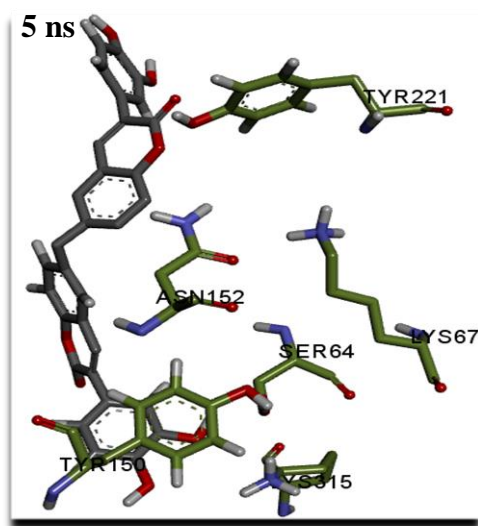
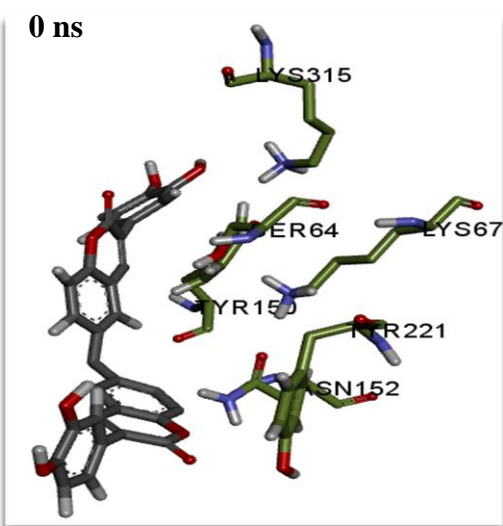
Şekil 3.19'deki grafikte, AmpC enziminin, hem enzim-ligand kompleksindeki hem de boş enzimdeki RMSD analizi verilmiştir. AmpC enziminin, simülasyon zamanına bağlı olarak elde edilen RMSD grafiği incelendiğinde, kompleks yapıdaki enzimin boş enzime göre daha kararlı yapı olduğu söylenebilir.



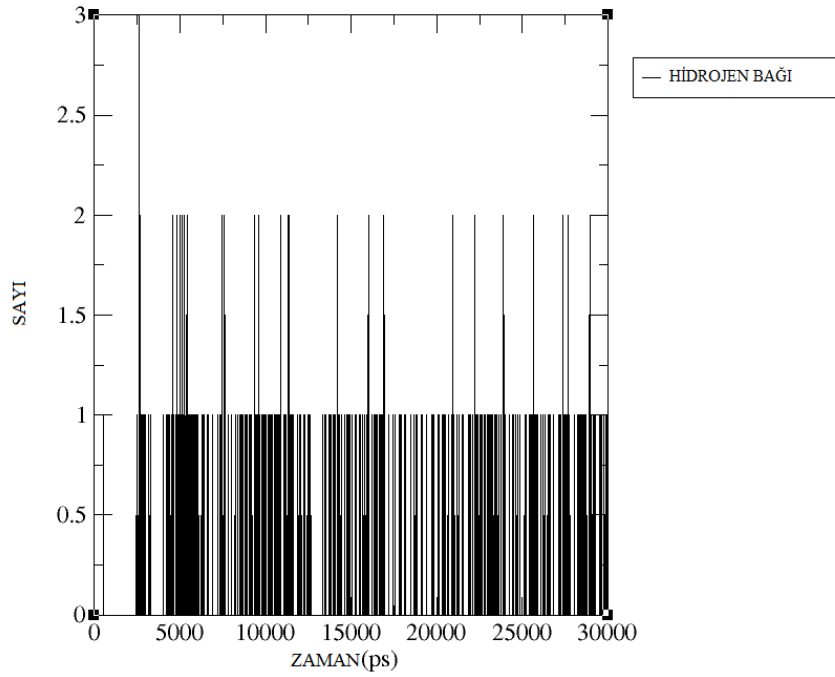
Şekil 3.19 AmpC için RMSD grafiği

Aşağıdaki Şekil 3.20’de enzim ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns’deki görüntülerin de ligandın aktif bölgeden ayrılmadığı görülmektedir.

Şekil 3.21’de AmpC enziminin aktif bölgesindeki aminoasit kalıntıları ile ligand molekülü arasında simülasyon boyunca oluşan H bağı sayısı görülmektedir. Ligand molekülü simülasyon boyunca aktif bölgede hareket ettiği için, simülasyon boyunca H bağı oluşumu görülmektedir.

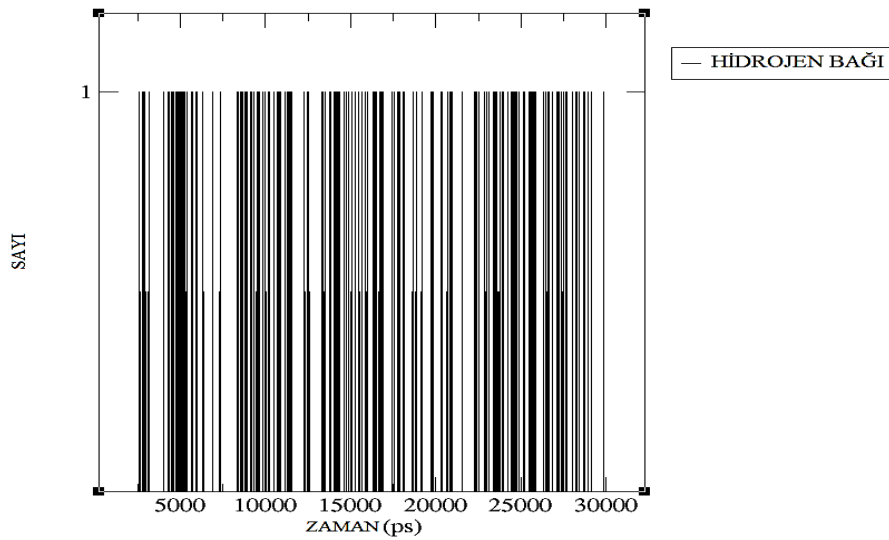


Şekil 3.20 AmpC ve A10 ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns’lerdeki görüntüleri



Şekil 3.21 AmpC’nin aktif bölgesindeki aminoasitler ile A10 ligandı arasında oluşan H bağ sayısı grafiği

