



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***BABESIA BIGEMINA* LAKTAT DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE ENZİMİN
HESAPLAMALI YAPISAL BİYOLOJİ
YAKLAŞIMIYLA İNCELENMESİ**

SAFİYE MERVE BOSTANCIOĞLU

DOKTORA TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Özal Mutlu

İSTANBUL, 2025



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
BABESIA BIGEMINA LACTATE
DEHYDROGENASE ENZYME AND
INVESTIGATION OF THE ENZYME BY
COMPUTATIONAL STRUCTURAL BIOLOGY
APPROACH**

SAFİYE MERVE BOSTANCIOĞLU

720117005

PhD Thesis
Department of Biology
Biology Program

Supervisor
Doç. Dr. Özal Mutlu

İSTANBUL, 2025

TEŞEKKÜR

Bütün doktora tez çalışmalarım boyunca, bana yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Özal MUTLU'ya,

Rekombinant DNA deney çalışmalarımda bana gerekli laboratuvar imkânlarını sağlayan Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK'a,

Rekombinant DNA ve protein ekspresyonu çalışmaları süresince bana her zaman yardımcı olan Dr. Erennur UĞUREL'e ve Maria ORLENCO'ya,

Enzim biyokimya deneylerim için gereken imkânları sunan, çalışmam boyunca yanımda olan ve görüşlerini sunan Prof. Dr. Özkan DANIŞ'a ve Dr. Öğr. Üyesi Sinem KOÇER'e,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için gereken maddi desteği sunan Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BAPKO) (Proje No: FDK-2022-10061),

Tez çalışmalarım ve tez yazım süreci boyunca sürekli yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli eşim Faruk BOSTANCIOĞLU'na ve aileme,

Annelerine her zaman anlayışlı ve yardımcı olan meleklerim Mina ve Azra'ya,

Son olarak hep öğretmen olmamı hayal eden merhum dedem Zeynel ATEŞ'e,

Minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

OCAK, 2025

Safiye Merve BOSTANCIOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER.....	xvi
TABLolar.....	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Apikompleksanlar	1
1.2. Piroplasmidalar	2
1.3. Babesialar ve Hayvanlarda Babesiosis	3
1.4. Babesiaların Eritrositlerdeki Yaşam Döngüsü	4
1.5. Parazitin Coğrafi Bölge Yayılımı ve Türkiye’deki durumu	7
1.6. İlaç Hedefi olarak Laktat Dehidrogenaz	8
2. ARAÇLAR ve YÖNTEMLER.....	16
2.1. In silico Araçlar ve Yöntemler.....	16
2.1.1. Dizi Analizi	16
2.1.2. Homoloji Modelleme ve Model Validasyonları.....	17
2.1.3. Moleküler Dinamik Simülasyonu (MDS)	18
2.1.4. Moleküler Dinamik Simülasyon Sonrası İlaçlanabilir Bölge Tayini	18
2.1.5. Zenginleştirme Hesaplamaları (Enrichment Calculations)	19
2.1.6. Kontrol Moleküler Yanaştırma İşlemi.....	19
2.1.7. BbigLDH ile Bilinen İnhibitörlerin Moleküler Yanaştırma İşlemi ve Orjinal Kristal Yapılarıyla Karşılaştırılması	20
2.1.8. Ligand Kütüphanelerinin Hazırlanması.....	21
2.1.9. Yapı-Temelli Sanal Tarama (Structure Based Virtual Screening-SBVS) ve ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve boşaltım) Analizi	22
2.1.10. Kuantum Mekanik Polarize Ligand Yanaştırması (QM-Polarized Ligand Docking)	23

2.1.11.	İndüklenmiş Uyum Yanaştırması (Induced Fit Docking (IFD)) ve Konak LDH'leri ile Moleküler Yanaştırması	24
2.1.12.	Moleküler Dinamik Simülasyonları ve Bağlanma Serbest Enerjisi Hesaplamaları (MM/GBSA)	24
2.2.	In vitro Yöntemler için Cihazlar, Kimyasallar & Çözeltiler	27
2.2.1.	Cihazlar	27
2.2.2.	Kitler	27
2.2.3.	Kimyasallar	28
2.2.4.	Hazırlanan çözeltiler	29
2.3.	In vitro Yöntemler	36
2.3.1.	BbigLDH Geninin <i>E. coli</i> (BL21 (DE3))'ye Ligasyon Bağımsız Klonlama (LIC) Yöntemiyle Klonlanması.....	36
2.3.2.	Rekombinant Protein Ekspresyonu	44
2.3.3.	Protein Konsantrasyon Tayini, Aktivite ve Kinetik Analizleri	47
3.	SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	51
3.1.	Dizi analizi	51
3.2.	Homoloji Modelleme ve Yapı Validasyonları.....	59
3.3.	Minimize edilen modeller ve validasyonları	64
3.4.	NAMD ile moleküler dinamik simülasyonu	67
3.5.	DoGSiteScorer ile İlaç Hedeflenebilir Bölgelerin Tespiti.....	69
3.6.	X-ray Kristalogrofisi ile Yapısı Bilinen Apikompleksan LDH Protein Yapıları ve İnhibitörleri.....	74
3.7.	Zenginleştirme Hesaplamaları (Enrichment Calculations)	75
3.8.	Kontrol Moleküler Yanaştırma Yöntemi.....	77
3.9.	BbigLDH ile Bilinen İnhibitörlerin Moleküler Yanaştırma İşlemi ve Orjinal Kristal Yapılarıyla Karşılaştırılması	79
3.10.	Yüksek Verimli Sanal Tarama (HTVS)	81
3.11.	QM-Polarize Ligand Yanaştırma Yöntemi.....	83
3.12.	İndüklenmiş Uyum Yanaştırması (IFD) ve Konak LDH'leri ile Moleküler Yanaştırma	85
3.13.	Moleküler dinamik simülasyonları ve bağlanma enerjisi hesaplamalarına dayalı olarak ligandların belirlenmesi	88

3.14. PZR Yöntemi ile BbigLDH Geninin Amplifikasyonu ve Gen Konsantrasyon Tayini	96
3.15. pLATE31 Vektörünün <i>E. coli</i> Hücrelerine (BL21 (DE3)) Transformasyonu ve Koloni PZR ile BbigLDH gen amplifikasyonu	97
3.16. Sekanslama İşlemi	98
3.17. Protein Ekspresyonu ve Saflaştırılması	98
3.18. Aktivite ve Kinetik Analizi.....	102
3.19. BbigLDH Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	105
3.20. BbigLDH Enziminin Termostabilitesinin Belirlenmesi	106
3.21. BbigLDH Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi	108
4. SONUÇLAR VE GELECEĞE BAKIŞ	113
KAYNAKLAR.....	115
EKLER	124

ÖZET

***BABESIA BIGEMINA* LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ENZİMİN HESAPLAMALI YAPISAL BİYOLOJİ YAKLAŞIMIYLA İNCELENMESİ**

Babesia bigemina, kene vektörleri aracılığıyla sığır eritrositlerine yerleşerek gelişen anaerob obligat ve tek hücreli bir apikompleksan parazittir. “Teksas ateşi” olarak bilinen hastalığa neden olmaktadır. Günümüzde tedavi amaçlı birçok anti-babesiyal ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlara karşı direnç oluşturan bazı parazitlerin görüldüğü ve ilaçların kullanıldığı hayvanlarda ilaç kalıntılarının et ve süt ürünlerinde kalabildiği raporlanmıştır. Bu nedenle yeni hedeflerin araştırılması ve bu hedeflere özgü inhibitörlerin belirlenmesi önem arz etmektedir. Uygun hedeflerden biri de anaerobik glikolizin düzenlenmesinde kritik rol oynayan laktat dehidrogenaz (LDH) enzimidir. Apikompleksan LDH’leri genellikle aktif bölgede beş amino asitlik bir insersiyon sergilemektedir ve bu özellikleri, onları konağın LDH'sinden ayırmaktadır. Bu yapısal farklılık, apikompleksan LDH'yi terapötik müdahale için potansiyel olarak seçici bir ilaç hedefi haline getirmektedir.

Tez çalışmasında bu yüzden ilaç hedefi olarak *B. bigemina* laktat dehidrogenaz (BbigLDH) enzimi belirlenmiştir. Çalışma iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda gerçekleştirilen *in silico* çalışmalar sonucunda, konak LDH’si ile düşük afinite gösteren ancak BbigLDH’si ile yüksek afinite gösteren bileşikler belirlenmiştir. Ardından GROMACS (100 ns) ve Desmond (20 ns) ile moleküler dinamik simülasyon (MDS) analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca daha uzun MDS sürelerinde (300 ns ve 1000 ns) bağlanmalarını koruyabilen bileşikler belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise, öncelikle *E. coli* BL21 (DE3)’e BbigLDH geni içeren plazmid vektörün transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant *E. coli* aracılığıyla His-etiketli BbigLDH proteini ekspresyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra enzim aktivite ve kinetik analizleri yapılmıştır.

Gerçekleştirilen *in silico* çalışmaların sonucunda BbigLDH'nin de beş amino asitlik insersiyona sahip olduğunu, karşıt döngüde (opposing loop) *Plasmodium* aksine antik LDH yapısındaki gibi delesyonun olmadığını, bu durumların ilaç çalışmalarında dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca yapılan yanaştırma ve MDS analizleri sonucunda C9 (Z2373310039), C16 (Z2201943136), C18 (Z2063989764) bileşiklerinin BbigLDH için uygun inhibitör adaylarının olabileceği anlaşılmıştır. Öte yandan *in vitro* çalışmalarda ise, enzimin optimum ekspresyon koşullarının belirlenmesi için yapılan analiz sonucunda, 37°C'de 1 mM IPTG ile bir gece (ON) indüklemenin en uygun koşullar olduğu belirlenmiştir. Enzim HisTALON afinite kromatografisi ile yüksek oranda saflaştırılmıştır. Kinetik analizleri sonucunda yarı-maksimum hızda görülen görünür substrat konsantrasyonu ($S_{0.5}$) için NADH 0.3094 mM olarak belirlenip, pirüvat için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ise 0.2585 mM olarak bulunmuştur. Maksimum hızlar (V_{max}), sırasıyla NADH için 59.2 U mg^{-1} protein min^{-1} ve pirüvat için 23.97 U mg^{-1} protein min^{-1} olarak ölçülmüştür. Ayrıca stabilite testleri sonucunda en iyi şartın +4 °C'de katkısız olarak 9. güne kadar saklanması uygun görülmüştür. Enzim 30°C ve 40°C'lerde aktivitesini koruyabilirken daha yüksek sıcaklıklarda koruyamamaktadır. Optimum pH değeri ise 8.5 olarak bulunmuştur.

Çalışma hedefli ilaç üretimi için temel bir çalışma olup BbigLDH enzimini inhibe edebilecek potansiyel adayların belirlenmesine temel sağlamaktadır. Bu çalışmanın, günümüzde bilinen anti-babesiyal ilaçlara ek olarak alternatif ilaçların geliştirilmesinde öncülük edebileceği ve yalnızca parazite etki eden ancak konağa zarar vermeyen hedefli ilaçların üretilmesine aracılık edebileceği ön görülmektedir. Bu gibi çalışmaların yapılması diğer apikompleksan türü parazitlere yönelik hedefli ilaç geliştirilmesinde önemli bir örnek teşkil etmesi beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Babesia bigemina*, Laktat dehidrogenaz, babesiosis, yapı-temelli ilaç keşfi, hesaplamalı yapısal biyoloji.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BABESIA BIGEMINA* LACTATE DEHYDROGENASE ENZYME AND INVESTIGATION OF THE ENZYME BY COMPUTATIONAL STRUCTURAL BIOLOGY APPROACH

Babesia bigemina is an anaerobic obligate and unicellular apicomplexan parasite that develops by settling in the erythrocytes of cattle through tick vectors. It causes the disease known as "Texas fever." Today, many anti-babesial drugs are used for treatment. However, it has been reported that some parasites resistant to these drugs have been observed and that drug residues may remain in meat and dairy products of treated animals. Therefore, investigating new targets and identifying inhibitors specific to these targets is of great importance. One suitable target is the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), which plays a critical role in the regulation of anaerobic glycolysis. Apicomplexan LDHs typically exhibit a five-amino-acid insertion in the active site, which distinguishes them from the host LDH. This structural difference makes apicomplexan LDH a potentially selective drug target for therapeutic intervention.

In this thesis study, the *B. bigemina* lactate dehydrogenase (BbigLDH) enzyme was identified as a drug target. The study consists of two parts. In the first part, *in silico* studies were conducted to identify compounds that show low affinity for the host LDH but high affinity for BbigLDH. Subsequently, molecular dynamics simulation (MDS) analyses were performed using GROMACS (100 ns) and Desmond (20 ns). Additionally, compounds that maintained their binding over longer MDS durations (300 ns and 1000 ns) were identified. In the second part of the study, the transformation of a plasmid vector containing the BbigLDH gene into *E. coli* BL21 (DE3) was performed. Using the obtained recombinant *E. coli*, the expression and purification of His-tagged BbigLDH protein were carried out. Then, enzyme activity and kinetic analyses were performed.

As a result of the *in silico* studies, it was determined that BbigLDH possesses the five-amino-acid insertion and, unlike *Plasmodium*, does not exhibit a deletion in the opposing loop, similar to the ancient LDH structure. These factors should be considered in drug development studies. Moreover, docking and MDS analyses revealed that compounds C9 (Z2373310039), C16 (Z2201943136), and C18 (Z2063989764) could be suitable inhibitor candidates for BbigLDH. *In vitro* studies determined that the optimal expression conditions for the enzyme were induction with 1 mM IPTG overnight (ON) at 37°C. The enzyme was highly purified using HisTALON affinity chromatography. Kinetic analyses showed that the apparent substrate concentration ($S_{0.5}$) at half-maximal velocity for NADH was 0.3094 mM, and the Michaelis-Menten constant (K_m) for pyruvate was found to be 0.2585 mM. The maximum velocities (V_{max}) were measured as 59.2 U mg⁻¹ protein min⁻¹ for NADH and 23.97 U mg⁻¹ protein min⁻¹ for pyruvate. Additionally, stability tests indicated that the best storage condition was at +4°C without additives for up to 9 days. The enzyme retained activity at 30°C and 40°C but could not maintain stability at higher temperatures. The optimum pH was determined to be 8.5.

This study serves as a fundamental work for targeted drug production, providing a basis for identifying potential candidates that can inhibit the BbigLDH enzyme. It is anticipated that this study could lead to the development of alternative drugs in addition to currently known anti-babesial drugs and facilitate the production of targeted drugs that specifically affect the parasite without harming the host. Conducting such studies is expected to set an important precedent for the development of targeted drugs against other apicomplexan parasites.

Key words: *Babesia bigemina*, Lactate dehydrogenase, babesiosis, structure-based drug discovery, computational structural biology.

YENİLİK BEYANI

Babesia bigemina, apikompleksan anaerobik ve obligat bir parazit olup dişi kenelerin sığırları ısırması sonucu yumurtaları ya da vücut salgıları aracılığıyla konağın eritrositlerine yerleşmektedirler. İlerleyen fazda eritrositleri parçalarlar ve konağın ölümüne dahi yol açmaktadırlar. Yaygın olarak Teksas ateşine sebep olduğu bilinmektedir ve neden olduğu kayıplardan dolayı ekonomiye büyük zararlar vermektedir. Günümüzde her ne kadar tedavi amaçlı anti-babesiyal olarak kullanılan ilaçlar mevcut olsa da bu ilaçlara karşı parazitin direnç geliştirdiği rapor edilmiştir. Bu nedenle yeni ilaç hedeflerinin tespiti yapılması ve bu hedeflere yönelik yeni inhibitörlerin bulunması gerekmektedir.

Tez çalışmasında, *B. bigemina* parazitinin enerji döngüsü için gerekli olan ve glikoliz aşamasında pirüvatın laktata çevrilmesinde görev alan *B. bigemina* Laktat dehidrogenaz (BbigLDH) enzimini hedeflenmiştir. Proteinin yapısı bilinmediğinden, homoloji modellenmesi ilk defa bu çalışmayla yapılmıştır. Bu çalışmayla, BbigLDH proteinin substrat spesifik döngü (substrate specific loop) ve karşıt döngü (opposing loop) gibi enzim için karakteristik olan bölgelerinin araştırılmış olması günümüz literatürüne önemli katkılar sağlamaktadır. Bunlara ek olarak, yapı-temelli sanal tarama yöntemi ile BbigLDH için daha önce bilinmeyen inhibitör adayları tespit edilmiştir. Hesaplamalı çalışmalarımız belirlenen inhibitörlerin, konağın homolog enzimleri ile düşük afinite gösterdiğini belirlemiştir. Bu sayede yalnızca parazit LDH'si inhibe edilerek hedefe yönelik spesifik inhibitörlerin tespiti gerçekleştirilmiştir. Devamında ise, moleküler dinamik simülasyon (MDS) çalışmaları ile tespit edilen inhibitörlerin stabilitesi test edilmiş ve son nokta bağlanma serbest enerjileri (MM/GBSA) hesaplanmıştır.

Çalışmanın bir diğer adımı olan *in vitro* çalışmalarla, BbigLDH'sine yönelik genetik klonlama çalışması yapılmıştır. *B. bigemina*'ya ait LDH ilk defa bu çalışmayla laboratuvar koşullarında rekombinant olarak sentezlenmiş olup ardından da yüksek düzeyde saflaştırılarak aktif bir halde elde edilmiştir. Ayrıca, enzim kinetiği ve aktivitesi de ilk defa bu tez çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra, optimum pH, uygun saklama koşulları ve termostabilite analizleri de gerçekleştirilmiştir. Bu tez

alışmalarıyla, BbigLDH'sinin biyokimyasal ve biyofiziksel yapısının anlaşılmasına yönelik önemli veriler elde edilmiştir.