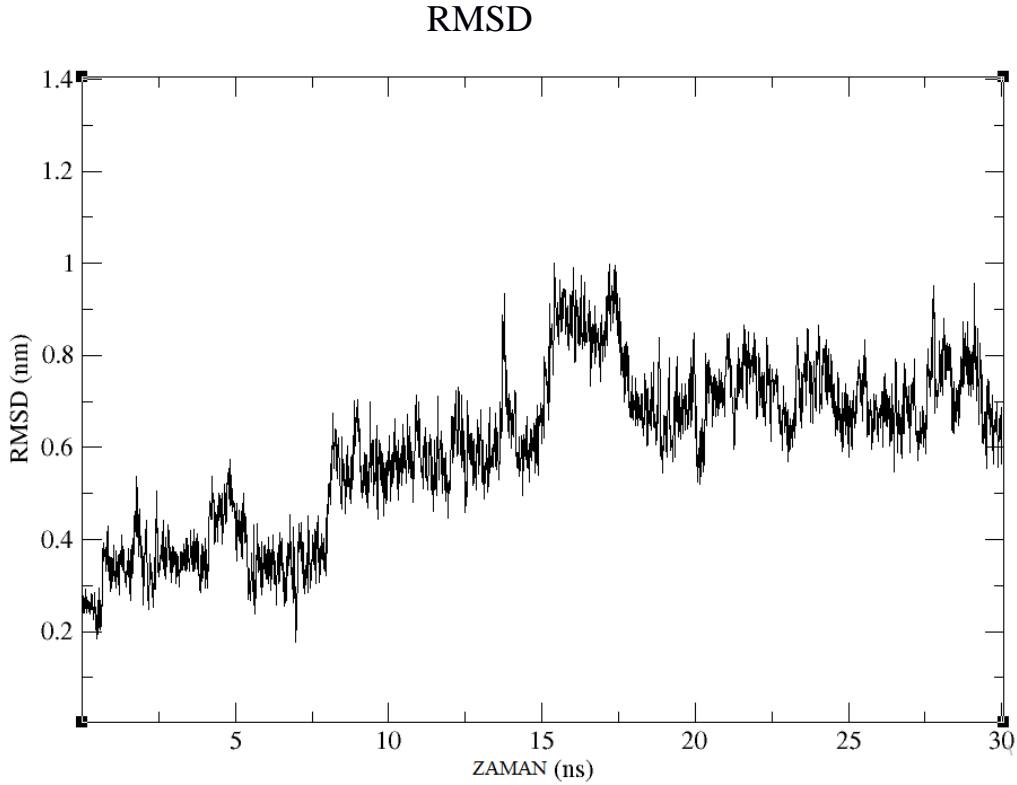
Aşağıdaki Şekil 3.20’deki grafikte ilk 2500 ps’ye kadar ligand molekülü ile β -laktam antibiyotiklerini hidoliz eden SER64 aminoasit kalıntısı arasında H bağı gözlenmemesine rağmen, simülasyon ilerledikçe 2500 ps ile 30000 ps arasında H bağı gözlenmektedir.



Şekil 3.22 SER64 aminoasit kalıntısı ile A10 ligand molekülünün H bağı grafiği

3.2.3 Sınıf D OXA-1 İçin MD Sonuçları

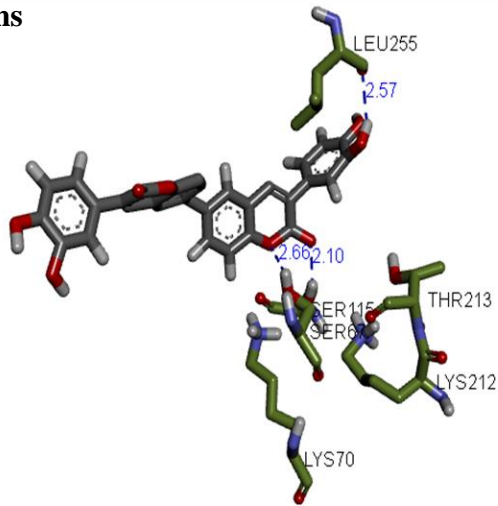
Şekil 3.23'deki RMSD grafiğinde A10 ligand molekülünün pozunda değişimler olduğu görülmektedir. Simülasyonun son 10 ns de ligand molekülünün pozunu koruduğu görülmektedir. Simülasyon incelendiğinde son 10 ns'de ligandın aktif bölgenin dışında fakat genellikle LEU255 aminoasit kalıntısı ile etkileşimine devam ederek, 30ns'deki gibi hareket ettiği görülmektedir.



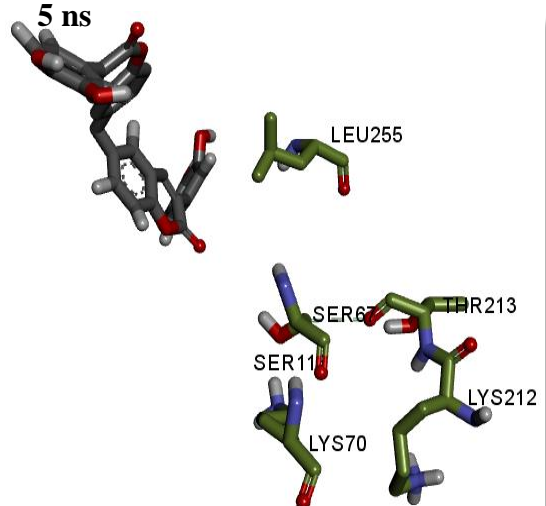
Şekil 3.23 OXA-1 için A10 ligand molekülünün RMSD grafiği

Enzim ligand kompleksinin 0, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns'deki görüntüleri Şekil 3.24' deki gibidir. Simülasyon ve görüntüler incelendiğinde ligandın enzimin aktif bölgesi yakınında bir bölgede hareket ettiği tespit edilmiştir. Ligand molekülünün başlangıçta SER67 ile oluşan H bağına koruyamadığı şekilde de görülmektedir.