SEMBOLLER

α	: Alfa
β	: Beta
λ	: Dalgaboyu
Δ	: Delta
ϕ	: Fi
γ	: Gama
μ	: Mikro
ε	: Molar tükenim katsayısı
π	: Pi
ψ	: Psi
ΔH	: Entalpi
μ	: Mikro
$^{\circ}\text{C}$	: Derece santigrat
$\text{\AA}$	: Angström

KISALTMALAR

%İOA	: Yüzde insan oral emilimi (HOA (%), Percent Humal Oral Absorption)
[S]	: Substrat derişimi
ADME	: Emilim, dağılım, metabolizma ve atılım
Accept HA	: Hidrojen bağ alıcı sayısı
APS	: Amonyum persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
AUAC	: Eğri altındaki alan
<i>B. bigemina</i>	: <i>Babesia bigemina</i>
<i>B. taurus</i>	: <i>Bos taurus</i>
BB	: Kan-beyin bariyeri (brain barrier)
BEDROC	: Erken tanıma metriği
BSA	: Sığır serum albümini
<i>C. parvum</i>	: <i>Cryptosporidium parvum</i>
C	: Sitozin
CADD	: Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (Computer-aided Drug Design)
CDD	: Korunmuş domain veritabanı (Conserved Domains Database)
CHES	: N-Sikloheksil-2-aminoetansülfonik asit
CPU	: Merkezi işlem birimi
Da	: Dalton
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitozin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
Donör HB	: Hidrojen bağ donör sayısı
DOPE	: Ayrık optimize edilmiş protein enerjisi
DTT	: Ditiotreitol
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat

E_	: Enerji
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
F	: Forward primer
FF	: Kuvvet alanı (forcefield)
G	: Guanin
GROMACS	: GROningen MACHine for Chemical Simulations
GScore	: Glide skoru
H	: Hidrojen
HTVS	: Yüksek verimli sanal tarama
IC₅₀	: Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyonu
IFD	: İndüklenmiş uyum yanaştırması (Induced Fit Docking)
IMAC	: İmmobilize metal afinitesi kromatografisi
IPTG	: İzopropil- β -D-tiogalaktopiranozit
K	: Kelvin
kDa	: Kilodalton
KEGG	: Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Luria Bertani
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LIC	: Ligaz bağımsız klonlama (Ligase Independent Cloning)
M	: Molar
MDS	: Moleküler dinamik simülasyonu
MEME suit	: Multiple Expectation-Maximization for Motif Elicitation Suite
MES	: 2-(N-Morfolino)etanesülfonik asit
mM	: Milimolar
MM/GBSA	: Moleküler mekanik/genelleştirilmiş Born yüzey alanı
MTK	: Martyna-Tobias-Klein barostat
MW	: Moleküler ağırlık
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrit
NAMD	: Nanoölçekli moleküler dinamik (Nanoscale Molecular Dynamics)

NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
Nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
OD	: Optik yoğunluk
ON	: Over night (bir gece)
<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
P_Caco	: Öngörülen Caco-2 hücre geçirgenliği
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
PCR/PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDB	: Protein Veri Bankası
pH	: Asidite/bazlık ölçüsü
PLog P_o/w	: Öngörülen oktanol/su dağılım katsayısı
PlogBB	: Öngörülen kan/beyin bariyer katsayısı
PlogKhsa	: Tahmini insan serum albüminine bağlanma kapasitesi
PLogS	: Öngörülen suda çözünürlük değeri
PlohHERG	: HERG K ⁺ kanallarının tıkanması için öngörülen IC ₅₀ değeri
PSA	: polar yüzey alanı
QPLD	: Kuantum mekanik polarize ligand yanaştırma
<i>R. annulatus</i>	: <i>Rhipicephalus annulatus</i>
R	: Reverse primer
RIE	: Rölatif etkileşim enerjisi
RMSD	: Kök ortalama kare sapması (Root mean square deviation)
RMSF	: Kök ortalama kare dalgalanma (Root mean square fluctuation)
RNA	: Ribonükleik asit
ROC	: Alıcı işletim karakteristiği
S_{0.5}	: Substrat yarı maksimum doygunluk değeri
SBVS	: Yapıya dayalı sanal tarama
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SOC	: Süper optimal sıvı ortam (Super Optimal Broth)
SP	: Standart hassasiyet
<i>T. annulata</i>	: <i>Theileria annulata</i>
<i>T. gondii</i>	: <i>Toxoplasma gondii</i>

TAE	: Tris-asetat-EDTA tamponu
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
T_m	: Erime sıcaklığı
U mg⁻¹	: Enzim aktivitesi (birim/miligram)
UV	: Ultraviyole
V_{max}	: Maksimum reaksiyon hızı
VMD	: Görsel moleküler dinamik (Visual Molecular Dynamics)
VSW	: Sanal tarama iş akışı
XP	: Ekstra hassasiyet



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Babesia</i> yaşam döngüsü.	5
Şekil 1.2. Piroplasmidaların karakteristik özellikleri	6
Şekil 1.3. Bovine babesiosis vektörlerinin coğrafi yayılımı.....	7
Şekil 1.4. Türkiye'nin yedi coğrafi bölgesinde bovine <i>Babesia</i> türlerinin yaygın olarak görülme oranları.	8
Şekil 1.5. Anaerobik glikolizide LDH enzimi ile NAD ⁺ yeniden dönüşümü.	9
Şekil 1.6. <i>P. falciparum</i> LDH döngüsünün kapanması ve kataliz mekanizması.....	10
Şekil 1.7. BbigLDH enziminin (1.1.1.27) KEGG veribankasında bulunan glikoliziz yolağındaki konumu.	11
Şekil 2.1. Hit moleküllerin tespit edilmesi için kullanılan iş akışı.....	22
Şekil 2.2. Moleküler dinamik simülasyonları ve bağlanma serbest enerji hesaplamaları için iş akışı.	25
Şekil 2.3. pLATE31 vektörüne özgü yapışkan uçların detaylarına ait manuel de belirtilen gösterimler.	37
Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu aşamalarına ait şema akışı.	38
Şekil 2.5. Agaroz Jel Elektrofrezinde kullanılan Generuler.....	39
Şekil 2.6. SDS-PAGE için kullanılan protein marker için farklı kDa protein bantlaşmaları.	45
Şekil 2.7. (A) HisTALON Gravite Kromatografi kolonundaki TALON reçinesi detaylı gösterimi.	47
Şekil 2.8. Substrat derişimine karşı başlangıç hızının değışimi.	48
Şekil 3.1. Çoklu dizi hizalama sonucu	53
Şekil 3.2. (A) ESPript 3 ile renklendirilmiş ClustalW dizi hizalama sonuçları	56
Şekil 3.3. MEME suite motif analiz sonuçları.	57
Şekil 3.4. PSIPRED sunucusu ile elde edilen protein ikincilyapı analiz sonuçları.....	58
Şekil 3.5. Mega11 ile oluşturulan filogenetik ağacın gösterimi.	59
Şekil 3.6. Homolojiye dayalı protein modellemesi için gerekli olan ve PDB de bulunan X-ray kristolografı çalışması ile yapısı belirlenmiş olan kalıp (template) LDH proteinleri	60

Şekil 3.7. MODELLER 9.23 programı kullanılarak modellenen BbigLDH açık konformasyonuna (yeşil) ve kapalı konformasyonuna (mavi) ait superimpoz görüntüleri	61
Şekil 3.8. Monomer BbigLDH modellerinin, (A) Açık minimize (yeşil renkli) ve (B) Kapalı minimize (mavi renkli) yapılarının görüntüleri.	65
Şekil 3.9. MDS sonucu protein zincir yapısına ait RMSD/çerçeve grafiği.....	67
Şekil 3.10. MDS sonrası açık ve kapalı BbigLDH yapıları için RMSF (Å) / rezidü grafikleri	68
Şekil 3.11. BbigLDH açık modelinin üç boyutlu yapısı üzerinde yer alan ilaç-hedeflenebilir bölgelerinin DoGSiteScorer ile tahmini olarak hesaplanmış konumlarının gösterimi.	70
Şekil 3.12. BbigLDH kapalı modelinin üç boyutlu yapısı üzerinde yer alan ilaç-hedeflenebilir bölgelerinin DoGSiteScorer ile tahmini olarak hesaplanmış konumlarının gösterimi.	72
Şekil 3.13. (A) İlaç keşfi sürecinde sanal tarama için kullanılan hesaplama modelinin sınıflandırma performansını gösteren Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic, ROC) eğrisi.....	76
Şekil 3.14. Superimpoz görüntüleri (PDB ID: Ligand)	78
Şekil 3.15. Açık BbigLDH (lacivert) ile kristal yapıları (turuncu) bulunan ligandların superpozisyon görüntüleri.	79
Şekil 3.16. Kapalı BbigLDH (lacivert) ile kristal yapıları (turuncu) bulunan ligandların superpozisyon görüntüleri.	80
Şekil 3.17. AlphaFold veri bankasındaki <i>Btaurus</i> LDH yapıları.	87
Şekil 3.18. Desmond ile gerçekleştirilen 300 ns moleküler dinamik simülasyonu sonrası RMSD Analizi Grafikleri	90
Şekil 3.19. 1000 ns Desmond moleküler dinamik simülasyonu sonrası RMSD Analiz Grafikleri.	91
Şekil 3.20. MM/GBSA ΔG bağlanma enerjisi bileşenleri.....	92
Şekil 3.21. BbigLDH komplekslerinin IFD sonrası (sarı) ve 1000 ns MDS sonrası (yeşil) süperimpoz görüntüleri.....	93
Şekil 3.22. C9, C16 ve C18 ile 3 boyutlu BbigLDH yapısına ait bağlanma modları. ...	94

Şekil 3.23. 1000 MDS boyunca bileşik ve protein rezidüleri arasında oluşan etkileşimlerin 2 boyutlu görüntüsü ve etkileşimlerin yüzdeleri	95
Şekil 3.24. PZR yöntemi ile BbigLDH geninin amplifikasyonu sonucunda oluşan bantlaşma.	96
Şekil 3.25. BbigLDH geninin pLATE31 vektörüne alt klonlanmasının devamında <i>E. coli</i> BL21 (DE3) kompetan hücrelerine transformasyonu	97
Şekil 3.26. Miniprep ardından elde edilen agaroz jel görüntüsü.	98
Şekil 3.27. Örnekler 1 mM IPTG ile indüklenerek 3 saat inkübe edilmiştir, sarı ok 36 kDa olduğu ve BbigLDH proteininin varlığını gösteren bantlaşma.	99
Şekil 3.28. Örnekler 1 mM IPTG ile indüklenerek 3 saat ve bir gece inkübe edilmiştir, sarı ok 36 kDa olduğu ve BbigLDH proteininin varlığını gösteren bantlaşma	100
Şekil 3.29. Örnekler 1mM IPTG ile indüklenerek bir gece inkübe edilmiştir, sarı ok 36 kDa olduğu ve BbigLDH proteininin varlığını gösteren bantlaşma.....	101
Şekil 3.30. Rekombinant BbigLDH-pLATE31 in BL21 (DE3) kültürünün 37°C-220rpm koşulunda geliştirilerek 1mM IPTG ile indüklemenin ardından bir gece bekletilerek (ON) elde edilen protein örneklerinin SDS-Page yöntemiyle görüntülenmesi.....	102
Şekil 3.31. BbigLDH enziminin oda koşullarında 1 dk. Boyunca aktivite değerleri...	103
Şekil 3.32. BbigLDH için (A) Pirüvat: 0.078-10 mM ve (B) NADH: 0.006-0.8 mM substrat konsantrasyonuna karşı başlangıç hızı (V_i).....	103
Şekil 3.33. Ortalama değerlere göre belirlenen pH-absorbans değerleri.	106
Şekil 3.34. BbigLDH enziminin termostabilite deneyi sonucunda elde edilen absorbans değerleri ve zaman grafiği.	107
Şekil 3.35. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda +4°C’de saklanan enzim aktivite ölçümleri.	109
Şekil 3.36. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -20°C’de saklanan enzim aktivite ölçümleri	110
Şekil 3.37. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -80°C’de saklanan enzim aktivite ölçümleri	111

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Apikompleksaların sınıflandırılması	2
Tablo 1.2. Hayvanlara bulaşıcı olan başlıca <i>Babesia</i> türleri, onların kene vektörleri ve coğrafi dağılımları.	4
Tablo 1.3. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda apikompleksan parazitlerine ait LDH enzimini hedef aldığı belirtilen inhibitörler.	13
Tablo 2.1. Yapı-temelli sanal tarama metodunda kullanılacak olan ligand kütüphaneleri ve içerikleri.	21
Tablo 2.2. BbigLDH genine yönelik tasarlanan primerler ve özellikleri.	37
Tablo 2.3. Gen amplifikasyonunda kullanılan PZR ürünleri ve miktarları.	38
Tablo 2.4. LIC reaksiyonu için önerilen PZR ürün miktarları.	40
Tablo 2.5. Koloni PZR için gereken bileşik ve miktarları.	42
Tablo 2.6. BbigLDH örneklerinin (B) farklı koruyucu bileşiklerle hazırlanması ve içerik bilgileri.	49
Tablo 3.1. Clustal W analizi sonucunda <i>B. bigemina</i> LDH amino asit dizisinin diğer türlerle olan benzerlik yüzdeleri.	51
Tablo 3.2. BbigLDH amino asit dizisinin (XP_012766822.1) InterPro analiz sonucu.	54
Tablo 3.3. BbigLDH protein modellerine ait yapılan modellerin validasyonlarına ait sonuçların özeti.	62
Tablo 3.4. BbigLDH protein modellerine ait minimizasyon sonrası yapılan validasyonlarına ait sonuçların özeti.	66
Tablo 3.5. MDS sonucunda oluşangrafiğin sayısal değerleri.	68
Tablo 3.6. BbigLDH açık model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.	70
Tablo 3.7. BbigLDH açık model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.	70
Tablo 3.8. BbigLDH açık model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.	71
Tablo 3.9. BbigLDH açık model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.	71
Tablo 3.10. BbigLDH kapalı model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.	72

Tablo 3.11. BbigLDH kapalı model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.	73
Tablo 3.12. BbigLDH kapalı model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.....	73
Tablo 3.13. BbigLDH açık model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.....	73
Tablo 3.14. PDB veri bankasında kristal yapıları bilinen <i>P. falciparum</i> LDH yapısında bulunan inhibitörlere ait veriler.	74
Tablo 3.15. Kristal yapısı bilinen LDH yapısı üzerinde yer alan inhibitörlerin etkileştiği rezidüleri karşılık olarak BbigLDH yapısında bulunan rezidülerin gösterimi	75
Tablo 3.16. Zenginleştirme rapor sonuçları (1122 sahte + 34 aktif set).	76
Tablo 3.17. Kontrol dock için kullanılan protein PDB yapılarında yer alan referans ligandlar ile yeniden proteine yanaştırılması sonrası oluşan protein yapısında yer alan ligandın RMSD, glide score ve glide emodel (kcal/mol) değerleri.	78
Tablo 3.18. PDB yapıları bilinen açık (1U4O, 1U4S, 1U5A) ve kapalı PfLDH (1T24, 1T25, 1T26 ve 1LDG) yapılarında bulunan ligandların, BbigLDH ile yanaştırılması sonucu elde edilen yeni yapılar ile kristal yapıların karşılaştırılması.....	81
Tablo 3.19. Kuantum Mekanik Polarize Ligand Yanaştırma (QPLD) yöntemine ait sonuçların en düşük XP Gscore (kcal/mol) değerine göre sıralanması.	84
Tablo 3.20. IFD yanaştırma sonrası belirlenen ligandların HTVS, QPLD ve IFD XPGScore, prime enerji ve IFD skor değerleri	85
Tablo 3.21. IFD sonrası belirlenen ligandların konak LDH'leri ile Glide XP moleküler yanaştırması sonrasında elde edilen XP GScore değerleri (kcal/mol).....	87
Tablo 3.22. GROMACS 100 ns MDS sonrası Lig-fit-prot RMSD ortalama değerleri ve Desmond ile son 5 ns için MM/GBSA ΔG ortalama hesaplama sonuçları.	88
Tablo 3.23. BbigLDH kinetik parametreleri.	103
Tablo 3.24. Farklı apikompleksan türlerine ait LDH ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonucunda elde edilen NADH ve pirüvat K_m değerleri.....	104
Tablo 3.25. Çoklu tekrarların sonucunda elde edilen aktivite değerleri.	105
Tablo 3.26. BbigLDH enziminin termostabilite deneyi sonucundaki ortalama absorbanz değerleri ($\Delta A_{340}/dk$).	107

Tablo 3.27. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda +4°C’de saklanan enzim aktivitesinin üç ölçümün ortalamaları.....	109
Tablo 3.28. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -20°C’de saklanan enzim aktivitesinin üç ölçümün ortalamaları.....	110
Tablo 3.29. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -80°C’de saklanan enzim aktivitesinin üç ölçümün ortalamaları.....	111



1. GİRİŞ

1.1. Apikompleksanlar

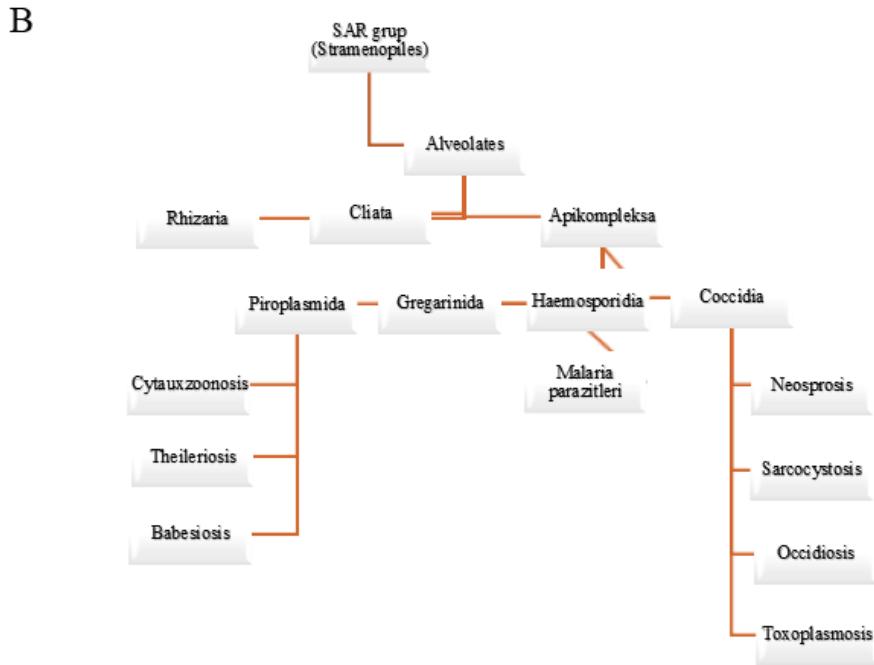
Apikompleksanlar, obligat parazit olup geniş bir çeşitliliğe sahip organizmalardır. 6.000'den fazla adlandırılmış tür, omurgasızları ve çoğunlukla omurgalıları enfekte edebilir. Doğal koşullar altında çoğu parazit enfeksiyonu semptomsuz olsada, bazı apikompleksan türleri insanlar ve hayvanlar için ciddi hastalıkların nedenidir (Votýpka vd. 2017). Apikompleksanlar kayma hareketi ile hareket ederler ve apikal organel tarafından karakterize edilirler. Organel içeriğini bir mikrotübül-çengelli halka aracılığıyla salgırlar (Votýpka vd. 2017). En bilinenler türleri arasında, sıtmanın başlıca nedeni olan *Plasmodium* türü bulunmaktadır. Bu parazit, çoğunlukla tropikal bölgelerde ekonomik kayıplardan ve hatta insanlarda ölümlerden sorumludur (Gething vd. 2011). Bir başka apikompleksan türü olan *Theileria*, sığırlarda görülen doğu sahil ateşine (The east coast fever) neden olmaktadır. Tropikal bölgelerdeki theileriosis, sırasıyla *Theileria parva* ve *Theileria annulata* tarafından meydana gelmektedir (Bishop vd. 2004). Bir diğer apikompleksan türü olan *Babesia*; sığırların, atların, köpeklerin ve nadiren insanların babesiosisine neden olmaktadır. Enfekte hayvanlarda zayıf büyüme, düşük süt üretimi gibi ileri durumlarda da konağın ölümüne de neden olmaktadır (Bock vd. 2004). *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis hastalığına neden olan ve neredeyse her memeli ve insan dahil olmak üzere enfekte edebilen en yaygın protozoan parazittir (Tenter, Heckeroth, ve Weiss 2000). Çeşitli *Eimeria* türleri, koksidiozis hastalığına neden olan ve tavuk çiftliklerinde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır. Bu türler, doğrudan ölümler, azalmış ağırlık artışı ile tavuk çiftliklerinde önemli bir morbiditeye neden olmaktadır (Allen ve Fetterer 2002).

Apikompleksanlar; gregarinler, koksidialar, hematoozanlar (sıtma parazitleri) ve piroplazmalar olmak üzere geleneksel olarak dört sınıfa ayrılmaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Apicompleksaların sınıflandırılması (Votýpka vd. 2017). (A) Sınıflandırma tablosu, (B) Sınıflandırma şematığı.

A

<i>Phylum: Apicomplexa</i> Levine, 1970 emend. Adl et al., 2005	
Core apicomplexans (obligatory parasites)	
<i>Subphylum: Conoidasida</i> Levine, 1988	
<i>Class: Gregarinida</i> Dufour, 1828	Gregarines
<i>Class: Coccidia</i> Leuckart, 1879	Coccidia, haemogregarines
<i>Cryptosporidida incertae sedis</i>	Cryptosporidia
<i>Subphylum: Aconoidasida</i> Mehlhorn, Peters and Haberkorn, 1980	Hematozoa
<i>Class: Haemosporidia</i> Danielewsky, 1885	Haemosporidia (malarial parasites)
<i>Class: Piroplasmida</i> Wenyon, 1926	Piroplasms
Relict apicomplexans (free-living)	
<i>Colpodellida</i> Cavalier-Smith, 1993 <i>incertae sedis</i>	Colpodellids
<i>Chromerida</i> Moore et al., 2008 <i>incertae sedis</i>	Chromerids



1.2. Piroplasmidalar

Piroplasmidalar, adını konak eritrositlerinde oluşan armut şeklindeki (piriform) hücre içi evrelerinden almaktadır. Cytauxzoonosis, Babesiidae ve Theileriidae ailelerini kapsamaktadır (Votýpka vd. 2017). Piroplasmidaların benzersiz morfolojik özellikleri arasında konoidin yokluğu ve apikal kompleksin polar halkaya indirgenmesi bulunur (Votýpka vd. 2017). Piroplasmidalar, konak hücresine girdikten sonra, birkaç istisna dışında (*Theileria buffeli*, *T. separata*), herhangi bir pigment veya diğer görünür artıklar

oluşturmadan konak hemoglobini sindirir. Taksonomik sınıflandırma, Piroplasmida türlerini Apicompleksa şubesine yerleştirir ve bunları sıtma hastalığı ajanları olan *Plasmodium* parazitlerine yakın akrabalar olarak kabul eder. Piroplasmida düzeninde beş evrimsel soy tanınmaktadır (*Babesia* sensu stricto, *Theileria* sensu stricto, *Theileria equi*, Western *Babesia* grup, *Babesia microti* grup). Piroplasmidalar, apikal kompleks organeller, eritrositlerde merogoni (aseksüel çoğalma) ve ardından invertebrat vektörlerde (kenelerde) sporozoit formasyonu ile cinsel çoğalma gibi birçok morfolojik ve gelişimsel özelliği paylaşmaktadır (Jalovecka vd. 2018)

1.3. Babesialar ve Hayvanlarda Babesiosis

Babesiosis, genellikle evcil ve yabani hayvanları, nadiren de insanları enfekte eden *Babesia* cinsine ait intraeritrositik protozoan parazitler tarafından oluşturulan bir hastalıktır. Bu hastalık genellikle kene tarafından taşınır ve dünya çapında yayılmıştır (Bock vd. 2004). Babes (1888), Romanya'da sığırlarda hemoglobinüriye neden olan hastalık salgınlarını araştırmış ve sığırların kanında piroplazmaları ilk tanımlayan kişi olmuştur (Babes, V. 1888). Mikroorganizmayı bir bakteri olarak düşünerek ona *Haematococcus bovis* adını vermiş, ancak daha sonra adı *Babesia bovis* olarak değiştirilmiştir. Kısa bir süre sonra, ABD'de Smith ve Kilborne'un (1893) yaptığı araştırmalarla, 'Texas Fever' (babesiosis) hastalığının neden olduğu organizmayı keşfetmiş ve ona *Pyrosoma bigeminum* (= *Babesia bigemina*) adını vermiştir. Ayrıca bu çalışmayla ilk defa parazitin vektörü aracılığıyla konağa geçişi de gösterilmiştir (Smith ve Kilborne 1893).

Criado-Fornelio ve ark. (2003), filogenetik analiz için 18S rRNA genini kullanmış ve piroplazmaları beş klad'a ayırmıştır: (1) *Babesia caballi*, *B. bigemina*, *Babesia ovis*, *B. bovis* ve sığırlardan *Babesia* sp.; (2) köpeklerden gelen *Babesia canis* ve *B. gibsoni* türlerini içeren ikinci bir *Babesia* türleri grubu, *Babesia divergens* ve *B. odocoilei*; (3) *B. microti* grubu, *Babesia rodhaini*, *Babesia felis*, *Babesia leo*, *B. microti* ve *Theileria annae*'yi içeren; (4) Batı Amerika Birleşik Devletleri'nde *Theileria* benzeri bir grup; (5) *Bovinae*'den gelen tüm *Theileria* türlerini içeren *Theileria* grubu (Criado-Fornelio vd. 2003) (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Hayvanlara bulaşıcı olan başlıca *Babesia* türleri, onların kene vektörleri ve coğrafi dağılımları (Bock vd. 2004).

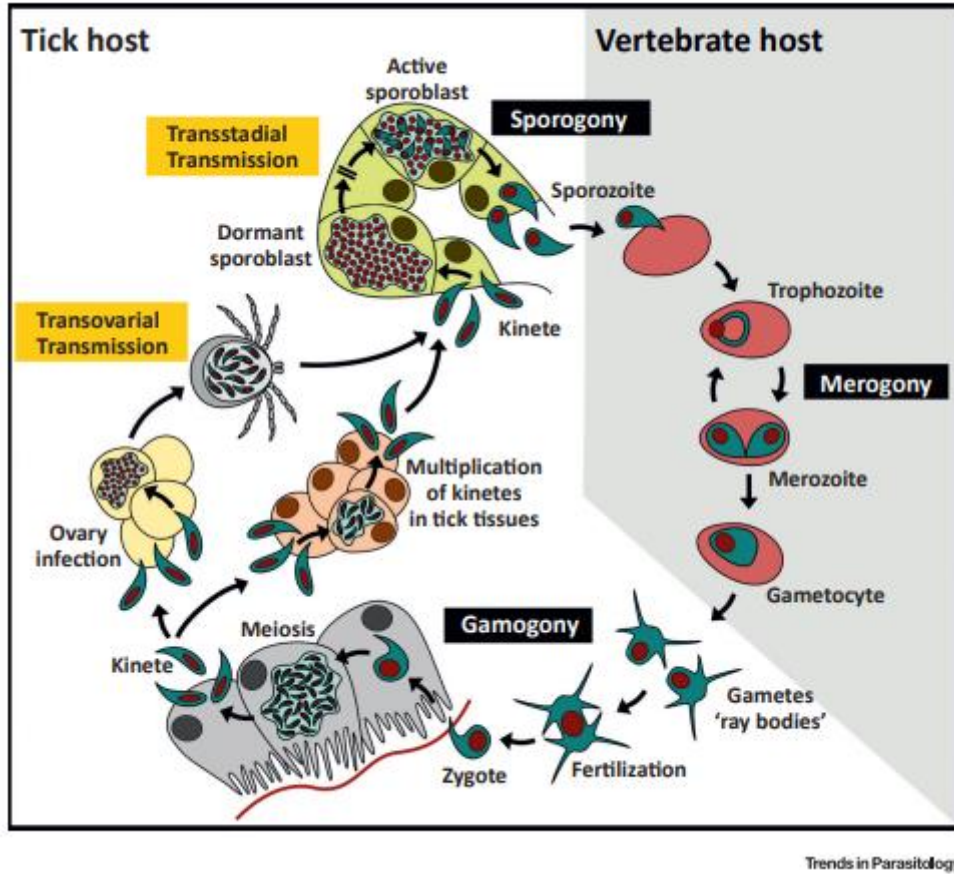
<i>Babesia</i> species	Major ixodid vectors	Known distribution	Domestic species affected
<i>Babesia bigemina</i>	<i>Boophilus microplus</i> , <i>Boophilus decoloratus</i> , <i>Boophilus annulatus</i> , <i>Boophilus geigyi</i> , <i>Rhipicephalus evertsi</i>	Africa, Asia, Australia, Central and South America and Southern Europe	Cattle, buffalo
<i>Babesia bovis</i>	<i>Boophilus microplus</i> , <i>Boophilus annulatus</i> , <i>Boophilus geigyi</i>	As for <i>Babesia bigemina</i> , but less widespread in Africa due to <i>B. microplus</i> competition with, <i>B. decoloratus</i>	Cattle, buffalo
<i>Babesia divergens</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	North-west Europe, Spain, Great Britain, Ireland	Cattle
<i>Babesia major</i>	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Europe, North west Africa, Asia	Cattle
<i>Babesia ovata</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Eastern Asia	Cattle
<i>Babesia ovis</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>	South-eastern Europe, North Africa, Middle East Asia	Sheep and Goat
<i>Babesia motasi</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i>	South-eastern Europe, North Africa and Asia	Sheep and Goat
<i>Babesia caballi</i>	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Hyalomma marginatus</i> , <i>Hyalomma truncatum</i> , <i>Rhipicephalus evertsi evertsi</i>	Africa, South and central America and southern USA, Europe, Asia	Horses, Donkey, Mule
<i>Babesia canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.	Southern Europe, North America, Asia, Africa, Australia	Dog
<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Africa, Asia, Europe, North America	Dog
<i>Babesia traubmanni</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Southern Europe, former USSR, Africa	Pig

1.4. *Babesiaların Eritrositlerdeki Yaşam Döngüsü*

Babesiaların yaşam döngüsü, apikompleksan üyelerinin gelişimsel şemasına benzer takip eder ve üç ardışık fazı içerir: merogoni, gamogoni ve sporogoni (Jalovecka vd. 2019). Temel yaşam döngüsündeki hedefleri şunlardır: (i) Çoğalma yoluyla parazit varlığını sürdürmek, (ii) Özel enfektif aşamalar aracılığıyla konaktan konağa geçişi garanti etmek. Her iki hedefte, omurgalı konak ve kene vektörü arasında değişen aseksüel üreme döngüsü ve seksüel üreme döngüsünün kombinasyonuyla gerçekleşir (Jalovecka vd. 2019). *Babesia*, “transstadial transmission” olarak adlandırılan ardışık kenelerin gelişim aşamalarında varlığını sürdürme yeteneğini geliştirmiştir. Ayrıca parazitin devamlılık stratejilerinden biri de “transovarial transmission” olarak adlandırılır. Bu yöntemle parazit, tek bir ana keneden binlerce yavruya yayılabilir (Jalovecka vd. 2019).

Sporozoitler, enfekte bir kene bireyinin beslenme sırasında konak kan dolaşımına enjekte olur ve sporozoitlerin eritrositlere yerleşmesi merogoniye başlatır

(Şekil 1.1). Bu süreçte ilk olarak, hücre içi sporozoitler trofozoitlere dönüşür, bunlar da daha sonra yapıdan çıkabilen ve naive alyuvarları yeniden enfekte edebilen merozoitlere dönüşürler. Alyuvar istilası, apikal kompleks tarafından salgılanan proteinler aracılığıyla gerçekleştirilir (Jalovecka vd. 2019).



Şekil 1.1. *Babesia* yaşam döngüsü. Kenede sporogony formundaki *B. bigemina*, dişi kene yumurtaları aracılığıyla sporozoit yapısında eritrositlere yerleşir ve tropozoit haline geçerler. Burada ikiye bölünerek (binary fission) merozoit hale geçerler. Bu haldeyken eritrositi parçalayarak çıkarlar ve başka eritrositlere yerleşirler. Eritrosit içerisinde eşeyli üreme ile gametosit yapılarını da oluştururlar. Oluşan gametler döllenerek zigot yapılarını oluştururlar. Zigot yapıları kenenin bağırsak epitel hücrelerine yerleşerek mayoz geçirerek kinetlerin oluşumunu sağlar. Kinetler, kenelerin yumurta ve vücut sıvılarına yerleşmektedir. Ayrıca, Sporozoit yapılar omurgalı konağa geçene kadar dormantır (Jalovecka vd. 2019).

Şekil 1.2’de görüldüğü üzere Merogony, gamogony ve sporogony bütün piroplasmlar için ortaktır. Şizogony yalnızca *Theileria* ve *Cytauxzoon* spp.

görülmektedir. Buna ek olarak Transstadial transmission gene bütün piroplazmlar da görülürken, Transovarial transmission yalnızca *Babesia sensu stricto*'da görülmektedir.

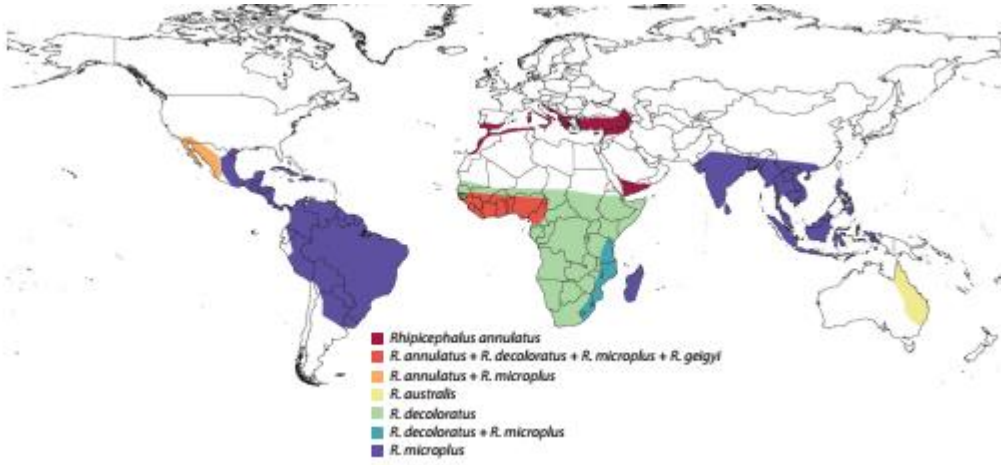
Piroplasms	Schizogony	Merogony	Gamogony	Sporogony	Transstadial transmission	Transovarial transmission
<i>Babesia sensu stricto</i>	X					
<i>Babesia sensu lato</i>	X?					X
<i>Theileria spp.</i> <i>Cytauxzoon spp.</i>						X

Şekil 1.2. Piroplasmidaların karakteristik özellikleri (Jalovecka vd. 2019).

'Texas fever' olarak bilinen ve babesiosis olarak tanımlanan hastalık, apikopleksan parazit olan *B. bigemina* nedeniyle oluşmakta ve keneler aracılığıyla bulaşmaktadır (Smith ve Kilborne 1893). Hastalık, hayvan konaklarda; hemolitik anemi, ateş, hemoglobüri gibi bazı semptomlara ek olarak ileri durumlarda ise ölümlere neden olmaktadır. Etkisi evcil hayvanları, çiftlik hayvanlarını, vahşi yaşamı ve hatta insanları içeren çeşitli memeli türlerini kapsamaktadır (Schnittger vd. 2012; Bock vd. 2004; Calvopiña vd. 2023). *B. bigemina*, dünya çapında tropikal ve subtropikal bölgelerde (Afrika, Asya, Amerika, Güney Avrupa ve Avustralya gibi kıtalarda) yaygındır (Bock vd. 2004). Bu patojenler için başlıca vektörler *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus*, *R. australis*, *R. decoloratus*, *R. bursa*, *R. geigy* ve *R. evertsi*'dir (Schnittger vd. 2012; Bock vd. 2004). Şu anda, diminazene asetüat (DA) ve imidocarb dipropiyonat en yaygın kullanılan anti-babesiyal ilaçlardır (Silva vd. 2020; J. Mosqueda vd. 2012; Shah vd. 2019). Ancak, bu ilaçların sürekli veya uygun olmayan kullanımı, ilaç direnci riskini doğurmaktadır (J. Mosqueda vd. 2012; Tuvshintulga vd. 2019; Todorovic R. A. 1973). Ayrıca ette ve sütte kimyasal kalıntı bırakma olasılığı taşımaktadırlar. Bu durum, insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Coldham vd. 1995; Vial ve Gorenflot 2006; Zintl vd. 2003). Bu nedenle daha az toksisiteye sahip alternatif, etkili ve ekonomik ilaçların keşfedilmesi gerektiğini açıkça görülmektedir (Suarez ve Noh 2011; McHARDY vd. 1986).

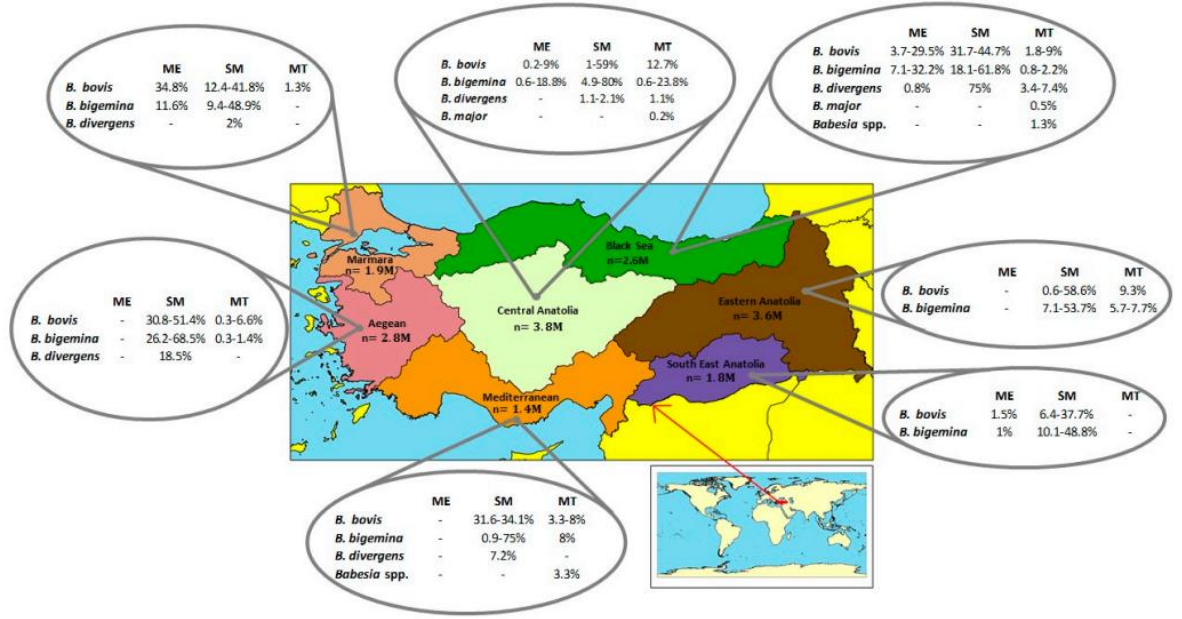
1.5. Parazitin Coğrafi Bölge Yayılımı ve Türkiye’deki durumu

Dünyada yaygın olarak görüldüğü yerler; Afrika, Asya, Avusturalya, Orta ve Güney Amerika ve Güney Avrupa’da rapor edilmiştir (Bock vd. 2004). Şekil 1.3’te de *Babesia bigemina* türünün vektörü olan *Rhipicephalus annulatus* kenesinin Türkiye geneline bir yayılım gösterdiği açıkça görülmektedir.



Şekil 1.3. Bovine babesiosis vektörlerinin coğrafi yayılımı (Gray, Estrada-Peña, ve Zintl 2019).