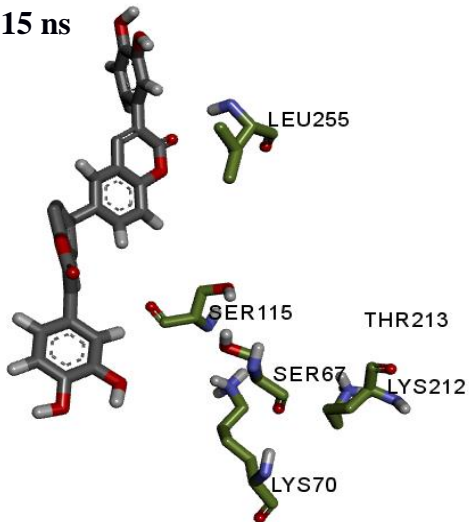
0 ns



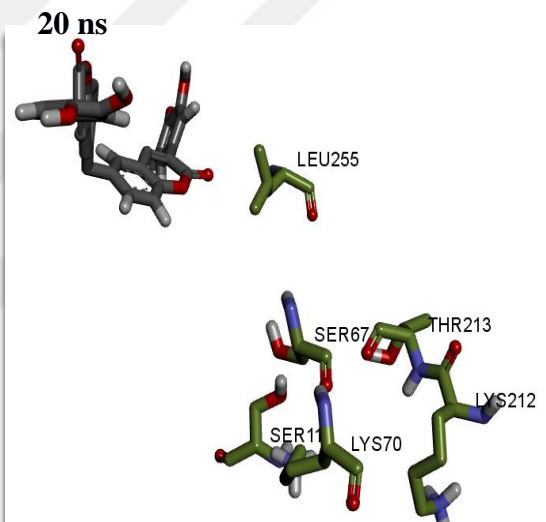
5 ns



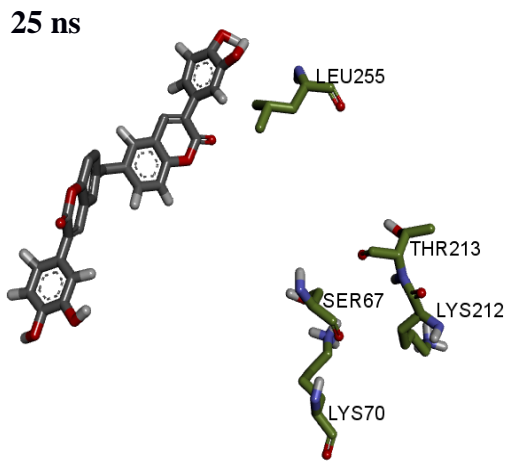
15 ns



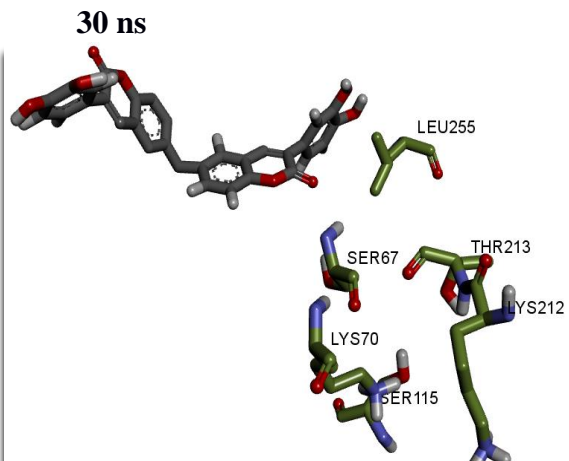
20 ns



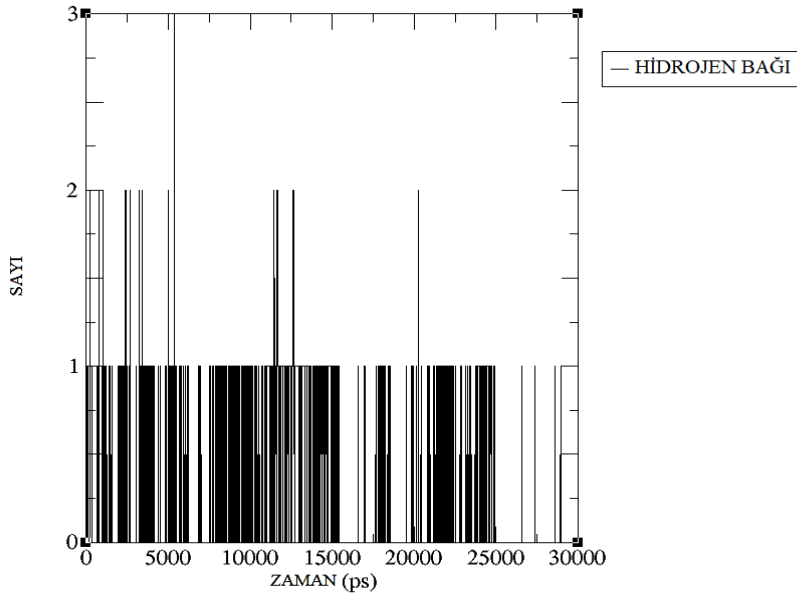
25 ns



30 ns



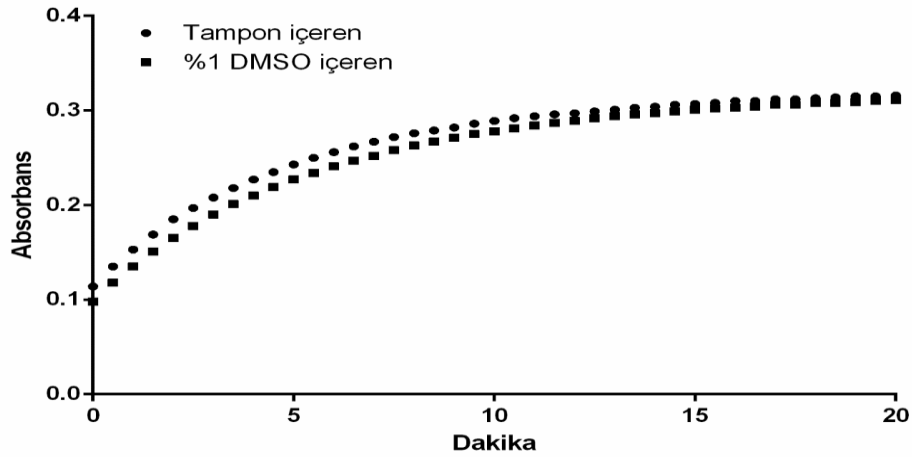
Şekil 3.24 OXA-1 ve A10 ligand kompleksinin 1, 5, 15, 20, 25 ve 30 ns’deki görüntüleri 30 ns’lik simülasyon boyunca, enzimin aktif bölgesindeki aminoasitler ile A10 ligand molekülü arasındaki H-bağı grafiği Şekil 3.25’deki gibidir. Ligand molekülünün genellikle aktif bölgeden uzaklaşmasına rağmen LEU255 aminoasit kalıntısı ile bazı konformasyonlarda ise LEU255 ek olarak SER115 aminoasit kalıntısı ile de etkileşimini korumasına bağlı olarak grafikte, H bağ oluşumu görülmektedir. Grafikte görülen 1200-1500 arasında ki H bağları ligand ve LEU255 aminosit kalıntısı arasında oluşmaktadır. Simülasyon boyunca, aktif bölgede yer alan ve β -laktam antibiyotiklerini hidroliz eden SER67 aminoasit kalıntısı ile ligand arasında H bağ oluşumu gözlenmemiştir. Son adımlarda ligand aktif bölgeden ayrıldığı için H bağ oluşumu azdır.



Şekil 3.25 OXA-1’in aktif bölgesindeki aminoasitler ile A10 ligandı arasında oluşan H bağ sayısı grafiği

3.3 *In Vitro* Analiz Sonuçları

Enzim aktivitesi çalışmalarında 20 dakika sonunda 490 nm’de absorbans farkı 0.213 olarak ölçülmüştür ve aktivite grafiği Şekil 3.24’de verilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine kumarinlerin çözünmesinde kullanılan DMSO’nun kullanıldığı konsantrasyonda (% 1) etkisinin olmadığı belirlenmiştir ve bu verilerin ışığında kumarin türevleri ile inhibisyon çalışmalarına geçilmiştir.



Şekil 3.26 β-laktamaz aktivitesi ve aktivite üzerine %1 konsantrasyonda DMSO'nun etkisi

100 µM konsantrasyonda kumarin türevleri ile gerçekleştirilen inhibisyon denemeleri sonucunda elde edilen yüzde inhibisyon değerleri Tablo 3.2'de verilmiştir. 28 numaralı bileşik, 39 kumarin bileşiği içerisinde en yüksek % inhibisyon değerine sahiptir. Fakat klavulanik asit ile karşılaştırıldığında beklentilerimizi karşılamamaktadır.

Tablo 3.2 Arilkumarin türevlerinin ve klavulanik asidin β-laktamaz aktivitesi üzerindeki % inhibisyon değerleri*. *NA analiz yapılmadı. ND inhibisyon etkisi bulunmadı.

Bileşik (100 µM)	% İnhibisyon	Bileşik (100 µM)	% İnhibisyon
A1	N.D	11	N.D
A2	N.D	12	20.18±0.089
A3	14.55±0.055	13	N.A
A4	N.D	14	6.57±0.033
A5	2.81±0.024	15	8.92±0.065
A6	8.45±0.113	16	14.08±0.054
A7	15.96±0.067	17	N.D
A8	19.24±0.018	18	N.D
A10	16.90±0.038	19	N.D
A11	3.75±0.062	20	N.D
1	2.84±0.044	21	N.A
2	N.D	22	20.18±0.017
3	N.D	23	6.57±0.108
4	N.D	24	N.D
5	N.D	25	5.16±0.075
6	N.D	26	19.72±0.061
7	N.D	27	2.347±0.069
8	11.74±0.134	28	40.84±0.137
9	4.22±0.122	29	N.A
10	10.79±0.086	Klavulanik Asit	96.56± 0.571

4. SONUÇLAR

Antibiyotik direnci, toplum sağlığını tehdit eden önemli sorunlardan biri haline gelmiştir. Antibiyotiklere karşı direnç geliştiren bakterilerde çoklu ilaç direnci görölmesinin bir sonucu olarak tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Bakterilerde görölen bu direncin en yaygın sebebi ürettikleri β -laktamaz enzimleridir. Bu enzimler antibiyotik çağının başlangıcından bu yana en etkili olan β -laktam antibiyotiklerine etki ederler. β -laktam antibiyotiklerine etkinliklerini geri kazandırmak için en etkili yol dirence neden olan bu enzimleri inhibe etmektir. Çeşitli β -laktamaz enzimleri arasında çok yaygın olan KPC-2 ve AmpC enzimleri, uzun yıllardır kullanılan klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam inhibitörleri ile inhibe olmamaktadırlar.

Bu tez çalışmasında çeşitli arilkumarin türevlerinin KPC-2, AmpC ve OXA-1 β -laktamazlara karşı bağlanma afinitileri hesaplanarak, enzime ilgisi olup olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile β -laktamaz inhibitörü olan klavulanik asidin bağlanma enerjileri karşılaştırıldığında ve bağlanma doğası incelendiğinde, β -laktam antibiyotiklerini hidroliz eden aktif bölgedeki serin aminoasit kalıntısı ile etkileşen arilkumarin türevlerinin potansiyel olabileceği düşünölmüştür. Her 3 enzimde de yüksek bağlanma enerjisine sahip bileşikler *in vitro* test için belirlenmiştir.

In vitro tarama test, Sigma Aldrich Chemical Co.'dan (St., Louis. ABD) firmasından satın alınan β -laktamaz inhibitör tarama kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitin içinde bulunan β -laktamaz enziminin, Biyokimya ve Organik Kimya Laboratvarlarımızda daha önceden sentezlenmiş olan 3-arilkumarin, 4-arilkumarin, benzokumarin ve biskumarin türevleri tarafından inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Gal ve ark., (2000) tarafından incelenen γ -lakton türevlerinin ve Safdari ve ark., (2014) tarafından incelenen 7-preniloksi kumarinlerin β -Laktamaz inhibisyonları da aynı yöntemle yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen % inhibisyon değerleri beklentilerimizi karşılamamıştır. Bunun sebebinin, kitin içinde bulunan enzimin hangi sınıf β -laktamaz enzimi olduğu belirtilmediğinden dolayı kit içerisinde yer alan enzimin, hedef alınan β -laktamaz enzimlerinden olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Doking çalışmasında kullanılan β -laktamaz enzimlerinden KPC-2, AmpC enzimlerinin piyasada bulunan ve kitte pozitif test için kullanılan klavulanik asitle inhibe olmadığı bilinmektedir (Watkins

ve ark., 2013). Kitin içinde bulunan β -laktamaz enziminin klavulanik asit ile inhibe olması, bu enzimin, hedef alınan KPC-2 ve AmpC enzimlerinden biri ya da karışımı olmadığını bir kanıtı olduğu düşünülmektedir.

Docking sonucunda her üç enzim içinde yüksek afiniteye sahip olan A10 bileşiğinin, 30 ns boyunca enzim-ligand kompleksinin simülasyonu incelenmiştir. A10 bileşiğinin aktif bölgedeki konumunu koruyup korumadığını görmek için yapılan moleküler dinamik simülasyon sonucunda, KPC-2 ve AmpC enzimlerinin aktif bölgesindeki pozlarını ve konumlarını büyük oranda koruduğu RMSD ve 1, 15, ve 30 ns'lerdeki görüntülerde açıkça görülmektedir. 30 ns boyunca enzimlerin aktif bölgesinde görülen A10 bileşiğinin hidrojen bağı grafiği incelendiğinde bu süre zarfında aktif bölgede bulunan aminoasit kalıntıları ile hidrojen bağı oluşturulduğu da görülmektedir. Özellikle AmpC enzimi ile yaptığı hidrojen bağları simülasyon boyunca yoğun bir şekilde korunmaktadır. A10 bileşiğinin AmpC enzime doklanması sonucu elde edilen çok güçlü bağlanma afinitesi (-11.6 kcal/mol) de şekil 3.19'daki MD sonuçları ile örtüşmektedir. KPC-2 enzime doklandığında ise bağlanma afinitesi biraz azalmış (-11.2 kcal/mol) olup MD son 5 ns'lerinde hidrojen bağı sayısının azalmış olması ile uyumludur. Diğer yandan, OXA-1 enzimi ile yapılan MD sonucu incelendiğinde, A10 bileşiğinin simülasyon sırasında aktif bölge dışındaki bir bölgede daha çok zaman geçirdiği ve simülasyon incelendiğinde H bağı grafiğinde görülen bağı aktif bölgede bulunan lösin aminoasit kalıntısı ile yaptığı bulunmuştur. Simülasyon boyunca, aktif bölgede bulunan ve β -laktam antibiyotiklerini hidroliz eden serin aminoasit kalıntısından uzaklaştığı gözlemlenmiştir. Docking sonucunda elde edilen anlık pozun incelenmesi sonucunda, A10 bileşiğinin OXA-1'in aktif bölgesindeki aminoasitlerle etkileşerek yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğu bulunmuştu fakat KPC-2 ve AmpC ile kıyaslandığında bağlanma afinitesi daha zayıftır. Buna paralel olarak, simülasyon incelendiğinde zaman ilerledikçe bileşiğin aktif bölge dışında zaman geçirdiği ve dolayısıyla A10 bileşiğinin sınıf D OXA-1 için potansiyel olamayacağı düşünülmektedir.