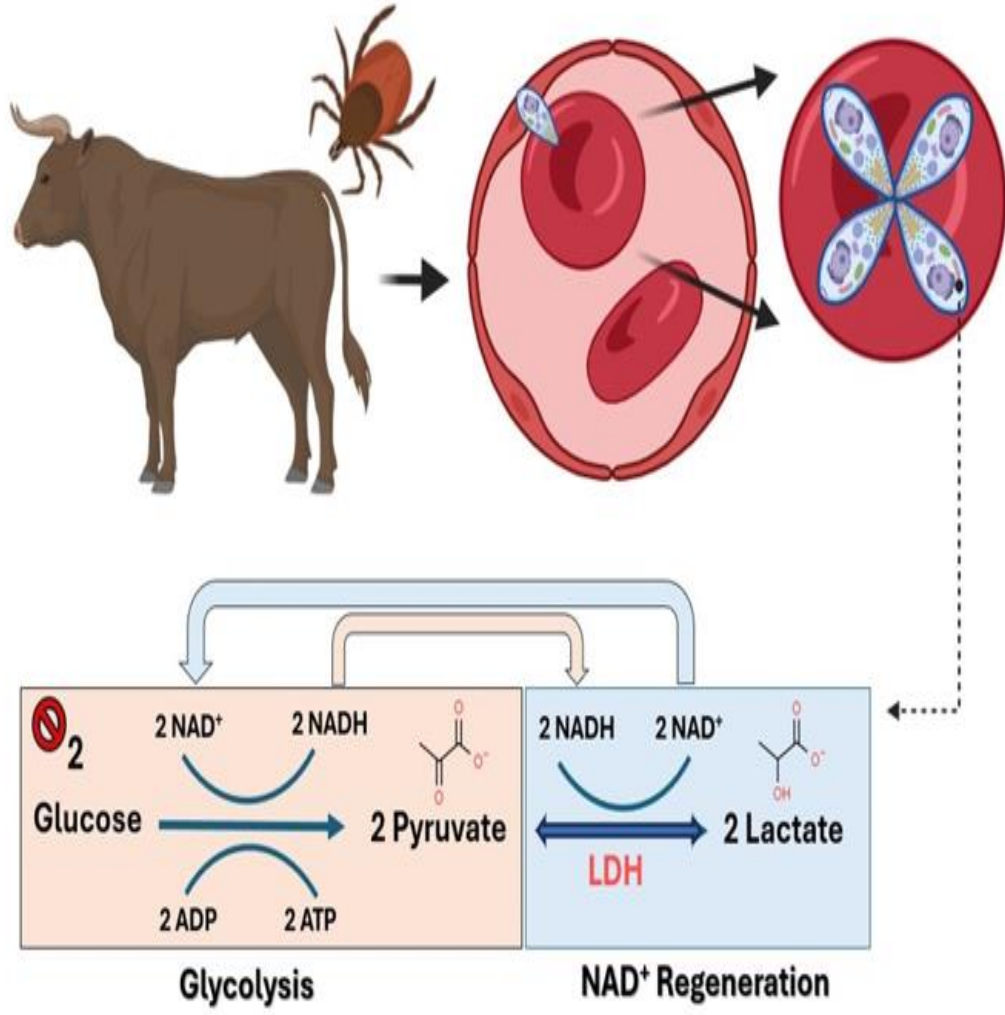
Bovine babesiosis, Türkiye’de ise yedi coğrafi bölgesinde farklı tanı yöntemleri kullanılarak rapor edilmiştir (Şekil 1.4). *B. bovis* ve *B. bigemina*, tüm coğrafi bölgelerde rapor edilirken, *B. divergens*’in daha çok nemli kıyı bölgelerinde bulunduğu belirlenmiştir. Birçok epidemiyolojik araştırmaya rağmen, vaka bazlı çalışmaların sayısı düşüktür. Bu nedenle, bovine babesiosis vakalarını sistemli bir şekilde kaydetmek için ulusal bir programın olmaması, hastalığın prevalansını ve gerçek ekonomik etkisini doğru bir şekilde değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır. Bovine babesiosis ile ilişkili yıllık ekonomik kayıplar üzerine herhangi bir çalışma olmamasına rağmen, hastalığın büyük ölçüde yaygın olduğu coğrafi bölgelerde Türkiye’deki hayvancılık endüstrisine ciddi maliyetlere neden olduğu düşünülmektedir. Tüm bulgular bir araya getirildiğinde, Türkiye’de bovin babesiosis’in mevcut durumunu değerlendirmeye ve kontrol önlemlerini geliştirmeye yönelik koordineli çabaların organize edilmesi gerektiği açıkça görülmektedir (Ozubek vd. 2020).



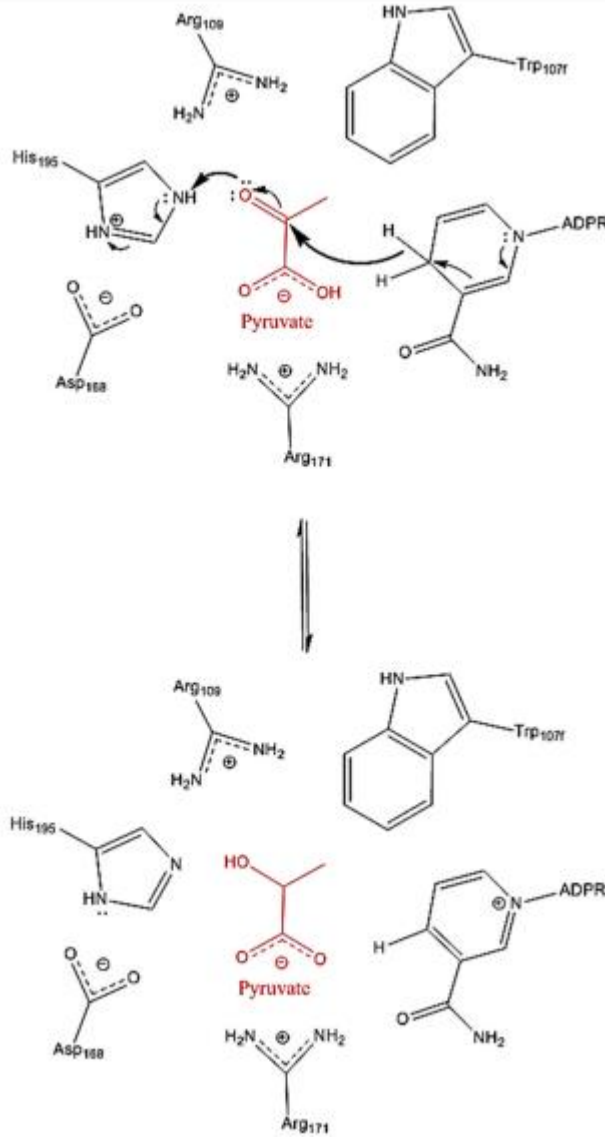
Şekil 1.4. Türkiye'nin yedi coğrafi bölgesinde bovine *Babesia* türlerinin yaygın olarak görülme oranları; mikroskopik inceleme (ME), serolojik yöntemler (SM) ve moleküler teknikler (MT) (Ozubek vd. 2020).

1.6. İlaç Hedefi olarak Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH), pirüvatın laktata dönüşümünü ve tam tersi tepkimeyi kolaylaştıran önemli bir glikolitik enzim olarak görev yapar (Homewood ve Neame 1983). Apikopleksanların enerji metabolizmasında, LDH özellikle anaerobik koşullarda NADH'ı koenzim olarak kullanarak enerji döngüsünün sağlanmasında rol almaktadır (Şekil 1.5) (Kavanagh, Elling, ve Wilson 2004). Bu süreçle üretilen enerji, parazitlerin biyokimyasal süreçlerini desteklemek ve hayatta kalmalarını sağlamak için kullanılır.



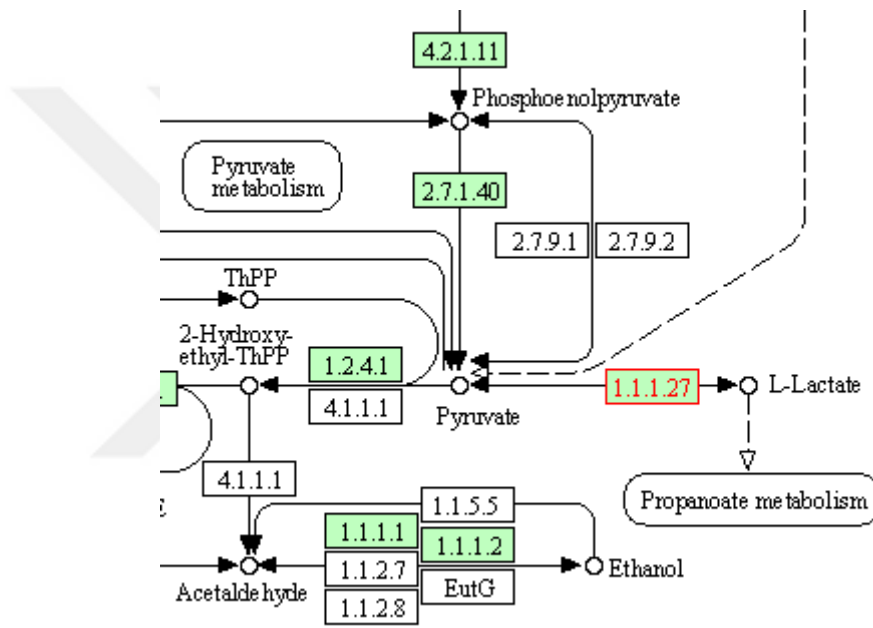
Şekil 1.5. Anaerobik glikolizde LDH enzimi ile NAD⁺ yeniden dönüşümü.



Şekil 1.6. *P. falciparum* LDH substrat spesifik döngüsünün kapanması ve enzimin kataliz mekanizması. NADH ve ardından pirüvat (kırmızı), enzime bağlanarak üçlü kompleks oluşturmaktadır. Spesifiklik döngüsünün kapanması, R109 ve W107fi substratın yakınına getirirken, NADH pirüvatı laktata indirgemek için bir hidrür bağışı yapmaktadır (Wirth vd. 2018). (Rezidü numaraları geleneksel LDH adlandırmalarına uygun olarak verilmiştir).

Günümüzde BbigLDH katalitik mekanizması hakkında detaylı bir araştırma yoktur. Ancak apikompleksan paraziti olan PfLDH ile ilgili detaylı çalışmalar mevcuttur. Katalitik mekanizmanın anlaşılması için PfLDH ile BbigLDH karşılaştırması önemlidir. He 2022 çalışmasına göre BbigLDH katalitik rezidüleri PfLDH ile aynıdır (He vd. 2022).

PfLDH için pirüvatın enzimatik olarak laktata indirgenmesi şu adımlarla gerçekleşmektedir; (1) Protein "açık formundan" başlamak üzere NADH apoenzime bağlanır, (2) R171, aktif bölgede pirüvatı yönlendirerek üçlü kompleksi oluşturmaktadır, (3) substrat spesifik döngü aktif bölgenin üzerine kapanmaktadır, böylece R109 substratı bağlayarak geçiş durumunu (transition state) stabilize etmektedir, (4) NADH, hidrojen transferi yoluyla pirüvatı laktata indirgemektedir, (5) substrat spesifik döngü açılarak laktat serbest bırakılmaktadır, ve (6) NAD⁺ serbest kalarak apoenzimin yeniden oluşumunu sağlamaktadır. D168, pirüvatın laktata indirgenmesi sırasında katalitik H195'i aktive ederek proton transferini mümkün kılmaktadır (Shoemark vd. 2007).



Şekil 1.7. BbigLDH enziminin (1.1.1.27) KEGG veribankasında bulunan glikoliziz yolağındaki konumu (Pathway ID: bbig00010).

Enzimin kritik öneme sahip olması ve enerji metabolizmasındaki rolünün alternatifinin bulunmaması nedeniyle ilaç keşfine yönelik LDH'ı hedefleyen birçok çalışma mevcuttur. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, apikompleksan LDH yapısındaki substrat spesifik döngüsünde bulunan beş amino asitlik insersiyonun varlığı keşfedilmiştir. Bu durum sayesinde, yalnızca parazit hedefli (spesifik) ilaçlar geliştirilebilmektedir. Bölgedeki beş amino asitlik insersiyonun varlığı ilk olarak *Plasmodium falciparum* için tanımlanmıştır (Dunn vd. 1996). Daha sonra yapılan çalışmalarla, atasalLDH ve *B. bigemina* dahil birçok apikompleksan parazitin de substrat spesifik döngüsünde insersiyonun var olduğu, ancak farklı amino asit dizileriyle

ifade edildiği gösterilmiştir (He vd. 2022; Kavanagh, Elling, ve Wilson 2004; Boucher vd. 2014; Bork vd. 2004; Turgut-Balik vd. 2004; Mutlu ve Turgut Balık 2012; Erdemir ve Mutlu 2017). *P. falciparum* LDH'yi inceleyen diğer çalışmalar, enzim için spesifik bir inhibitör keşfine yönelik potansiyelini göstermiştir (Gomez vd. 1997). Apikopleksan parazitlerdeki LDH ile ilgili diğer çalışmalar *T. gondii*, *C. parvum* gibi parazitleri içermektedir ve apikopleksan LDH'nin bir ilaç hedefi olarak kullanılabileceği hipotezini desteklemektedir (Al-Anouti vd. 2004; Madern 2003). *B. microti* LDH'nin (BmLDH) kristal yapısı, *Babesia*larda görüntülenen ilk yapıdır. Ancak, BmLDH'nin apikopleksan LDH'lerinden önemli farklılıklar gösterdiği ve yapısının konak benzeri LDH'ye daha yakın olduğu bilinmektedir (Yu vd. 2019; Akash vd. 2023). Yu vd. (2022), *Babesia orientalis*'ten (BoLDH) apikopleksan LDH kodlayan bir cDNA klonunu tanımlanmıştır ve apo formundaki kristal yapısını yayınlanmıştır (Yu vd. 2022). Bu yapıda genel apikopleksan LDH yapısındaki beş amino asitlik insersiyon yer almaktadır.

Öte yandan, LDH inhibitörü olarak bilinen gossypol ilk olarak *P. falciparum* için antimalaryal olarak kullanılmış (Royer vd. 1986; Connors vd. 2005) ve ardından çeşitli *Babesia* türleri üzerindeki etkileri için de araştırmalar yapılmıştır. Bununla alakalı bir çalışmada, *B. bovis* için, *in vitro* ortama 50 µM gossypol eklenmesinin, NADH ilerekabetçi bir inhibitör olarak enzimatik aktivitenin dikkate değer bir şekilde durdurulmasına neden olduğu gösterilmiştir (Bork vd. 2004). Başka bir çalışmada da gossypolün *B. bigemina*'nın *in vitro* büyümesi üzerinde inhibe edici etkisi ve 72 saatlik tedavi sonrasında IC₅₀ değeri 43.97 µM olarak maksimum inhibe edici konsantrasyon (IC₉₈), 60 µM gossypol ile gözlemlenmiştir (He vd. 2022). Ayrıca apikopleksan parazit LDH'lerine yönelik yapılan diğer inhibitör çalışmaları da Tablo 1.3'te özetlenmiştir. LDH'nin inhibe edilmesinin parazitin çoğalmasını engellediği için hayati rolünün olduğu ve apikopleksan parazitleri için önemli bir ilaç hedefi olduğunu yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır (Tablo 1.3).

Bu tez çalışmasında, *B. bigemina* LDH (BbigLDH) enziminin yapısının anlaşılmasına ve yapı-temelli sanal tarama (SBVS) yöntemleriyle aday inhibitörlerin keşfedilmesine odaklanılmıştır. Moleküler yanaştırma yöntemleri aracılığıyla hit moleküller belirlenmiştir. Devamında protein-ligand komplekslerinin stabilizasyonunu anlamak için moleküler dinamik simülasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, BbigLDH enzimi biyokimyasal ve biyofiziksel analizler için rekombinant olarak üretilip

saflaştırılmıştır. Bu çalışma, *B. bigemina* kaynaklı babesiosisin tedavisi için LDH enzimini hedef alan yeni terapötik adayların belirlenmesi ve enzimin rekombinant olarak üretilmesiyle beraber kinetik analizlerin yapılmasıyla konuyla ilgili ileride yapılabilecek çalışmalar için temel sağlayacaktır.

Tablo 1.3. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda apikompleksan parazitlerine ait LDH enzimini hedef aldığı belirtilen inhibitörler.

İnhibitör	Tür İsmi	Deney Koşulu	Hedef Bölge	Etkileri	Referans
Klorokin (Cq) Analog Maq ve Baq	<i>P. falciparum</i> (CQ-dirençli) <i>P. berghei</i> (farede)	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	LDH (NADH bağlanma bölgesi)	Hemozin oluşumunu engellediği ve dirençli türlerde antimalaryal etkisi gözlemlenmiştir.	(Aguir vd. 2012)
Katestatin ve Onun Türevleri Olan Sentetik Peptidler	<i>P. falciparum</i>	<i>in vitro</i>	LDH	Antimikrobiyal etkisi olduğu bilinen peptidlerin LDH ile bağlanmasına bakılarak antimalaryal etkisi gözlemlenmiştir.	(Akaddar vd. 2010)
Gossypol	<i>Babesia bovis</i>	<i>in vitro</i>	LDH	<i>B. bovis</i> enfekte olmuş eritrosit hücreleri üzerinde ilacın etkinliği denenmiştir ve LDH enzim aktivitesine bakılmıştır.	(Bork vd. 2004)
	<i>Babesia microti</i>	<i>in vitro</i>	LDH	BmLDH enzimi için moleküler ve kinetik karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.	(Vudriko vd. 2014)
Gossypol Türevleri ve Analogları	<i>P. vivax</i> , <i>ovale</i> , ve <i>malariae</i>	<i>in vitro</i> ve <i>in silico</i>	LDH (NADH bağlanma bölgesi)	LDH için korunmuş katalitik residü olan I250 ve T246 yerine prolin kullanılarak mutasyon oluşturulan pLDH modellerinin yapısal ve kinetik analizlerinin karşılaştırılması verilmiştir. İnhibitörlerin etkisi moleküler yanalştırma yöntemiyle incelenmiştir.	(Brown vd. 2004)
	<i>Babesia bigemina</i>	<i>in vitro</i>	LDH	LDH inhibitörü varsayılan Gossypol hücre kültüründe denenmiştir.	(He vd. 2022)

	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in vitro</i>	LDH (NADH ve pirüvat bağlanma bölgesi)	pflDH ile inhibitörlerin etkisi kristal yapı analizi ve enzim kinetiği analizi	(Connors vd. 2005)
	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in vitro</i>	LDH (NADH bağlanma bölgesi)	İnhibitör türevlerinin pflDH ve insan LDH-M ve LDH-H'ye etkileri enzim kinetik analiziyle tespit edilmiştir.	(Deck vd. 1998)
	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in vitro</i>	LDH (NADH bağlanma bölgesi)	Gossypol türevleri enzim kinetik çalışmalarıyla incelenmiş ve inhibitörlerin enfekte edilen eritrosit hücrelerine etkileri gösterilmiştir.	(Gomez vd. 1997)
Gossypol ve Oxamate	<i>Babesia microti</i>	<i>in vitro</i>	LDH (Arg99)	Çalışmada BmLDH enzim yapısına ait krital yapı analizi yapılmış ve Arg99'un enzim için önemli bir katalitik residü olduğu vurgulanmıştır.	(Yu vd. 2019)
Azol ve Türevleri	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in vitro</i>	LDH (NADH bağlanma bölgesi)	İnhibitörlerin pflDH ve insan LDH'sinin aktif bölgesi ile ilişkisi kristal yapı analizi ile gösterilmiştir.	(Cameron vd. 2004)
Oksamik Asid Türevleri	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in vitro ve in silico</i>	LDH (NADH bağlanma bölgesi)	İnhibitörler pflDH yapısına uygun olarak azole türevleri geliştirilerek moleküler yanıştırmaçalışmaları yapılmıştır. Ayrıca pflDH kinetik analizleri de çalışılmıştır.	(Choi vd. 2007)
Klorokin Türevleri ve Hematin	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in silico</i>	LDH (NADH bağlanma bölgesi)	İnhibitörlerin yanıştırmave MDSçalışmaları kullanılarak pflDH'ye etkileri incelenmiştir.	(Cortopassi vd. 2011)
ChEMBL1784973	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>in silico</i>	LDH (substrat bağlanma ve aktif bölgeleri)	<i>in silico</i> yapı, ligand ve de novo yaklaşımıyla seçilen 40 kadar inhibitör yanıştırmaçalışmasıyla CdLDH ile bağlanması değerlendirilip, inhibitörler elenmiştir.	(Dhal vd. 2018)
Nsc158011 ve Nsc10447	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>in vitro in vivo (fare)</i>	LDH	Rekombinant olarak üretilen CpLDH enzimine inhibitörlerin etkisi enzim kinetiği analiziyle gösterilmiştir. Enfekte olmuş HCT-8 hücreleri ile inhibitörlerin etkileri incelenmiştir. Ayrıca enfekte olmuş fareler	(Li vd. 2019)