Tüm bu çalışmalar sonucunda, bitişik benzen halkalı 3-aril kumarin türevi olan A10 bileşiğinin moleküler docking ve moleküler dinamik simülasyon çalışmalarından elde edilen veriler doğrultusunda KPC-2 ve AmpC için potansiyel olabileceği ve ileri düzeyde araştırma konusu olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., Lindahl, E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, 1, 19-25
- Acar, J. (1997) Broad- and narrow-spectrum antibiotics: an unhelpful Categorization, *Clinical Microbiology and Infection*, 3, 395-396
- Accelrys Software Inc., 2013. Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego
- Adcock, S. A., McCammon, J. A. (2006) Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins, *Chem Rev.*, 106, 1589-1615
- Ambler, R. P. (1980) The Structure of β -Lactamases, *Biological Sciences*, 289, 321-331
- Bektaş, A., Güdücüoğlu, H., Gürsoy, N. C., Berktaş, M., Gültepe, B. S., Parlak, M., Otlu, B., Tekerekoğlu, M. S. (2018) Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının GSBL Genlerinin Araştırılması, *Flora*, 23, 116-123
- Bonomo, R. A., Drawz, S. M. (2010) Three Decades of β -Lactamase Inhibitors, *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 160-201
- Bonnefoy, A., Dupuis-Hamelin, C., Steier, V., Delachaume, C., Seys, C., Stachyra, T., Fairley M., Guitton, M., Lampilas, M. (2004) In vitro activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non- β -lactam β -lactamase inhibitör, *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 410–417
- Bush, K. (2010) Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections, *Critical Care*, 14, 224-231
- Bush, K., Bradford, A. B. (2016) β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview, *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 6
- Bush, K., Jacoby, G. A. (2010) Updated Functional Classification of Beta-lactamases, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 54, 969–976
- Cidália Pina-Vaz, C., Ana P. Silva, A. P., Faria-Ramos, I., Teixeira-Santos, R., Moura, D., Vieira, T. V., Sousa, S. F., Costa-de-Oliveira, S., Cantón, R., Rodrigues, A. C. (2016)

- A Flow Cytometric and Computational Approaches to Carbapenems Affinity to the Different Types of Carbapenemases, *Front. Microbiol.*, 7, 1259-1265
- Codjoe, F. S., Donkor, E. S. (2018) Carbapenem Resistance: A Review, *Medical Science*, 6, 1-28
- Danis, O., Demir, S., Gunduz, C., Alparslan, M. M., Altun, S., Yuce-Dursun, B. (2016) Synthesis Of Selected 3- And 4-Arylcoumarin Derivatives And Evaluation As Potent Antioxidants, *Research On Chemical Intermediates*, 42, 6061–6077
- Drawz, S. M., Papp-Wallace, K. C., and Bonomo, R. A. (2014) New β -Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1835-1846
- Docquier, J.D., Mangani, S. (2018) An update on β -lactamase inhibitor discovery and development, *Drug Resistance Updates*, 36, 13-29
- Erzincan, P., M.T. Saçan, M. T., Yüce-Dursun, B., Daniş, Ö., Demir, S., Erdem, S. S., ve Ogan, A. (2015) QSAR models for antioxidant activity of new coumarin derivatives. SAR and QSAR in Environmental Research, 26, 721–737
- Essack, S. Y., (2001) The Development of β -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of β -Lactamases, *Pharmaceutical Research*, 18, 1391-1399
- Etebu, E., Arikekpar I. (2016), Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives, *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 4, 90-101
- Evans, B. A., Amyes, S. G. B. (2014) OXA β -Lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 241–263
- Fernandes, P., (2006) Antibacterial discovery and development—the failure of success?, *Nature Biotechnology*, 24, 1497-1503
- Fernandes, P., Martens, E. (2017) Antibiotics In Late Clinical Development, *Biochemical Pharmacology*, 133, 152-163
- Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., Andricopulo, A. D. (2015) Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies, *Molecules*, 20, 13384-13421
- Fleming, A. (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. Influenzæ*, *Br J Exp Pathol*, 10, 226-236

Frisch, M. J., Trucks, G. W., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox. (2010). Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.

Gál Z., Koncz, A., Szabó, I., Deák, E., Benkő, I., Barabás, G., Hernádi, F., Kovács, P. (2000) A Synthetic Gamma-Lactone Group With B-Lactamase Inhibitory And Sporulation Initiation Effects, *Journal Of Chemotherapy*, 12, 274-9

Gossens, H., Ferech, M., Stichele, R. V., Elseviers, M. (2005) Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study, *The Lancet*, 365, 579-587

Gülay, Z. (2001) Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Çözüm Önerileri: Beta-Laktamlara ve Karbapenemlere Direnç, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 5, 1-14

Hall, B.G., Barlow, M. (2005) "Revised Ambler Classification of β -lactamases" *J Antimicrob Chemother.* 55(6), 1050-1

Harrison, C. J., Bratcher, D. (2008) Cephalosporins: A Review, *Pediatrics in Review*, 29, 264-273

Hecker, S.J., Reddy, K.R., Totrov, M., Hirst, G.C., Lomovskaya, O., Griffith, D.C., King, P., Tsivkovski, R., Sun, D., Sabet, M., Tarazi, Z., Clifton, M.C., Atkins, K., Raymond, A., Potts, K.T., Abendroth, J., Boyer, S.H., Loutit, J.S., Morgan, E.E., Durso, S., Dudley, M.N. (2015) Discovery of a cyclic boronic acid β -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases, *J. Med. Chem.*, 58, 3682–3692

- Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD – Visual Info Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, 14, 33-38
- Jacoby, G. A. (2009) AmpC –Lactamases, *Clinical Microbiology Review*, 22, 161–182
- Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, S. (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians, *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.*, 33, 300-305
- Khan, A., Faheem, M., Danishuddin, M., Khan, A. U. (2014) Evaluation of Inhibitory Action of Novel Non β -Lactam Inhibitor against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC-2) *PLoS One*, 9, 1-7
- Ke, W., Bethel, C.R., Thomson, J.M., Bonomo, R.A., Akker, F. (2007) Crystal Structure of KPC-2: Insights into Carbapenemase Activity in Class A beta-Lactamases, *Biochemistry*, 46, 5732-40
- Kiener, P.A., Waley, S.G. (1978) Reversible inhibitors of penicillinases, *Biochem. J.*, 169, 197–204
- Kohanski, A. M., Dwyer D. J., Collins J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, *Nat Rev Microbiol.*, 8, 423–435.
- Krisztina M. P., Andrea, E., Magdalena, A. T., Robert, A. B. (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 55, 4943-4960
- Lee, C.R., Lee, J.H., Park, K.S., Kim, Y.B., Jeong, B.C., Lee, S.H. (2016) Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods, *Front Microbiol.*, 7, 1-30
- Leelananda, S. P., Lindert, S. (2016) Computational methods in drug discovery, *Beilstein J. Org. Chem.*, 12, 2694–2718
- Lemkul, J. A. (2018) From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package, v1.0, *Living J. Comp. Mol. Sci.*, 1, 1-53
- MacGowan, A., Macnaughton, E. (2017) Antibiotic Resistance, *Medicine*, 45, 622-628
- Mangoni, M., Roccatano, D., Nola, A. D. (1999) Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors in Solution by Molecular Dynamics Simulation, *Proteins*, 35, 153–162

- Mehta, S. C., Rice, K., Palzkill, T. (2015) Natural variants of the KPC-2 carbapenemase have evolved increased catalytic efficiency for ceftazidime hydrolysis at the cost of enzyme stability, *PLoS Pathog*, 1-20
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Computational Chemistry*, 16, 2785-91
- Munita, J. M., Arias, C. A. (2016), Mechanism Of Antibiotic Resistance, *Microbiology Spectrum*, 4
- Naas, T., Dorteta L., Iorga B. I. (2016) Structural and functional aspects of class A carbapenemase, *Current Drug Targets*, 17, 1006-1028
- Nathwani, D., Wood, J. M. (1993) Penicillins A Current Review of their Clinical Pharmacology and Therapeutic Use, *Drugs*, 45, 866-894
- Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria, *Lancet Infect Dis.*, 9, 228-36
- Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L. (2011) Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1791-1798
- O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M., Shingler, A. H. (1972) Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate, *Antimicrob Agents Chemother*, 1, 283-288
- Olsen, I. (2015) New promising β -lactamase inhibitors for clinical use, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, 1303-1308
- Pagadala, N. S., Syed, K., Tuszynski, J. (2017) Software for molecular docking: a review, *Biophys Rev.*, 9, 91-102
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., Bonomo, R. A. (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 55, 4943-4960
- Pina-Vaz, C., Silva, A. P., Faria-Ramos, I., Teixeira-Santos, R., Moura, D., Tatiana F. Vieira, Sérgio F. Sousa, Sofia Costa-de-Oliveira, S., Cantón, R., Rodrigues, A. G. (2016)

A Flow Cytometric and Computational Approaches to Carbapenems Affinity to the Different Types of Carbapenemases, *Front. Microbiol.*, 7, 1-6

Powers, R.A., Morandi, F., Shoichet, B.K. (2002) X-ray crystal structure of AmpC beta-lactamase from *E. coli* in complex with a DOCK-predicted non-covalent inhibitor, *Structure*, 10, 1013-23

Queenan, A. M., Bush, K. (2007) "Carbapenemases: The Versatile β -Lactamases" *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 440–458

Ruben, F., Paula, A., Cristina, P. (2013) β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance, *Medical Microbiology*, 24, 7-17

Safdari, H., Neshani, A., Sadeghian A., Ebrahimi, M., Iranshahi, M., Sadeghian, H. (2014) Potent and Selective Inhibitors of Class A β -lactamase: 7-prenyloxy coumarins, *The Journal of Antibiotics*, 67, 373–377

Schneider, K.D., Karpen, M.E., Bonomo, R.A., Leonard, D.A., Powers, R.A. (2009) The 1.4 Å crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-1 complexed with doripenem, *Biochemistry*, 48, 11840-7

Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., and Lowe, E. W. Jr., (2014) Computational Methods in Drug Discovery, *Pharmacol Rev.*, 66, 334–395

Srikrishna, D., Godugu, C., Dubey, P. K. (2018) A Review on Pharmacological Properties of Coumarins, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18, 113 - 141

Stewart, J.J.P. 2007. "Optimization of parameters for semiempirical methods. V. Modification of NDDO approximations and application to 70 elements", *Journal of Molecular Modeling*, 13, 1173-1213

Sykes, R. B., Bonner, D. P. (1985) Discovery And Development of the Monobactams, *Reviews Of Infectious Diseases*, 7, 579- 593

Tehrani, K. H. M. E. ve Martin, N. I. (2018) β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: an update, *MedChemComm*, 9, 1439-1456

Thiriou, E., Monard, G. (2009). Combining a genetic algorithm with linear scaling semiempirical method for protein-ligand docking, *J. Mol. Structure: THEOCHEM*, 898, 31-41

- Thomson, K. S., Weber, D. A., Sanders, C. C., Sanders, Jr, W. E. (1990) Beta-Lactamase Production In Members Of The Family Enterobacteriaceae And Resistance To Beta-Lactam-Enzyme İnhibitor Combinations, *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 622–627
- Toner, E., Gronvall, G. K., Cicero, A., Inglesby, T. V. (2015) Antimicrobial Resistance Is a Global Health Emergency, *Health Security*, 13, 153-155
- Topal, M., Şenel, G. U., Topal, E. I.A., Öbek, E. (2015) Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31, 121-127
- Trott, O., Olson, A.J. (2010) Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading, *J Comput Chem*, 31, 455–461
- Watkins, R. R., Papp-Wallace, K. M., Drawz, S. M., Bonomo, R. A. (2013) “Novel β -lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance”, *Frontiers İn Microbiology*, 4, 392
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., Strynadka, N. JC. (2005). B-Lactam Antibiotic Resistance: A Current Structural Perspective, *Current Opinion İn Microbiology*, 8, 525-533
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, T. K., Hossain, N. (2017) A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing, *Cureus*, 9, 1-9
- Zhao, Y., Truhlar, D. G. 2008. “Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry”, *Accounts of Chemical Research*, 41, 157-16
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. (2005) GROMACS: Fast, Flexible, and Free, *J. Comput. Chem.*, 26, 1701-1718
- Vardar, B. (2012) Bazı Kumarinlerin Sentezi ve Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- WHO, “Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014” <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (e.t. 15.03.2019)
- WHO, (2017) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> (e.t. 20.03.2019)

Moore, D. (2016) Antibiotic Classification & Mechanism, <https://www.orthobullets.com/basic-science/9059/antibiotic-classification-and-mechanism> (e.t. 24.03.2019)

WHO, (2017) Antibiotic Resistance <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/antibiotic-resistance> (e.t. 27.03.2019)

Wavefunction Inc2014. Spartan 14, Irvine, CA, USA. Available from: <http://www.wavefun.com> (e.t. 30.03.2019)

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak222bul.pdf> (e.t. 10.4.2019).