				üzerinde inhibitör deneyleri yapılmıştır.	
N-(İndol-7-Yl)Acetamides Ve 3-Trifluoroacetyl Türevleri	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in vitro</i> <i>in silico</i>	LDH	pLDH için inhibitörlerle yanaştırma çalışması yapılmış olup ayrıca enzim kinetiği analizi yapılmıştır. Çalışmanın devamında maymun karaciğer Vero hücreleri kullanılarak ilaç toksisite testi yapılmıştır.	(Mphahlele, Mmonwa, ve Choong 2017)
İtrakonazol, Atorvastatin ve Posakonazol	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>in silico</i> <i>in vitro</i> <i>in vivo</i> (fare)	LDH	Çalışmada Drugbank'tan NADH türevi içeren ilaçlar seçilmiş ve yanaştırma çalışmalarıyla inhibitörler elenmiştir. Aktif olduğu düşünülen bu üç inhibitör enzim aktivite testi yapılarak incelenmiş ve ardından enfekte olmuş fareler üzerinde denenmiştir.	(Penna-Coutinho vd. 2011)
Naftalin Türevleri	<i>Babesia microti</i>	<i>in silico</i> <i>in vitro</i>	LDH (Arg99)	İnhibitörler yanaştırma çalışmalarıyla elenmiş ve inhibitör etkisi olabilecek üç inhibitör türevi kinetik ve toksisite testlerine tabi tutulmuştur.	(Yu vd. 2020)

2. ARAÇLAR ve YÖNTEMLER

2.1. In silico Araçlar ve Yöntemler

2.1.1. Dizi Analizi

Dizi analizi için gerekli olan protein dizileri NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri bankasından alınmıştır (Sayers vd. 2022). Tez çalışmasında *Bos taurus* LDH B (CAB96751.1), *Bos taurus* LDH A (BAA14170.1), *B. bovis* T2Bo (XP_001611047.1), *B. bigemina* (XP_012766822.1), *B. ovata* (XP_028866450.1), *T. equi* strain WA (XP_004833698.1), *T. orientalis* strain Shintoku (XP_009689964.1), *T. parva* strain Muguga (XP_766703.1), *T. annulata* (ADG45564.1), *P. malariae* (SBS88125.1), *P. yoelii* (XP_724101.1), *P. falciparum* (ABH03417.1), *P. falciparum* 3D7 (XP_001349989.1), *Toxoplasma gondii* ME49 (XP_002368488.1), *Eimeria acervulina* (ACM77785.1) organizmalarına ait LDH protein dizileri elde edilmiştir. Çoklu dizi hizalama (Multiple Sequence Alignment) uygulaması için ClustalW (1.2.4) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw/>) aracı kullanılmıştır (Thompson, Higgins, ve Gibson 1994). Analiz sonuçları ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>) kullanılarak görselleştirilmiştir (Gouet 2003). Elde edilen sonuçlarla *B. taurus* ve apikompleksan LDH enzimlerinin benzerliklerine ve farklarına yönelik incelemeler yapılmıştır. Katalitik rezidüler numaralandırılırken *B. bigemina*'ya özgü numaralandırmanın yanında parantez içinde de LDH için geleneksel numaralandırma verilmiştir (Örneğin; R98(109) gibi.) (Eventoff vd. 1977; Pineda, Callender, ve Schwartz 2007; Bertrand vd. 2023). Spesifik protein motif incelemeleri için MEME suit (<http://meme-suite.org>) sunucusu kullanılmıştır (Bailey vd. 2015). Filogenetik ağaç oluşturulması için MEGA11 (<http://www.megasoftware.net>) ve MUSCLE/Multiple Sequence Comparison by LOG-Expectation (<https://www.drive5.com/muscle>) programları kullanılmıştır (Tamura, Stecher, ve Kumar 2021; Edgar 2004). Proteinlerin korunmuş bölgelerinin tayini için InterPro (<http://InterPro.xfam.org>) sunucusu kullanılmıştır (Paysan-Lafosse vd. 2023). Protein ikincil yapı tahmini PSIPRED (Buchan vd. 2013), (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?disopred=1>) sunucusu yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

2.1.2. Homoloji Modelleme ve Model Validasyonları

Homoloji modelleme için gerekli olan kalıp proteini, NCBI BLAST [Basic Local Alignment Search Tool] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) programı ile BbigLDH ile en fazla aminoasit dizi benzerliği gösteren proteinler taranarak tespit edilmiştir (Altschul vd. 1990). Kapalı model yapısı için 4PLC (ancestral apicomplexan lactate dehydrogenase with malate) (Boucher vd. 2014) ve apoenzim (açık yapı formu) yapısı için 1PZE (*T. gondii* LDH1 apo form) (Kavanagh, Elling, ve Wilson 2004) proteinleri kalıp (template) olarak homolojiye dayalı modellemede kullanılmıştır. Proteinlerin homoloji modellemesi için MODELLER 9.23 (<http://salilab.org/modeller>) programı kullanılmıştır (Webb ve Sali 2016). Homolojiye dayalı modelleme sonucunda MODELLER ile oluşturulan 100 model arasından en uygun modelin seçimi için DOPE (Discrete Optimized Protein Energy- Ayrık Optimize Edilmiş Protein Enerjisi) skoru temel alınarak en düşük DOPE değerine sahip model seçilmiştir.

Elde edilen protein modelleri, UCSF Chimera 1.13.1 programı kullanılarak enerji minimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu minimizasyon işlemi, AMBERFF14SB force field kullanılarak 2000 adım “Steepest Descent” ve 1000 adım “Conjugate Gradient” algoritmaları ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrasında minimizasyon öncesi ve sonrasında homolojiye dayalı olarak elde edilen protein modellerinin validasyonları yapılmıştır. Bunun için online olarak sunulan programlardan; ERRAT (Colovos ve Yeates 1993), (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>), ProSa (Sippl 1993; Wiederstein ve Sippl 2007), (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), ProQ (Wallner ve Elofsson 2003), (<http://proq.bioinfo.se/ProQ/ProQ.html>), ProCHECK / Ramachandran Plot ((<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>), Verify3D (Bowie, Lüthy, ve Eisenberg 1991), (http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/), QMEAN (Benkert, Tosatto, ve Schomburg 2008), (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) kullanılmıştır. Sonuçlara dayanarak sonraki aşamalar için seçilen minimize modellerin kalıp LDH ile olan benzerliğini belirlemede kullanılacak olan RMSD (Root Mean Square Deviation) değeri PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3, Schrödinger, LLC, <https://pymol.org/2/>) programı ile belirlenmiştir.

2.1.3. Moleküler Dinamik Simülasyonu (MDS)

MDS, homoloji modellemesiyle elde edilen protein yapılarının zaman içindeki stabilitesini ve esnekliğini inceleyerek, modelin güvenilirliğini arttırabilmektedir. Bu nedenle alternatif kapalı ve açık yapıların oluşturulabilmesi için 100 ns MD simülasyonu NAMD programı ile gerçekleştirilmiştir (Phillips vd. 2020). Kapalı modeller için CHARMM-GUI servis sunucusundan (<http://www.charmm-gui.org/?doc=input/ligandrm>) ligand okuması seçeneğiyle Open Babel ile H eklenmiş ve mol2 formatına çevrilmiş olan koenzim (NAI) sisteme yüklenmiştir (Lee vd. 2016). PDB ve PSF dosyaları oluşturulan protein ve ligand dosyaları VMD1.9.3 programı ile bir araya getirilerek oluşturulan kompleks protein yapısı, TIP3P su içerisine konulmuştur (Humphrey, Dalke, ve Schulten 1996). Devamında sistem nötralize edilerek iyonik güç 150 mM NaCl olarak ayarlanmıştır. Kutu (Boxsize) hesaplaması yapılmış ve bu değerlere göre konfigürasyon dosyaları düzenlenmiştir. Simülasyon öncesinde yapı iki defa minimize (5000 adım) edilmiştir. İlk minimizasyonda proteine ve koenzime (solid) kısıtlama (constraintsclaling; 100kcal/mol/A²) getirilerek minimizasyon yapılırken ikinci minimizasyonda tüm sistem serbest bırakılarak minimize edilmiştir. MD simülasyonları üç temel basamakta gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla 250 ps NVT sisteminde 300 K kadar ısıtma (solid üzerinde 25 kcal/mol/A² kısıtlama ile) ve dengeleme, 275 ps NPT sisteminde 300 K ve 1 atm basınçta (Nose–Hoover Langevin piston (Hoover 1985)) gevşeme ve dengeleme gerçekleştirilmiştir. NPT gevşeme ve dengeleme aşamasında katı üzerindeki kısıtlama 10 kcal/mol/A² dan sıfıra kadar, her adım 25 ps olacak şekilde gerçekleşmiştir. En son olarak üretim (production) aşaması için 100 ns MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm MD simülasyonları CHARMM36 FF kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Vanommeslaeghe vd. 2009). MD simülasyon sonuçları VMD 1.9.3 programı ile görüntülenmiştir (Humphrey, Dalke, ve Schulten 1996). Ayrıca Root Mean Square Deviation (RMSD) ve Root Mean Square Fluctuation (RMSF) değerleri hesaplanmıştır.

2.1.4. Moleküler Dinamik Simülasyon Sonrası İlaçlanabilir Bölge Tayini

Yüksek verimli sanal tarama yapılacak BbigLDH homoloji modelleri üzerinde yer alan tahmini ilaçlanabilir cep tayini için DogSiteScorer (Andrea Volkamer vd. 2010)

(<http://proteinsplus.zbh.uni-hamburg.de/#dogsitesite>) sunucusukullanılmıştır. DogSiteScorer, protein yapılarındaki potansiyel bağlayıcı ceplerin ve alt ceplerin (subpockets) tanımlanmasını sağlayan otomatik cep algılama ve analiz aracı olarak kullanılmıştır. Tahmin edilen alt ceplerin boyut, şekil ve kimyasal özelliklerini tanımlayan global özellikler hesaplanmaktadır. Öncül cep bölgelerini alt-ceplere bölerek daha kolay hesaplama ile tahmini ilaçlanabilir bölgelerin isabetini kesinleştirmektedir.

2.1.5. Zenginleştirme Hesaplamaları (Enrichment Calculations)

Yanaştırma yöntemi, 1000 bileşikten oluşan bir sahte (decoy) set kullanılarak doğrulanmıştır (Friesner vd. 2004). BRENDA Enzim veritabanından (Chang vd. 2021) otuz dört bilinen LDH inhibitörü elde edilmiştir. LigPrep programı (“Schrödinger Release 2022-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.) kullanılarak 1000 sahte bileşik ve otuz dört aktif molekül hazırlanmış ve Glide XP modu ile varsayılan ayarlar kullanılarak moleküler yanaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. ROC, RIE, AUAC ve BEDROC parametreleri, Zenginleştirme Faktörü Hesaplaması yoluyla analiz edilmiştir.

2.1.6. Kontrol Moleküler Yanaştırma İşlemi

Bu metod, uygulanacak moleküler yanaştırma protokolünün hassasiyetini test etmek amacıyla gerçekleştirilmektedir. Bunun için Protein Data Bank (PDB) veritabanında kristal yapıları bilinen *P. falciparum* LDH proteinlerine ait PDB yapıları (1U4O, 1T25, 1T26, 1U4S, 1XIV) seçilmiştir. Kristal yapılarıdaki protein ve ligand birbirinden ayrılmıştır. Yanaştırma işlemi öncesi protein yapıları Schrödinger Protein Preparation Wizard (Madhavi Sastry vd. 2013; “Schrödinger Release 2022-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.) modülü kullanılarak moleküler yanaştırma işlemine hazırlanmıştır. Ligandlar LigPrep ile hazırlanmıştır. Protein ve ligandların protonasyonları pH 7.5 (+/- 0.5) için hesaplanmıştır. Yanaştırma yapılacak reseptör bölgesi koordinatları Schrödinger Receptor Grid Generation modülüyle belirlenmiştir. Glide programının (Halgren vd. 2004; “Schrödinger Release 2022-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.) XP modülüyle moleküler yanaştırma işlemi

ile moleküler yanaştırma gerçekleştirilmiştir. Moleküler yanaştırma sonrası elde edilen pozlar, kristal yapılarıyla süperimpoz yapılarak RMSD değerleri ve görüntüleri analiz edilmiştir.

2.1.7. BbigLDH ile Bilinen İnhibitörlerin Moleküler Yanaştırma İşlemi ve Orjinal Kristal Yapılarıyla Karşılaştırılması

Aktif inhibitörler ve PDB veri bankasında PfLDH kristal yapısına bağlı 9 inhibitör, Glide XP yöntemiyle BbigLDH yapısına yanaştırılmıştır. Bunun için öncelikle kapalı BbigLDH yapısı Protein Preparation Wizard (“Schrödinger Release 2022-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.) modülüyle PROPKA ile protonasyonda pH 7.5 olarak hesaplanmış ve standart ayarlarda OPLS4 kuvvet alanı seçilerek minimize edilmiştir. Ardından belirtilen 43 inhibitörün protonasyonu için Epik pH 7.5 (± 0.5) ayarlanarak LigPrep ile hazırlanmıştır (Shelley vd. 2007; “Schrödinger Release 2022-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.). Daha sonra BbigLDH reseptör bölgesinin oluşturulması için Receptor Grid Generation modülü kullanılmıştır. Açık model için BbigLDH için aktif bölgeye bağlanma gösterdiği konuma ait koordinatlar, kapalı model için hem NADH hem de pirüvat bölgesine ait koordinatlar kullanılarak reseptör grid oluşturulmuştur. XP yanaştırma için Glide modülü kullanılmıştır (“Schrödinger Release 2022-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.). Glide XP yanaştırma ayarlarında, protein katı (rigid) ve ligand esnek (flexible) olarak belirlenmiştir. Yanaştırma işlemi sonucunda oluşan pozlar incelenirken BbigLDH ile uygun bağlanma göstermelerine dikkat edilmiştir. Ayrıca kristal yapıları belli olan bazı PDB yapılarındaki orijinal ligandlar ile BbigLDH yapısına bağlanma gösteren aynı ligandlar arasında süperimpozisyon işlemiyle benzerlik miktarlarına bakılmıştır. Protein-protein superimpozisyonu için ve ligand bağlanma modlarının incelenmesi için PyMol kullanılmıştır. Buna ek olarak bilinen inhibitörlerin Glide XP skorlarını değerlendirerek Yapı-temelli sanal tarama (SBVS) analizinde kullanılacak bağlanma baraj (threshold) değeri belirlenmiştir.

2.1.8. Ligand Kütüphanelerinin Hazırlanması

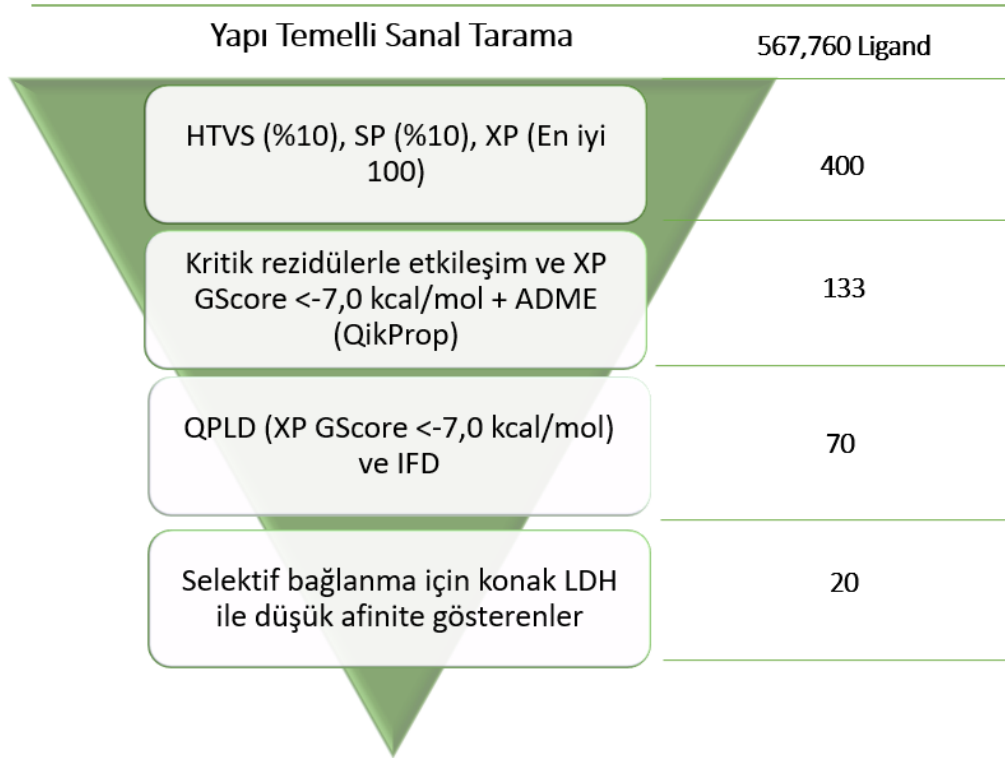
Enamine (<https://enamine.net/compound-libraries/diversity-libraries>), Otavachemicals (<https://www.otavachemicals.com/products/compound-libraries-for-hts/diversity-sets>) ve ChemDiv (<https://www.chemdiv.com/catalog/diversity-libraries/targeted-diversity-library/>) firmaları, Yüksek Verimli Tarama (High-Throughput Screening (HTS)) uygulamaları için kullanmak üzere hazır sunulan çeşitlilik (diversity) kütüphaneleri bulunmaktadır. Başarılı olarak kullanılan ilaçlara farklı özellikler eklenerek hazırlanan ligand kütüphaneleri yapı-temelli sanal tarama metodu için seçilmiştir (Tablo 2.1). Bahsedilen kütüphanelerde yer alan liganlar yapı-temelli sanal tarama işlemi için ligand protonasyonu Epik (pH 7.5 (± 0.5)) hesaplamasıyla LigPrep ile gerçekleştirilmiştir (“Schrödinger Release 2022-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.). Kütüphanelerde çakışan ligandlar elenmiştir. Böylece, ligand kütüphanesi (567,760 ligand) hazırlanmıştır.

Tablo 2.1. Yapı-temelli sanal tarama metodunda kullanılacak olan ligand kütüphaneleri ve içerikleri.

Enamine Çeşitlilik Kütüphaneleri		
	Hit Locator Library HLL-460	460,320 ligand
	Discovery Diversity Set DDS-50	50,240 ligand
	Discovery Diversity Set DDS-10	10,240 ligand
Otavachemicals Çeşitlilik Kütüphaneleri		
	PrimScreen1	1,000 ligand
	PrimScreen2	2,000 ligand
	PrimScreen3	3,000 ligand
	PrimScreen5	5,000 ligand
	PrimScreen10	10,000 ligand
ChemDiv Çeşitlilik Kütüphanesi		
	Targeted diversity library	39,646 ligand
Toplam		567,760 ligand

2.1.9. Yapı-Temelli Sanal Tarama (Structure Based Virtual Screening-SBVS) ve ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve boşaltım) Analizi

Tez çalışması kapsamında modellenen BbigLDH açık ve kapalı modeller ve MD simülasyonu sonrası elde edilen BbigLDH açık ve kapalı modeller olmak üzere dört model PDB yapısı Protein Preparation Wizard ile protonasyonu PROPKA (pH 7.5) ile hesaplanmış ve Receptor Grid Generation modülleri kullanılarak moleküler yanaştırma işlemine hazırlanmıştır (“Schrödinger Release 2022-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.). Moleküler yanaştırma işleminin başlatılması için Virtual Screening Workflow (VSW) modülü kullanılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hit moleküllerin tespit edilmesi için kullanılan iş akışı.

Hazırlanan ligand kütüphanesinin, protein reseptör grid bölgesine yanaştırılması aşamasında; HTVS ile elde edilen en iyi sonuçların %10'unun seçilmesinin ardından SP ile yanaştırmaların sonucunda en iyilerin %10'u ve son olarak XP yanaştırması sonucunda

en iyi 100 ligand elde edilmiştir. XP skoruna göre sıralanan yapıların bir kısmı katalitik rezidü ve kritik öneme sahip olduğu bilinen (R87, R98(109), I128, N130, R161(171), H185(195), S239, A240) rezidülerle etkileşimlerine bakılmış ve rezidülerle etkileşime girmeyen veya reseptör cebine oturmayan ligandlar da elenmiştir. Ayrıca, bilinen LDH inhibitörlerin bağlanma skoruna göre belirlenen baraj (moleküler yanaştırma skoru -7.0 kcal/mol) değerinde ve daha düşük olan değerlerin dışındakiler elenmiştir. Devamında Schrödinger QikProp modülü kullanılarak ADME özellikleri belirlenmiştir (“Schrödinger Release 2022-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022-4”, t.y.). QikProp manuelinde belirtilen değerlere uygun olarak ilaç olma özelliğine uygun olduğu düşünülen ligandlar belirlenmiştir.

2.1.10. Kuantum Mekanik Polarize Ligand Yanaştırması (QM-Polarized Ligand Docking)

Kuantum Mekanik Polarize Ligand Yanaştırması (“Schrödinger Release 2022-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.), ligandların Glide ile kenetlendiği, ardından protein tarafından indüklenen ligand üzerindeki yüklerin QSite (QM/MM programı) (Halgren vd. 2004) ile kuantum-mekanik olarak hesaplandığı ve ligandların bu yüklerle yeniden yerleştirildiği bir işlemdir. Reseptör Grid Generation işleminde elde edilen grid dosyası burada da kullanılmıştır. Ardından başlangıç moleküler yanaştırma (Initial docking) işlemi için XP metodu, QM charges için Gaz fazı (In gas phase) ve Jaguar modülü seçilerek QM level için kesin (accurate) değeri seçilmiştir. Yeniden moleküler yanaştırma (Re-docking) işlemi için XP metodu seçilmiştir. Son eleme (Final selection) için de Emodel değeri belirlenmiştir. ADME değerlerine göre elenen ligandlar QM-polarize ligand yöntemiyle oluşan pozlar arasından, en düşük Emodel değerine sahip olanlar seçilmiştir. Ligandların aktif bölge rezidüleriyle etkileşmiş olduğuna dikkat edilmiştir. Ardından eleme yapılan listede, XP Gscore değerine göre en düşüktenden-yükseğe doğru sıralama yapılmıştır. Değerlerden -7.0 kcal/mol ve daha düşük olan ligandlar belirlenmiştir.

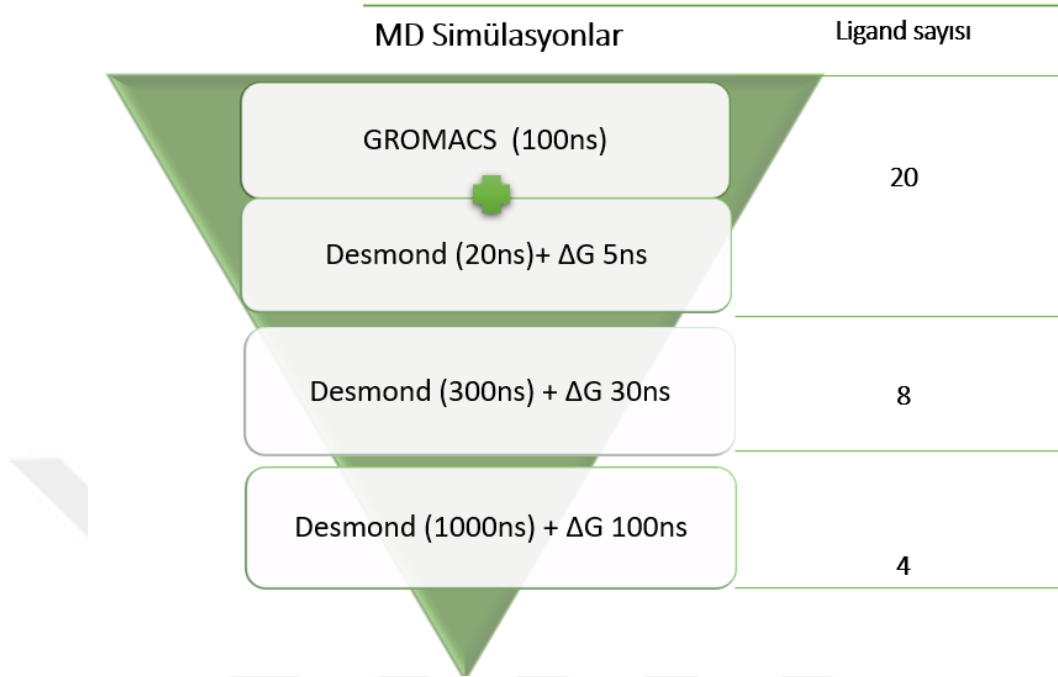
2.1.11. İndüklenmiş Uyum Yanaştırması (Induced Fit Docking (IFD)) ve Konak LDH'leri ile Moleküler Yanaştırması

IFD yönteminde (Sherman vd. 2006), Prime (“Schrödinger Release 2022-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022”, t.y.) reseptörde yeniden düzenleme yaparak ligandın rahatlamış (relax) bir reseptöre Glide ile yeniden yanaştırılmasını sağlamaktadır. Metodun uygulamasında aktif bölge rezidüleri seçilerek moleküler yanaştırma yapılacak reseptör grid oluşturulmuştur. Prime, 5Å aralığına kadar mesafede bulunan residüler için yeniden düzenleme yapılmıştır. Glide yeniden düzenlenmiş olan relaks reseptöre yeniden yanaştırma (redocking) XP metoduyla uygulanmıştır. Sonuçlarda IFD skoru en düşük olan pozlar seçilmiştir.

IFD sonrasında seçilen ligandlar, *B. taurus* LDH yapılarına UNIPROT ID: (LDHA - P19858, LDHB - Q5E9B1, ve LDHAL6B - Q3T056) karşı Glide XP moleküler yerleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Konak (Host) LDH yapıları, AlphaFold 2.0 veritabanından elde edilmiştir (Jumper vd. 2021). Konak LDH yapılarına düşük afinite sergileyen bileşikler, seçici inhibisyon için potansiyel adaylar olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.1).

2.1.12. Moleküler Dinamik Simülasyonları ve Bağlanma Serbest Enerjisi Hesaplamaları (MM/GBSA)

Yapı-temelli sanal tarama işleminin ardından belirlenen 20 protein-ligand kompleksinin moleküler dinamik simülasyonları, ligand stabilitesini değerlendirmek ve bileşiklerin bağlanma enerjilerini hesaplamak için Desmond (“Schrödinger Release 2022-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2022”, t.y.) ve GROMACS (Van Der Spoel vd. 2005) moleküler dinamik programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Moleküler dinamik simülasyonları ve bağlanma serbest enerji hesaplamaları için iş akışı.

Kurulan sistemde, orthorhombik bir kutu içinde TIP3P modeli su molekülleri bulunmaktadır. Nötral bir ortam sağlamak amacıyla sisteme 150 mM NaCl iyonları eklenmiştir. NVT (Sabit Hacim-Sabit Sıcaklık), NPT (Sabit Basınç-Sabit Sıcaklık) ve Üretim (Production) aşamasından önce, sistemi minimize etmek ve rahatlatmak için Desmond tarafından sağlanan varsayılan minimizasyon protokolü ile 100 pikosaniye süren bir minimizasyon adımı gerçekleştirilmiştir. Ardından, ligand seçim sürecinde farklı sürelerde MDS (20, 300 veya 1000 ns) gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). Tüm üretim çalışmaları 300 K sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınçta gerçekleştirilmiştir. Entegrasyon zaman adımı 2 femtosaniye olarak belirlenmiştir. Sıcaklık ve basınç, sırasıyla Nose-Hoover termostadı (Hoover 1985) ve Martyna-Tobias-Klein (MTK) (Martyna, Tobias, ve Klein 1994) barostatı kullanılarak kontrol edilmiştir. Kısa menzilli kuvvetleri verimli bir şekilde hesaplamak için bağlı olmayan etkileşimler için 9 Å'lık bir kesme mesafesi (cut-off distance) uygulanmıştır. Protein-ligand etkileşimleri “simulation interaction diagram” modülü ile analiz edilmiştir. Bağlanma serbest enerjilerini (ΔG) hesaplamak için Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) yöntemi kullanılmıştır. Thermal_mmgbsa.py betiği ve Prime programı (Jacobson vd. 2002) ile aşağıdaki formüle göre MM/GBSA ΔG bağlanma serbest enerjisi hesaplanmıştır (Şekil 2.2).

$$\text{MM/GBSA } \Delta G_{\text{Bağlanma}} = E_{\text{Kompleks}} - (E_{\text{Reseptör}} + E_{\text{Ligand}})$$

Aynı parametrelerin uygulandığı GROMACS kullanılarak eşzamanlı olarak 100 ns MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Minimizasyon, maksimum kuvvet <10.0 kJ/mol olduğunda durdurulmuş ve 100 pikosaniye süren minimizasyon adımı gerçekleştirilmiştir. Uzun menzilli elektrostatik etkileşimi hesaplamak için Particle Mesh Ewald yöntemi uygulanmış ve simülasyon sisteminin sıcaklığını kontrol etmek için modifiye Berendsen termostadı (V-rescale) kullanılmıştır. NVT, NPT dengeleme ve üretim aşamasında, basınç eşleştirmesi (1 atm) için C-rescale ve simülasyon sisteminin sıcaklığını kontrol etmek için ise V-rescale kullanılmıştır. *Gmx_rms* ve *gmx_rmf* modülleriyle RMSD ve RMSF analizleri yapılmıştır.

2.2. In vitro Yöntemler için Cihazlar, Kimyasallar & Çözeltiler

2.2.1. Cihazlar

	Cihaz	Marka-model
1	Sonikatör	Bandelin- Sonopuls HD4050
2	Çalkalamalı karıştırıcı	LABNET
3	Mikrodalga Fırın	BEKO
4	UV Spektrofotometresi	Shimadzu 1800 Serral
5	Hassas terazi	Adventurer-Pro Ohaus
6	Spektrometrik mikropate okuyucu	BIOTEK Epoch ve Thermo scientific multiskan go spektrofotometer
7	Etüv	BINDER BD 53 #05-89212
8	Soğutmalı santrifüj	HERMLE Z326K
9	Isıtmalı manyetik karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA
10	Vorteks	BIOSAN Vortex
11	Mikrosantrifüj	Herolab Microcen
12	Elektroforez sistemi	BIORAD PowerPac Basic
13	Elektroforez jel tankı	BIORAD Mini-PROTEAN Tetra System
14	Çalkalamalı inkübatör	N-BIOTEK NB-205
15	pH metre	METTLER TOLEDO Seven Compact S210
16	Agaroz Jel Kaseti ve PCR Cihazı	PEQLAB
17	Güç ünitesi	BIRO-RAD PAC 300
18	+4°C ve -20°C buz dolabı	BEKO
19	-80 °C buz dolabı	Arctiko Laboratuvar tipi dondurucu

2.2.2. Kitler

1. Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System
2. HisTALON™ Gravity Column Purification Kit
3. Promega Wizard SV Gel and PCR clean-up System
4. Thermo Scientific aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System
KIT3- C-Terminal Histaq

2.2.3. Kimyasallar

1. Ampresco PBS Tablets; 100 mL
2. BIO-RAD 30% Acrylmaide/Bis Solution 37:5:1 Cat#1610158
3. BIO-RAD Quick Start™ Bradford Dye Reagent 1L Cat# 500-0205
4. Biolife Agar Bios Special LL (Agar Bateriological) Lot# 39X013
5. Biolife Tryptone Lot# 21P010
6. Biolife Yeast Extract Lot# 17P019
7. EMBOY Hidrojen Peroksit (H₂O₂)
8. Fisher Bioreagents Imidazole Lot# 183503
9. Fisher Scientific (Fisher Bioreagents) Glycine Lot# 152049
10. Fisher Scientific Ammonium Persulfate (APS) Lot# 154039
11. Fisher Scientific Brilliant Blue G-250 Lot# 138377
12. Fisher Scientific Ethylenediamine Tetraacetic Acid Lot# 154060
13. Fisher Scientific Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous Lot# 176692
14. Fisher Scientific Sodium Phosphate Monobasic Monohydrate Lot# 171695
15. Thermo Scientific Gene Ruler DNA Marker Ladder Mix 0.1 µg/ µL, 50 µL
Lot#00358930 #SM0333
16. ISOLAB Acetic Acid (Glacial) Lot# LR0124905AHW
17. ISOLAB Ethanol Absolut Lot# LR0090612AGQ
18. ISOLAB Methanol Lot# LR0900607AGQ
19. Invitrogen UltraPure Acrylamide Lot# 0525C506
20. Invitrogen UltraPure N’N’-Methylenebisacrylamide Lot# 081403680
21. MERCK Albumin fraction V (bovine serum) for biochemistry Lot K42179118 128
22. MERCK Ethanol Lot# K36413883 631
23. Promega IPTG Lot# 0000121903; REF. V395A; +2°C- +10°C; 5g
24. Riedel-de Haen 30719 Salzsare min. 37% 2.5L (37% HCl); d= 1.19kg/L
25. SIGMA-ALDRICH Acid Washed with Hydrochloric Acid
26. SIGMA-ALDRICH Agaroza (Multi Purpose Agarose LOT#14241000)

27. SIGMA-ALDRICH Glycerol Solution Lot# SZBG119AV
28. SIGMA-ALDRICH Glycine Lot# SZBB096AV
29. SIGMA-ALDRICH Sodium Chloride Lot# SZBF2750V
30. Sigma Life Science Trizma Base Lot# 051M54221V
31. Sigma Life Science N,N,N',N''-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
32. SOC Outgrowth Medium #B90205
33. Thermo Scientific GeneRuler 100bp DNA Ladder Lot#0059568
34. Thermo Scientific Page Ruler Prestrained Protein Ladder 10 to 180 kDa (Catalog no. 26616, 2 x 250 µl)
35. Sigma Life Sciences Trisma Base [1kg] Batch#088KS4051
36. ROCHE, NADH Grade II, disodium salt 1 g 10128023001
37. RIEDEL Pyruvic Acid Sodium Salt For Biochemistry SK.S.P2256-25G
38. SIGMA L3771 Sodium dodecyl sulfate 100 g
39. Thermo Scientific DTT (DL-Dithiothreitol; Clelands reagent) R0862 25g

2.2.4. Hazırlanan çözeltiler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR/PCR) Reaksiyonu:

- dH₂O – 39.5 µL
- Pfu Buffer – 10 µL
- dNTPmix – 5 µL
- Forward Primer – 1.25 µL
- Reverse Primer – 1.25 µL
- Kalıp DNA – 1 µL
- Pfu DNA Polimeraz – 0.5 µL
- DMSO – 1.5 µL

Koloni PCR:

- dH₂O – 13.5 µL

- Pfu Buffer – 2.5 μ L
- dNTPmix – 2.5 μ L
- Forward Primer – 0.625 μ L
- Reverse Primer – 0.625 μ L
- Kalıp DNA – 5 μ L
- Pfu DNA Polimeraz – 0.25 μ L

dNTPmix (2mM, 100 μ L):

- 10mM dATP – 20 μ L
- 10mM dTTP - 20 μ L
- 10mM dGTP - 20 μ L
- 10mM dCTP - 20 μ L
- dH₂O - 20 μ L

Agaroz Jel Elektroforezi

%1'lik Agaroz Elektroforez Jeli (50 mL):

- Agaroz) – 0.5 g
- 1X TAE– 50 mL

50X TAE (Tris Asetat Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (~30 mL):

- Trisma Base - 24.2 g
 - Asetik Asit - 5.71 mL
 - 0.5M EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) - 20 mL
 - 1x'e seyreltmek için; 6 mL'si 300 mL'ye tamamlanmıştır.
- (Tank Tamponu olarak 250 mL 1X TAE kullanılmıştır.)

LB Broth (100 mL):

- Bacto Yeast – 0.5 g
- Bacto Tryptone – 1 g
- NaCl – 1 g

CaCl₂:

- CaCl₂.2H₂O (100mM) – 1.4702 g
- MgCl₂.6H₂O (5mM) – 0.10165 g
- Tris HCL (5mM; pH 7.6) – 500 µL

Otoklavlanır.

6M HCL (40 mL):

*Riedel-de Haen 30719 Salzsare min. 37% 2.5L (37% HCl)

$$d = 1,19 \text{ kg/L}$$

$$M = m/mA/V = d/mA = 32.6 \text{ M}$$

$$32.6 \times 0.37 = \underline{12.06 \text{ M}}$$

2M Mg+2 (10 mL):

- MgCl₂.6H₂O – 2.033 g
- MgSO₄.7H₂O – 2.465 g

*Önce 5 mL’de çözülür sonra son hacme tamamlanır.

2M Glikoz (10 mL):

- Glikoz – 3.6 g

*Önce 5 mL’de çözülür sonra son hacme tamamlanır.

SOC Medium (100 mL):

- Bacto Tryptone – 2.0 g
- Bacto Yeast – 0.5 g
- 1M NaCl – 1 mL
- 1M KCl – 0.25 mL
- 2M Glikoz (Filtrelenmiş) – 1 mL
- 2M Mg⁺² stok (Filtrelenmiş) – 1 mL

Glikoz Kompetan Hücre Stoğu (%15 gliserol):

- 500 µL %30 Gliserol (otoklavlanmış distile su ile hazırlanıp şırınga ile filtrelendir)
- + 500 µl aktif hücre kültürü (1 gün önce taze pasaj olmalı) karıştırılmıştır.

(Taze kültür için: 2000 rpm de 5 dk. Kültür santrifüj edildi. Pellete taze sıvı LB (Amfisilinsiz) eklendi (500µl))

-80°C’de saklanmıştır.

LIC Reaksiyonu:

- 5X LIC Tamponu – 2 µL
- Saflaştırılmış PZR Ürünü:
 - BbigLDH – 0.9 µL (62.98 ng)
- T4 DNA Polimeraz – 1 µL
- Nükleazsız Su – 10 µL toplam hacme göre kullanılmıştır.

SDS-PAGE Lizis Tamponu (1lt):

- 50Mm NaH₂PO₄: - 6.90 g
- 300mM NaCl: - 17.54 g
- 10mM İmidazol: - 0.68 g (pH NaOH ile 8’e ayarlandı)

1.5 M TrisHCl (500 ml, pH 8.8):

- Trisma base: 90.9 g
- %37’lik HCl ile pH 8.8’e dengelenir.

Amonyum persulfat (APS) (0.5 mL):

- APS: 50 mg distile su ile çözülür.