EKLER

Tablo Ek-1. Veri setindeki her bileşik için KPC-2 ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1	-8.8	-8.9	-8.8	-8.7	-8.7	-8.9	-8.5	-8.7	-8.7	-8.7
A2	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8
A3	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.9	-8.8
A4	-8.5	-8.5	-8.5	-8.2	-8.4	-8.5	-8.5	-8.5	-8.4	-8.3
A5	-8.4	-8.7	-8.7	-9.1	-8.4	-8.5	-8.3	-8.6	-8.7	-9.2
A6	-9.2	-9.3	-9.2	-9.2	-9.2	-9.1	-9.2	-9.1	-9.2	-9.2
A7	-8.6	-8.2	-8.6	-8.4	-8.6	-8.6	-8.6	-8.5	-8.6	-8.6
A8	-8.4	-8.6	-8.4	-8.5	-8.3	-8.3	-8.4	-8.6	-8.7	-8.6
A10	-11.1	-10.9	-10.3	-11.1	-11.0	-10.8	-10.5	-11.2	-11.1	-11.2
A11	-9.1	-8.9	-9.0	-9.0	-8.9	-9.0	-9.0	-9.0	-8.9	-9.0
1	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.1	-8.0	-8.0
2	-7.6	-7.8	-7.7	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.7	-7.7
3	-8.2	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.2	-8.0	-7.9	-8.2
4	-8.1	-8.1	-8.2	-8.1	-8.1	-8.1	-8.2	-8.1	-8.2	-8.2
5	-8.3	-7.6	-8.7	-	-7.6	-7.6	-7.7	-	-8.7	-
6	-8.1	-8.4	-8.4	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.4	-8.3
7	-8.3	-8.5	-8.4	-7.5	-7.8	-7.7	-8.3	-7.5	-8.1	-8.3
8	-8.0	-7.8	-7.7	-7.7	-7.5	-7.7	-7.7	-7.7	-8.0	-7.9
9	-7.9	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-7.9	-8.0	-7.9	-8.0	-8.0
10	-9.1	-8.9	-9.0	-9.0	-8.9	-9.0	-9.0	-9.0	-8.9	-9.0
11	-7.9	-7.9	-7.9	-7.7	-7.8	-7.8	-	-7.8	-7.8	-7.8
12	-9.1	-9.1	-9.1	-9.0	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1
13	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.0	-9.1	-9.0	-9.1	-9.1	-9.0
14	-8.8	-8.8	-8.8	-8.6	-8.8	-8.6	-8.7	-8.7	-8.8	-8.8
15	-7.8	-7.5	-7.8	-7.7	-7.5	-7.8	-7.8	-7.5	-7.7	-7.8
16	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.0	-9.0	-9.1	-9.1	-9.0	-9.1
17	-6.3	-6.3	-6.3	-6.6	-	-6.6	-6.6	-6.3	-6.4	-6.6
18	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2
19	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.3	-7.3	-7.2	-7.3	-7.3	-7.2
20	-6.5	-6.6	-6.6	-6.5	-6.5	-6.7	-6.8	-6.6	-6.5	-6.5
21	-8.3	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6	-8.2	-8.6	-8.2
22	-7.8	-7.8	-7.8	-7.7	-7.8	-7.8	-7.7	-7.8	-7.6	-7.8
23	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5	-9.5
24	-7.9	-7.9	-8.0	-7.9	-7.9	-8.0	-8.0	-7.9	-7.9	-8.0
25	-8.0	-8.0	-8.1	-8.0	-8.1	-8.0	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1
26	-7.9	-7.8	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.8	-7.9	-7.9	-7.9
27	-7.8	-7.6	-7.8	-7.7	-7.8	-7.9	-7.9	-7.9	-7.8	-7.7
28	-7.9	-7.9	-7.8	-7.6	-7.9	-7.8	-7.9	-7.8	-7.7	-7.7
29	-9.6	-9.6	-9.6	-9.6	-9.7	-9.6	-9.2	-9.6	-9.6	-9.6

Tablo Ek-2. Veri setindeki her bileşik için AmpC ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1	-9.2	-10.1	-10.0	-9.2	-10.0	-9.5	-9.1	-9.7	-9.6	-9.8
A2	-9.0	-9.6	-9.9	-9.9	-9.8	-9.9	-9.0	-8.9	-9.1	-9.7
A3	-9.6	-10.0	-9.7	-10.0	-9.8	-9.8	-9.8	-9.9	-9.6	-9.9
A4	-11.4	-11.7	-11.3	-11.5	-11.4	-11.4	-10.0	-10.6	-11.7	-10.3
A5	-9.4	-9.9	-10.0	-10.1	-9.9	-10.0	-10.0	-9.9	-10.1	-9.8
A6	-10.0	-10.1	-10.1	-10.0	-10.1	-9.9	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0
A7	-9.3	-9.2	-9.1	-9.2	-9.9	-9.8	-9.9	-9.3	-10.0	-9.5
A8	-10.4	-10.3	-8.7	-10.6	-9.4	-10.1	-10.5	-10.4	-10.4	-10.5
A10	-11.7	-11.6	-11.7	-11.7	-11.7	-11.7	-11.7	-11.7	-11.8	-11.8
A11	-11.2	-11.1	-10.7	-10.9	-11.3	-11.2	-11.2	-11.6	-10.7	-10.9
1	-7.9	-7.6	-7.6	-7.6	-8.2	-8.2	-7.9	-8.2	-7.6	-7.9
2	-8.7	-8.6	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7
3	-9.4	-8.2	-9.2	-8.4	-9.5	-9.5	-9.3	-9.5	-	-8.0
4	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2
5	-9.3	-8.6	-9.3	-9.3	-	-8.1	-7.7	-9.0	-9.0	-9.0
6	-8.1	-8.1	-8.1	-8.0	-8.1	-8.0	-8.1	-8.7	-8.1	-8.1
7	-7.5	-7.5	-8.1	-7.5	-7.5	-7.5	-7.5	-8.2	-8.2	-7.5
8	-8.4	-8.4	-8.4	-7.3	-8.5	-8.4	-8.4	-7.3	-8.4	-8.2
9	-9.1	-7.9	-9.1	-9.1	-9.0	-9.0	-8.5	-9.1	-9.0	-8.5
10	-7.9	-7.9	-8.0	-8.5	-8.6	-8.5	-7.9	-8.1	-7.9	-7.9
11	-8.8	-7.5	-8.8	-8.8	-7.5	-8.7	-8.7	-8.8	-8.7	-8.7
12	-8.0	-7.9	-8.4	-7.9	-8.0	-8.0	-8.0	-8.4	-7.9	-8.3
13	-8.0	-8.2	-8.1	-8.1	-8.6	-8.5	-8.1	-8.7	-8.6	-8.6
14	-7.9	-7.8	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9	-7.9
15	-8.1	-8.2	-8.2	-8.2	-7.6	-8.2	-8.2	-7.5	-8.2	-8.2
16	-8.2	-8.3	-8.3	-8.2	-8.1	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2	-8.2
17	-6.3	-6.3	-6.3	-6.4	-6.2	-6.2	-6.3	-6.2	-6.4	-6.3
18	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.5	-7.5	-7.6
19	-7.0	-6.9	-7.0	-7.0	-7.0	-7.0	-7.0	-7.0	-7.0	-7.0
20	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.5	-6.4	-6.4
21	-8.3	-8.1	-8.3	-8.3	-8.3	-8.3	-8.1	-8.3	-8.1	-8.3
22	-7.8	-7.9	-7.8	-7.8	-7.9	-7.6	-7.6	-7.6	-7.6	-7.9
23	-8.5	-8.0	-8.5	-9.0	-8.5	-8.9	-8.5	-8.5	-8.3	-8.6
24	-8.0	-8.0	-7.6	-8.1	-8.0	-8.0	-8.1	-7.9	-8.0	-8.0
25	-8.1	-8.0	-8.1	-7.8	-8.3	-8.1	-8.1	-7.7	-8.1	-8.0
26	-8.5	-8.8	-8.5	-7.7	-9.0	-9.0	-8.0	-8.8	-9.2	-8.4
27	-8.0	-7.9	-8.0	-7.9	-7.9	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-7.9
28	-8.4	-8.5	-7.5	-8.0	-8.6	-7.5	-8.1	-7.9	-8.5	-7.5
29	-9.0	-9.1	-9.1	-9.1	-9.3	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.0