%12’lik Ayırma Jeli (10 mL):

- dH₂O: 3.35 mL

- 1.5M TrisHCl (pH 8.8): 2.5 mL
- %10 SDS: 100 µL
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid: 4 mL
- %10 APS (Amonyum Persülfat): 75 µL
- TEMED (Tetraetilmetiletilendiamin): 15 µL

0.5 M TrisHCl (500 ml, pH 6.8)

- Trisma base: 30.3 g
- %37'lik HCl ile pH 6.8'e ayarlanır.

%4'lük Yükleme Jeli (5 mL):

- %30 Akrilamid/Bisakrilamid – 0.65 mL
- 0.5M TrisHCl pH 6.8 – 1.25 mL
- %10 SDS – 50 µL
- dH₂O – 3.05 mL
- TEMED - 6 µL
- %10 APS – 30 µL

5X TAE SDS-PAGE Tank Buffer (1lt):

- (1X'e seyreltilerek kullanıldı) Trizma base: 15 g
- Glisin: 72 g
- %0.1 SDS: 5 g

SDS-PAGE Protein Boyama Çözeltisi (100 mL):

- %0.1 Coomasi Brilliant Blue: 0.1 g
- %40 Metanol: 40 mL
- %10 Asetik Asit: 10 mL

SDS-PAGE Boya Uzaklaştırıcı (1lt):

- %5 Metanol: 50 mL
- %7 Asetik Asit: 70 mL

SAB/Sample Application Buffer/Örnek Uygulama Tamponu (30 mL):

- %10 SDS (250 ml): 25 g hazırlanır. 6 mL alınır.
- 0.5 M Tris-HCL (0.5 L, 6.8 pH): 3.75 mL
- %50 Gliserol: 15 mL
- %1.0 Bromofenol Mavisi (10 ml): 100 mg hazırlanır ve 0.3 mL alınır.

30 mL'ye distile su ile tamamlanıp 950 µL SAB miktarında alikotlanır. +4°C'de saklanır.

Kullanımın hemen öncesinde %5'lik Beta merkaptotanol taze 50 µL ekle. (950 µL SAB'a)

Kromatografi Dengeleyici Tampon (200 mL):

- 50 mM NaH₂PO₄: 1.38 g
- 300 mM NaCl: 3.5 g
- 10 mM İmidazol: 0.136 g (pH HCL/NaOH ile 8'e ayarlanır.)

Kromatografi Yıkama Tamponu (100 mL):

- 50 mM NaH₂PO₄: 0.69 g [NaH₂PO₄.H₂O (MW 137.99 g/mol)
- 300 mM NaCl: 1.754 g
- 20 mM İmidazol: 0.136 g (pH HCL/NaOH ile 8'e ayarlanır.)

Kromatografi Elüsyon Tamponu (100 mL):

- 50 mM NaH₂PO₄: 0.69 g [NaH₂PO₄.H₂O (MW 137.99 g/mol)
- 300 mM NaCl: 1.754 g
- 150 mM İmidazol: 1.02 g (pH HCL/NaOH ile 8'e ayarlanır.)

Bradford Çözeltileri (1 mL):

- 20 µL 0.1 mg/mL BSA + 780 µL dH₂O + 200 µL Bradford Boyası

- 40 μ L 0.1 mg/mL BSA + 780 μ L dH₂O + 200 μ L Bradford Boyası
- 60 μ L 0.1 mg/mL BSA + 780 μ L dH₂O + 200 μ L Bradford Boyası
- 80 μ L 0.1 mg/mL BSA + 780 μ L dH₂O + 200 μ L Bradford Boyası
- 2 μ L BbigLDH + 798 μ L dH₂O + 200 μ L Bradford Boyası

Tris/KCl Tamponu (pH: 7.5):

- Trizma base (55 mM) – 3.028 g
- KCl (50 M) – 1.863 g

2 mM NADH:

- 0.00144 g NADH / 1.020 mL dH₂O

100 mM Pirüvat:

- 0.0119 g Pirüvat / 1.081 μ L dH₂O

Aktivite Tepkime Solüsyonu:

- 20 μ L Pirüvat (10 mM-Tepkime son konsantrasyonu)
- 20 μ L NADH (200 μ M-Tepkime son konsantrasyonu)
- 150 μ L Tris/KCl Tamponu
- 10 μ L BbigLDH

2.3. In vitro Yöntemler

2.3.1. BbigLDH Geninin *E. coli* (BL21 (DE3))’ye Ligasyon Bağımsız Klonlama (LIC) Yöntemiyle Klonlanması

2.3.1.1. BbigLDH Geninin Sentezlenmesi

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24563177>) veribankasında yer alan (gene ID: 24563177) *B. bigemina* Laktat dehidrogenaz genine ait sadece ekzon dizilerini içeren *B. bigemina* lactate dehydrogenase (BbigLDH), putative partial mRNA (XM_012911368, 969 bç) dizisi fasta formatında kaydedilmiştir. Genin ifadesi sonucunda, Laktat dehidrogenaz, putative [*Babesia bigemina*] (XP_012766822.1, 322 aa.) proteini ifade edilmektedir. Proteinin laboratuvar ortamında elde edilmesi için XM_012911368.1 numaralı gen dizisi, Triogen Biyoteknoloji firması (TÜRKİYE) tarafından sentetik olarak pEX-A128 plazmitinde sentezlettirilmiştir (3.5 µg).

2.3.1.2. Primer Tasarımı ve Sentezi

Plazmide aktarılmış olan BbigLDH sentetik geninin LIC vektörüne (pLATE31) aktarılabilmesi için ön aşama olan PZR amplifikasyonu gerekmektedir. PZR için gene özgü olacak şekilde tasarlanmış Forward (F) ve Reverse (R) primerler kullanılmıştır (20 pmol/µl). Tez çalışmasında, BbigLDH gen dizisinin tamamının ekspresyonunu gerçekleştirmemize yardımcı primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımı manuel olarak yapılmıştır. Gen dizisinin başından seçilen nükleotidler F primeri için değiştirilmeden birebir aynı alınmışken; R primeri genin sonundaki dizilerden seçilen nükleotidler “reverse komplement” olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu yöntemle primerler 5’-3’ yönündeki dizisi elde edilmiştir. Genin klonlanmasında kullanılan, “Thermo Scientific aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System KIT3 (C-terminal His-tag)” LIC kitine ait manuelde yer alan F ve R primerlerinin 5’ ucuna eklenmesi gereken diziler de primerlere eklenmiştir. Primerlere eklenen bu diziler pLATE31 vektörüne BbigLDH geninin yapışmasını sağlamaktadır. Yani ligasyon işlemine

gerek olmadan eklenen bu yapışkan uçlar sayesinde genin plazmide aktarımı gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.3).

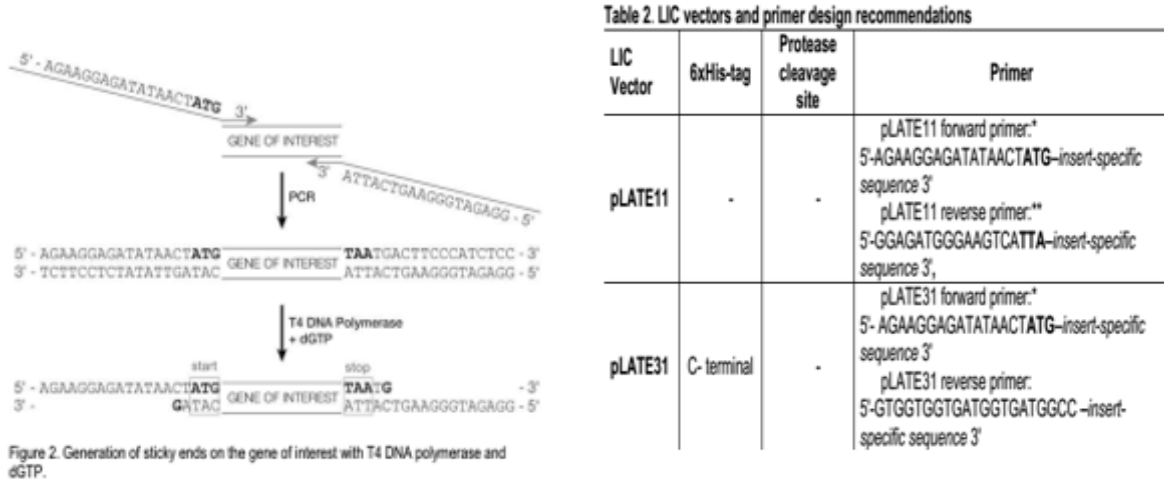


Table 2. LIC vectors and primer design recommendations

LIC Vector	6xHis-tag	Protease cleavage site	Primer
pLATE11	-	-	pLATE11 forward primer:* 5'-AGAAGGAGATATAACTATG-insert-specific sequence 3' pLATE11 reverse primer:** 5'-GGAGATGGGAAGTCATTA-insert-specific sequence 3'
pLATE31	C-terminal	-	pLATE31 forward primer:* 5'-AGAAGGAGATATAACTATG-insert-specific sequence 3' pLATE31 reverse primer: 5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCC-insert-specific sequence 3'

Şekil 2.3. pLATE31 vektörüne özgü yapışkan uçların detaylarına ait manuel de belirtilen gösterimler.

Tablo 2.2. BbigLDH genine yönelik tasarlanan primerler ve özellikleri.

	Yapışkan uç dizisi + insert gen dizisi	Uzunluk	Tm(°C)*	C+G%*
F primer	5'-AGAAGGAGATATAACTATG GCGCCAGTAGTCAGG -3'	34	64.4	47.1
R primer	5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCC GCGCATGAGAGCCTC -3'	36	72.4	63.9

*İlgili hesaplamalar belirtilen siteden elde edilmiştir; <http://insilico.ehu.es/tm.php?formula=basic>

F primeri tasarlanırken seçilen gen dizisinin başında başlangıç kodonu olan (ATG), R primerinde durdurma kodonu olan (TAG) kullanılmamıştır

Tasarlanan primerler Triogen (TÜRKİYE) firması aracılığıyla Eurofins'e sentezlettirilmiştir. Elde edilen sentetik gen ve primerlerle bir sonraki aşama olan PZR işlemine geçilmiştir.

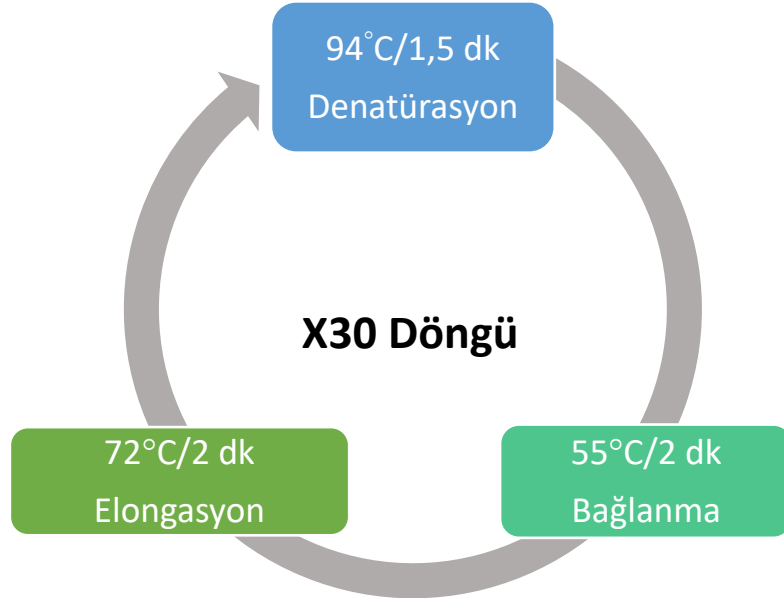
2.3.1.3. PZR Yöntemi ile BbigLDH Gen Amplifikasyonu

Ekspresyon vektörüne alt klonlanma işlemi öncesi BbigLDH genin amplifikasyonu için PZR yöntemi kullanılmıştır (Tablo 2.3). Denatürasyon, bağlanma ve

elagasyon aşamalarıyla şekil 2.4'te belirtildiği gibi 30 dđngü olacak şekilde geręekleřtirilmiřtir (şekil 2.4).

Tablo 2.3. Gen amplifikasyonunda kullanılan PZR ürünleri ve miktarları.

Ürün	Miktar (µl)
Pfu Buffer	10
2 mM dNTP mix	5
20 mM F Primer	1.25
20 mM R Primer	1.25
Kalıp DNA	1
Pfu DNA Polimeraz	0.5
dH ₂ O	29.5
DMSO	1.5

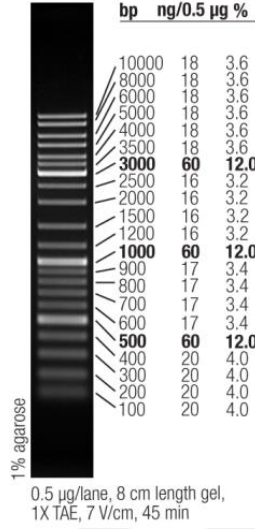


şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu aşamalarına ait şema akışı.

2.3.1.4. Agaroş Jel Elektroferezi ile Doğrulama İşlemi

Jel karışımı ısıtılarak jel kalıbına dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. PZR ile amplifiye edilen BbigLDH geni (1 µl), 2 µl DNA boyası ve 7 µl distile su ile boyanmış ve gen ile 3 µl DNA Marker/Ladder (şekil 2.5) kuyulara sırasıyla yüklenmiştir. Tank tamponu

olarak 250 ml 1 X TAE kullanılmıştır. Örnekler %1'lik agaroz jelde 45 mA / 1 saat yürütülmüştür.



Şekil 2.5. Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan Generuler DNA Marker Ladder Mix DNA standartının referans baz uzunluk/büyükük bantları.

2.3.1.5. PZR Ürün Saflaştırılması

PZR yöntemi kullanılarak gen amplifikasyonu yapılmasının ardından BbigLDH geninin devam eden çalışmalarda kullanılabilmesi için beraberinde bulunan PZR ürünlerinden arındırılması gerekmektedir. PZR ürün saflaştırma işleminde Promega Wizard SV Gel and PCR clean-up System kiti kullanılmıştır. Uygulanan yöntemde jelden ekstrasyon yapılmayıp sıvı örnek kullanılmıştır. Öncelikle, SV minikolon tüpüne aktarılan sıvı örnek üzerine “Membran Bağlayıcı Çözeltilisi” PZR ürün miktarınca eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakikalık inhibisyona bırakılmıştır. Ardından 16,000 g/1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu yöntemde tüm santrifüj işlemleri oda sıcaklığında yapılmıştır. Santrifüj sonrası süzöntü atılıp minikolona 700 µl (etonol ekli) “Membran Yıkama Solüsyonu” eklenmiştir. Devamında 16,000 g/1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpteki süzöntü atıldıktan sonra 500 µl “Membran Yıkama Solüsyonu” eklenmiştir. Örnek 16,000 g/5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Minikolon yeni bir ependorf tüpüne yerleştirilmiş ve 30 µl nükleazsız su eklenmiştir. 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonun ardından

örnekteki etanolün uzaklaştırılması amacıyla ependorf kapağı açık olacak şekilde bekletilmiştir. Örnek 16,000 g/1 dakika santrifüj edilmiştir. Yöntemin sonunda 30 µl nükleazsız suyun içinde çözünmüş halde PZR ürünü DNA toplama tüpüne aktarılmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünü -20°C’de saklanmıştır.

2.3.1.6. PZR Ürün Miktarının Hesaplanması

Kullanılan LIC kitine ait manuelde de belirtildiği üzere PZR ürününe ait baz uzunluğu için önerilen nanogram miktarında tepkime için ideal 0.1 pmol DNA (PZR ürünü) hazırlanmıştır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. LIC reaksiyonu için önerilen PZR ürün miktarları.

PZR ürün uzunluğu (bç)	LIC reaksiyonu için optimal PZR ürün miktarı (0.1 pmol DNA)
100	6.5 ng
300	19.5 ng
500	32.5 ng
1000	65 ng
2000	130 ng

Nanodrop ölçümünde uygun DNA konsantrasyonu hesaplanırken (pmol/µl):

$$\text{Baz çifti sayısı} \times 0.65 = \text{ng/pmol} \quad \text{(Denklem 1)}$$

formülü kullanılmaktadır. Metotta, 1000 bç DNA fragmentinin 65 ng (0.1 pmol) değeri baz alınmıştır. Jeldeki DNA örneğinin parlaklığına bakılarak 70 ng (1 µl’de) olduğu düşünülerek 0.1 pmol DNA örneği için, 0.9 µl (969 bç için 62.98 ng) örnek alınması gerektiği hesaplanmıştır.

2.3.1.7. BbigLDH Geninin pLATE31 Vektörüne Ligasyon Bağımsız Alt-klonlanması

BbigLDH geni, pLATE31 ekspresyon vektörüne ligaz ve restriksiyon enzimleri kullanılmadan Thermo Scientific aLICator Ligation Independent Cloning and

Expression System KIT-3 kullanılarak klonlanmıştır. pLATE31 ekspresyon vektörüne özel primerler kit manuelinde belirtildiği gibi tasarlanmıştır. Safılaştırılan PZR ürünü, pLATE31 vektörüne T4 DNA Polimeraz kullanılarak klonlanmıştır (Nural vd. 2016). PZR ürünü DNA'da 0.9 µl (62.98 ng), 2 µl 5X LIC Tamponu, 1 µl T4 DNA Polimeraz ve nükleazsız su ile totalde 10 µl'ye tamamlanmasıyla hazırlanan karışım (mix) 3-5 kez vortekslenmiş ve ardından mini santrifüjleme işlemiyle 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 0.6 µl EDTA ile ortamdaki reaksiyon durdurulmuştur. Ligasyon işlemi tamamlanan vektör örnekleri -20°C'de saklanmıştır.

2.3.1.8. Kompetan *Escherichia coli* Hücre Eldesi

E. coli kompetan hücreleri vektör transformasyonu için üretilmiştir. *E. coli* (BL21 (DE3)) hücre kültüründen steril kürdanla alınarak 5 ml LB Broth'a eklenmiştir. 37°C'de 180 rpm'de çalkalama inkübatöründe inkübe edilmiş ve 4°C'ye kaldırılmıştır. Bu kültürün 500 µl'si 50 ml sıvı besiyerine aktarılmıştır. 37°C'de 180 rpm'de çalkalama inkübatöründe OD₆₀₀ 0.3-4 absorbans değerine ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Ardından 5000 rpm'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelletler 25 ml CaCl₂'de çözündürülmüş ve 5000 rpm'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pelletler 1 ml CaCl₂'de çözündürülmüştür. Ardından 2 saat buzda bekletilmiştir. Kompetan hücreler transformasyona hazır hale gelmiştir.

2.3.1.9. Rekombinant Gen İçeren pLATE31 Vektörünün *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu

BbigLDH geninin pLATE31 vektörüne alt klonlanmasının devamında *E. coli* BL21 (DE3) kompetan hücrelerine transformasyon yöntemine geçilmiştir. Ligasyon ürünü (12 µl) kompetan hücreye (200 µl) ekleyerek nazikçe çalkalandıktan sonra 30 dk. buzda bekletilmiştir. Örnekler titretilmeden 42°C'de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakılmıştır (porlar açılıp plazmid içeri girmektedir). Ardından 2 dk. buzda bekletilerek (porlar kapanmaktadır) 800 µl SOC medium ilave edilmiştir. Örnek solüsyon 30 dakika boyunca 37°C'de inkübasyon yapılarak 4-6 kez ters yüz edilmiştir. LB agar petrilere ekim yapılmıştır. Koloni PZR öncesi hazırlanması için 37°C'de 180 rpm'de bir gece boyunca

inkübe edilmiştir. Transformasyon işleminin kontrolü koloni PZR, agaroz jel elektroforezi ve DNA dizileme analizi yöntemleriyle yapılmıştır.