Tablo Ek-3. Veri setindeki her bileşik için OXA-1 ile 10 defa tekrarlanan flex doking hesaplamaları sonucunda enzimin aktif bölgesine en bağlanan konformasyonların bağlanma enerjisi (ΔG ; kcal/mol) değerleri

Deneme Sayısı Bileşik No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1	-9.0	-9.0	-8.9	-8.9	-8.9	-8.8	-8.9	-8.9	-9.1	-8.9
A2	-8.6	-8.6	-8.8	-8.6	-8.6	-8.8	-8.6	-8.6	-8.6	-8.6
A3	-8.6	8.6	-8.7	-8.7	-8.4	-8.7	-8.7	-8.6	-8.5	-8.7
A4	-9.1	-9.1	-9.0	-9.8	-9.1	-9.0	-9.1	-9.0	-9.0	-9.0
A5	-10.0	-10.0	-10.0	-9.9	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0	-10.0
A6	-10.2	-10.2	-10.1	-10.1	-10.1	-10.2	-10.2	-10.1	-10.2	-10.1
A7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.7	-8.8	-8.7
A8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8	-8.8
A10	-11.1	-11.1	-11.1	-11.1	-11.1	-11.1	-11.1	-11.1	-11.1	-11.0
A11	-10.2	-10.3	-10.0	-10.2	-10.1	-10.3	-10.2	-10.4	-10.2	-10.3
1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.0	-8.0	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1
2	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.2	-8.0	-8.0	-8.0	-8.2	-8.0
3	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.9	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8
4	-8.4	-8.2	-8.6	-8.4	-8.4	-8.2	-8.2	-8.4	-8.4	-8.5
5	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8	-7.7	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8
6	-8.4	-8.3	-8.3	-8.3	-8.1	-8.3	-8.3	-8.3	-8.4	-8.3
7	-7.6	-7.3	-7.6	-7.7	-7.7	-7.6	-7.6	-7.7	-7.7	-7.6
8	-7.3	-7.3	-7.4	-7.4	-7.5	-7.5	-7.4	-7.5	-7.3	-7.6
9	-8.4	-8.4	-8.4	-8.4	-8.4	-8.4	-8.4	-8.5	-8.4	-8.4
10	-8.0	-8.0	-7.9	-7.8	-8.0	-8.0	-7.9	-7.9	-8.0	-7.9
11	-8.5	-8.3	-8.5	-8.1	-8.5	-8.4	-8.5	-8.5	-8.4	-8.5
12	-8.4	-8.5	-8.4	-8.5	-8.5	-8.5	-8.4	-8.4	-8.5	-8.5
13	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1
14	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1
15	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0
16	-9.8	-9.2	-9.7	-9.5	-9.5	-9.9	-9.8	-9.8	-9.8	-9.9
17	-5.9	-5.9	-5.9	-5.9	-5.9	-5.9	-5.9	-5.9	-5.9	-5.9
18	-7.1	-7.1	-7.2	-7.1	-7.1	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2	-7.2
19	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4	-6.4
20	-6.0	-6.0	-6.0	-6.0	-6.0	-6.0	-6.0	-6.0	-6.0	-6.0
21	-8.1	-8.1	-8.1	-7.8	-7.8	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1	-8.1
22	-8.0	-7.8	-7.6	-7.8	-7.6	-7.8	-7.8	-7.6	-8.0	-7.8
23	-7.8	-7.8	-7.8	-7.9	-7.8	-7.7	-7.8	-7.8	-7.8	-7.8
24	-7.6	-7.5	-7.6	-7.6	-7.5	-7.6	-7.6	-7.6	-7.5	-7.6
25	-7.8	-7.8	-7.7	-7.7	-7.8	-7.7	-7.7	-7.8	-7.7	-7.7
26	-8.4	-8.2	-8.1	-8.3	-8.3	-8.8	-8.0	-8.6	-8.3	-8.3
27	-8.1	-8.1	-8.2	-8.2	-8.3	-8.0	-8.1	-8.3	-8.0	-8.1
28	-8.1	-8.0	-7.9	-7.9	-8.0	-8.1	-8.0	-7.9	-8.0	-8.0
29	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1	-9.1

ÖZGEÇMİŞ

Ad.Soyad : Beyza HAMUR
Doğum tarihi : 05.10.1992
E-posta : beyzahamur@gmail.com

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans Marmara Üniversitesi – Organik kimya programı (2017-2019)

Lisans Marmara Üniversitesi – Kimya Bölümü (2011-2016)

Lise Orhangazi Lisesi

Sözlü Bildiri ve Poster Bildiri:

H.Beyza, S.S.Erdem, D.Özkan, Potansiyel Karbapenemaz İnhibitörü Arilkumarin Türevleri İle Moleküler Doking Hesapları, 3. Hesaplamalı Kimya Kongresi 12-14 Ekim 2017, Ankara (Poster)

S.S.Erdem, H.Beyza, D.Özkan, Molecular Docking Of Arylcoumarins To Carbapenemase Enzyme, Internatinal Symposium On Chemistry Via Computation Applications On Molecular Nanoscience 30 October 2017, İstanbul (Poster)