2.3.1.10. Rekombinant klonların analizi için Koloni PZR

Transformasyon sonrası oluşturulan konstrüklere BbigLDH geninin entegrasyonunun anlaşılması için elde edilen kolonilerin DNA izolatlarının kalıp olarak kullanıldığı koloni PZR yönteminin yapılması gerekmektedir. Bu yöntemde BbigLDH genine özgün tasarlanmış olan primerler kullanılmıştır. BbigLDH geninin transformasyonu ile elde edilen *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri 5 ml LB sıvı besi yerine ekilip 37°C’de bir gece boyunca inkübe edildikten sonra kültürden 100 µl 1.5 ml’lik ependorf tüpüne alınmıştır. Ardından 13.000 rpm/7 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı 100 µl dH₂O’da çözündürülmüş ve 95°C’de 10 dakika bekletilmiştir. Son olarak 13.000 rpm/15 dakika boyunca santrifüj ile DNA süpernatant kısmında elde edilmiştir.

Tablo 2.5. Koloni PZR için gereken bileşik ve miktarları.

dH ₂ O	13.5 µl
Pfu Buffer	2.5 µl
dNTP mix	2.5 µl
F primer	0.625 µl
R primer	0.625 µl
BbigLDH DNA	5 µl
Pfu DNA Polimeraz	0.25 µl

PZR için yer alan miktarlarda örnek hazırlanmıştır. PZR; 95°C/5 dakika ile ön denatürasyon, 95°C/30 sn. DNA polimerazın eklenmesi için denatürasyon devamında bağlanma 55°C/30 sn. ve uzama 72°C/1 dk. aşamalarıyla 30 döngüde tamamlanmıştır. Son olarak 72°C/5 dk. uzama adımı ile metot tamamlanmıştır. Koloni PZR ürünü DNA örneği ile agaroz jel elektroforezi yöntemiyle transformasyon adımının kontrolü sağlanmıştır.

2.3.1.11. Mini Prep

Transforme edilen BbigLDH geninin Koloni PZR ile çoğaltılmasının ardından elde edilen PZR DNA ürününün saflaştırılması için Wizard Plus SV Miniprep DNA

Purification System kiti kullanılmış ve üretici firmanın talimatlarına uygun bir yöntem izlenmiştir. İlk olarak, LB sıvı besiyerinde büyütülen kültürden 1-10 ml hacminde örnekler alınmış ve bu örnekler, 12,000 rpm hızında 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Oluşan hücre pelletleri, 250 µl "Hücre Resüspansiyon Çözeltisi" içinde çözdürülmüş ve karışıma 10 µl "Alkalın Proteaz Çözeltisi" eklenmiştir. Daha sonra, tüpler 4-6 kez ters yüz edilerek homojen bir şekilde karıştırılmış ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası, örnekler 350 µl "Nötralizasyon Çözeltisi" ilave edilmiş ve tekrar 4-6 kez ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Bu aşamadan sonra, karışım 12,000 rpm hızında 10 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan hücre lizatı atılmış, kalan süzöntü spin kolonun yerleştirildiği toplama tüpüne aktarılmıştır. Spin kolon, 12,000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek DNA'nın yoğunlaşması sağlanmış, ardından toplama tüpündeki sıvı atılmıştır.

Yıkama işlemi sırasında, spin kolona 750 µl (etanol içeren) "Yıkama Çözeltisi" eklenmiş ve 12,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süzöntü uzaklaştırıldıktan sonra, aynı işlem 250 µl "Yıkama Çözeltisi" ile tekrarlanmıştır. Bu işlemin ardından, spin kolon 12,000 rpm hızında 2 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Son olarak, elüsyon işlemi için spin kolon, 1.5 ml'lik bir ependorf tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 50 µl "Nükleazsız Su" eklenmiştir. 12,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen spin kolon atılmış, elde edilen saf DNA içeren ependorf tüpü -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.3.1.12. DNA Dizileme İşlemi

BbigLDH geninin başarılı transformasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğine yönelik nükleotid dizisi seviyesinde doğrulama yapılması için çift yönlü standart Sanger dizilemesi Triogen Biyoteknoloji (TÜRKİYE) firması aracılığıyla Eurofins'e yaptırılmıştır (Sanger, Nicklen, ve Coulson 1977).

2.3.2. Rekombinant Protein Ekspresyonu

2.3.2.1. %15'lik Gliserol Hücre Stoklarının Hazırlanması

Bir gün önce 500 µl amfisilinsiz kültüre taze pasaj yapılmış olan (2000 rpm. 5 dk. santrifüj ile pellet sıvı kültüre aktarılmıştır) aktif hücre kültürü ile gliserol stoğu (%30-otovlanmış distile su ile hazırlanıp şırınga ile filtrelenmiş) karıştırılmıştır. Ardından hemen -80°C'de saklanmıştır.

2.3.2.2. Protein Ekspresyonunun Optimizasyonu

Protein ekspresyonu için gliserol stoğundan alınan sürüntü, 100 µg/ml amfisilinsiz LB agar petrilere öze ile ekilmiştir. Etüvde 37°C'de gece boyunca inkübasyon yapılmıştır. Çoğaltılan BbigLDH konstrüktörlerinden tek koloni seçimi yapılarak 5 ml LB sıvı besi yerine (100 µg/ml amfisilinsiz) steril kürdan ile aktarılmıştır. Ardından tekrar 37°C'de gece boyunca inkübasyon yapılmıştır.

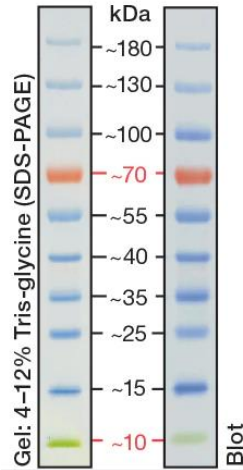
Ekspresyon vektörü olan pLATE31 ile prokaryotik hücrede ökaryotik protein olan BbigLDH'nin ekspresyonunun gerçekleşebilmesi için *lac* operon kısmının indüklenmesiyle ancak rekombinant protein üretimi sağlanabilmektedir. Bunun için IPTG ile inkübasyon süresi için optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyonun temel amacı total protein izolatına ait süpernatantta yüksek konsantrasyonda BbigLDH protein elde edilmesidir. 5 ml LB sıvı kültürde (50 µl hücre kültürü eklenmiş) yetiştirilen hücreler (OD₆₀₀ 0.6 ulaşınca) 1 mM IPTG ile indüklenmiş ve hücreler çalkalamalı inkübatörde 37°C sıcaklıkta 3 saat, 5 saat ve bir gece boyunca 220 rpm'de inkübe edilmiştir.

Optimize koşullar sağlanarak yüksek oranda üretilen BbigLDH hücre kültürlerinden alınan total protein örnekleri ile SDS-PAGE yöntemiyle görüntülenmiştir. Örnekler bir gece boyunca çoğaltılarak her örnekten 5 ml alınıp 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen kültürler 5000 rpm/20 dk. boyunca 4°C'de santrifüj edilerek hücre pelletleri elde edilmiştir. Pelletler 500 µl Lizis Tamponunda çözündürülüp buz üstünde Bandelin Sonopuls HD4050 sonikatöründe %60 güç ayarında 20 saniyelik aralarla 6x10 döngü olacak şekilde sonike edilmiştir. Hücre lizatı 14000 rpm/30 dk. boyunca 4°C'de

santrifüj edilmiştir. Süpernatant ve pellet olmak üzere iki kısım SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır. BbigLDH enziminin moleküler ağırlığı ve tükenme katsayısı (extinction coefficient) amino asit dizisi kullanılarak ProtParam (<https://web.expasy.org/proparam/>) ile belirlenmiştir.

2.3.2.3. SDS-PAGE Yöntemi

BbigLDH pellet ve süpernatant lizatları eşit hacimde (5 µl) SAB (örnek uygulama tamponu) ile muamele edilmiştir. Pipetasyon ile solüsyon homojen edilerek kaynar suda veya ısıtma tablasında 95°C/10 dakika bekletilmiştir. Örnekler %12'lik SDS-PAGE için hazırlanarak sırasıyla M (marker), sp (süpernatant), p (pellet) olmak üzere SDS-poliakrilamid jel kuyularına yüklenmiştir. Örnekler jelde 200 V'da 40 dk. boyunca koşturularak her bir protein için ayrı bantlaşmalar elde edilmiştir. Page Ruler Prestrained Protein Ladder 10 to 180 kDa (Catalog no. 26616, 2 x 250 µl) marker 35 kDa bantlaşma gösteren protein içerikleri SDS-PAGE ile BbigLDH (yaklaşık 36 kDa) varlığının tespiti yapılmıştır (Şekil 2.6).



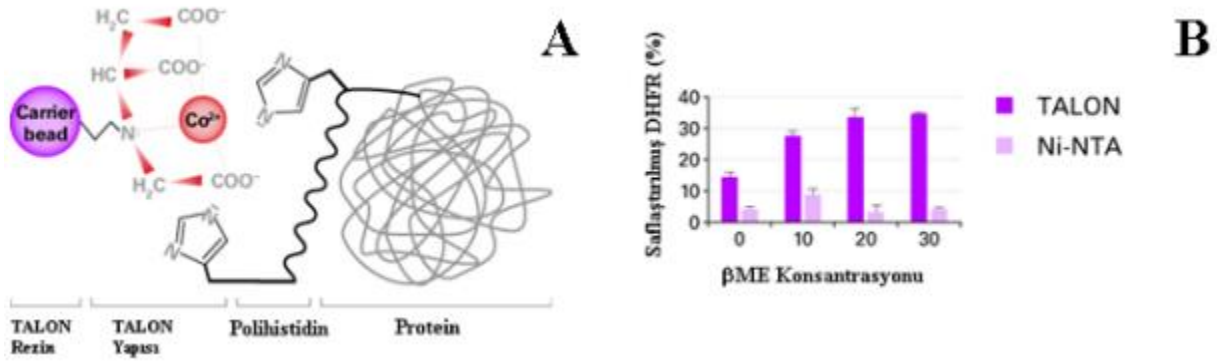
Şekil 2.6. SDS-PAGE için kullanılan protein marker için farklı kDa protein bantlaşmaları.

2.3.2.4. BbigLDH Proteinin Saflaştırılması

Yukarıda anlatıldığı gibi optimize edilen ekspresyon koşulları kullanılarak sıvı kültürde yetiştirilen kültürlerden total protein lizatı, ekspresyon vektörü olarak kullanılan proteinin yapısında bulunan 6xHistag etiketlerinden yararlanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Safılaştırma için total protein lizatı hazırlanışında, 250 µl hücre kültürünü 25 ml LB sıvı kültürüne aktararak 100 mg/ml ampisilinde yetiştirilen transforme ve kontrol *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri 0.6 OD₆₀₀ optik yoğunluğa ulaştıklarında 1 mM IPTG ile indüklenmiştir. Devamında hücreler çalkalamalı inkübatörde 220 rpm/bir gece boyunca 37°C’de kltive edilmiştir. Ardından rnekler toplanarak 5,000 rpm/20 dakika boyunca 4°C’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri önce 500 µl Lizis tamponuyla değrede edilmiş ve 1.5’lik hacme sahip ependorf tüpüne aktarılıp Bandelin Sonopuls sonikatrnde %60 gte buz üstünde 20 sn.’lik aralarla 6x10 döngü şeklinde sonike edilmiştir. Homojenize edilmiş hücre lizatı 14,000 rpm/30 dk. Boyunca 4°C’de santifüj edilmiştir. Süpernatant ve pellet iki ayrı örnek olarak SDS-PAGE ile ekspresyon analizi uygulanmıştır.

Takara firmasının ürettiği HisTALON Gravite Kolonları kullanıma hazır halde yüksek oranda his-etiketli proteinlerin pürifikasyonu için kullanılmaktadır. Graviteye bağlı olarak akış sağlanan protokolde bakteri, memeli ve baculovirus enfekte hücrelere ait His etiketli proteinlerin saflaştırılması için kullanılmaktadır. Kolonlar TALON® reinesiyile (kobalt yüklü, nikel yüklü reçinelerden daha yüksek özgüllükle His etiketli proteinlere bağlanan ve olağanüstü saflık sağlayan, hareketsiz bir metal afinite kromatografisi (IMAC) reçinesidir) kaplanmıştır. TALON reaktif merkezlere bağlanma gösteren Co⁺² iyonlarıyla stabilize edilen şelatör, yüksek oranda saflaştırma işlemi gerçekleştirebilmektedir. Bu yöntemle His- etiketli proteinlerin hızlı, basit ve tekrarlanabilir kromatografik ayrıma imkan sağlanabilmektedir. Kolon farklı kullanımlar için yeniden uygulanabilir olsa da yalnızca aynı proteinlerin farklı partlarında kromatografi için kullanılması önerilmektedir (şekil 2.7).



Şekil 2.7. (A) HisTALON Gravite Kromatofrafi kolonundaki TALON reçinesi detaylı gösterimi, (B) HisTALON gravite kolonunun Ni-NTA kolona göre daha yüksek saflaştırma verimi (<https://www.takarabio.com/learning-centers/protein-research/his-tag-purification/tech-note-cobalt-resin>).

Kolonu pürifikasyona hazırlarken kolonun içerisinde yer alan etanol yavaşça boşaltılmıştır. Kolonda yer alan pembe kısım çöktükten sonra kurumasına izin vermeden kullanıma başlanmıştır. Kolon 10 ml “Dengeleyici Tampon” ile yıkanmıştır. Ardından, total protein lizatın süpernatantı kolona yüklenmiştir. Bu aşamada, 1 ml süzüntü örneği toplanmıştır. Ardından 8 ml “Dengeleyici Tamponu” kolona eklendikten sonra 7 ml “Yıkama Tamponu” kolondan geçirilmiştir. Devamında 5 ml “Elüsyon Tamponu” yüklenerek 5x1 ml Elüsyon örneği toplanmıştır. Sürecin tamamı buz üstünde gerçekleştirilmiştir.

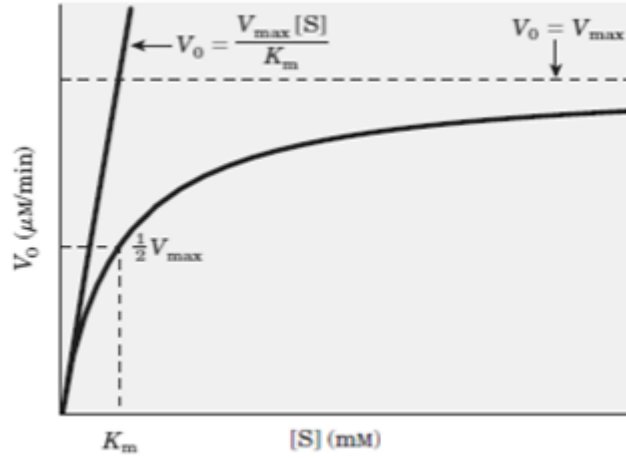
2.3.3. Protein Konsantrasyon Tayini, Aktivite ve Kinetik Analizleri

2.3.3.1. Bradford Yöntemi

Bradford 1976 (Bradford 1976) yayınında belirtilen hızlı ve hassas olarak protein boyama yöntemiyle kantitatif olarak protein konsantrasyon tayininin yapılmasında kullanılan metotta, 465 nm absorbands değerinde proteinin Bradford boyaması nedeniyle 595 nm maksimum absorbands değerine çıktığı bilinmektedir. Referans olarak 2, 4, 6 ve 8 mg/ml BSA protein örnekleri kullanılarak tüm ölçümler için 2 µl örnek, 798 µl dH₂O ve 200 µl Bradford boyası kullanılmıştır.

2.3.3.2. Kinetik ve Aktivite Analizleri

Kinetik analizler, substratın reaksiyon karışımına eklenmesiyle başlamış ve bu sırada NADH'ın katalize edilmesi, 340 nm'de UV-görünür spektrofotometre kullanılarak izlenmiştir. Elde edilen grafik, GraphPad Prism yazılımındaki altlık inhibisyon modülü kullanılarak oluşturulmuştur. Reaksiyonlar, mikropłakanın bir yuvasında toplam 200 µl reaksiyon hacmi içeren, 25°C'de saf enzim eklenerek uygulanmıştır. İlk reaksiyon karışımı, pH 7.5'te 50 mM Tris-KCl tamponunu, çeşitli konsantrasyonlarda NADH (0.006-0.8 mM) ve 10 mM pirüvat içermektedir. İkinci reaksiyon karışımı, pH 7.5'te 50 mM Tris-KCl tamponunu, 200 µM NADH ve 0.078-10 mM pirüvat konsantrasyonlarını içermektedir. İlk reaksiyon, NADH'ye göre sigmoid grafik elde edilmiştir.



Şekil 2.8. Substrat derişimine karşı başlangıç hızının değişimi (Nelson ve Cox 2005).

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Denklem 2})$$

K_m Michaelis-Menten eşitliği (Şekil 2.8); $[S]$ substrat derişimi, V_0 ilk hız ve V_{max} yani ilk hıza bağlıdır. İlk hızın V_{max} değerinin yarısına eşit olduğu durumdaki substrat derişimi K_m değerini ifade etmektedir (Nelson ve Cox 2005).

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Denklem 3})$$

$$K_m = [S]$$

(Denklem 4)

Laktat dehidrogenaz (LDH), NADH'nin varlığında pirüvatın laktata dönüşümünü katalize etmektedir. LDH aktivite testi, pH 7.5'te 50 mM Tris-KCl tamponunda gerçekleştirilmiştir. Mikroplakttaki reaksiyon karışımı, enzim (Elüsyon 2), 200 µM NADH ve 10 mM pirüvat içermektedir. BbigLDH aktivitesi, 25°C'de 1 dakika boyunca 340 nm'de NADH kullanımına bağlı düşüşün izlenmesiyle bir UV-görünür spektrofotometre (BioTek Epoch, USA) kullanılarak belirlenmiştir.

2.3.3.1. BbigLDH Enziminin Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi

Tablo 2.6. BbigLDH örneklerinin (B) farklı koruyucu bileşiklerle hazırlanması ve içerik bilgileri.

Örnek	İçerik			Referans
B1	5 mM EDTA	10 mM DTT	%10 Gliserol	(Shoemark vd. 2007; Yakarsonmez vd. 2019)
B2	10 mM DTT	%10 Gliserol		
B3	10 mM DTT			
B4	Katkısız			

Saflaştırma sonrasında belirlenen fraksiyonlar birleştirilerek elde edilen toplam 4 ml saf enzim, 1 ml'lik fraksiyonlara bölünmüştür. Her bir fraksiyona, belirtilen miktarlarda ditiotreitol (DTT), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve gliserol gibi stabilizatörler eklenmiştir. Ayrıca, enzimin aktivitesinin stabilizatörler olmadan zamanla nasıl değiştiğini incelemek amacıyla, hiçbir stabilizatör eklenmemiş saf enzim çözeltisi de ayrılmıştır.

Tüm enzim çözeltileri, her karışımdan 10'ar tüp olacak şekilde +4°C, -20°C ve -80°C'de saklanmıştır. -80°C'deki tüpler sıvı azotla dondurulmuştur. Belirlenen zamanlarda, her bir enzim çözeltisi alınarak standart enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Stabilizatör eklenmeden önce yapılan ilk ölçüm, her enzim çözeltisi için başlangıç değeri olarak kabul edilmiş ve 2., 6., 9., 13. ve 19. günlerde tekrar ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu veriler, enzimin zamanla aktivitesindeki değişimleri değerlendirmek amacıyla analiz edilmiştir.

2.3.3.2. Enzimin Termostabilitesinin Belirlenmesi

BbigLDH enziminin termostabilitesini belirlemek için yapılan deneyde, pH değeri sabit tutularak (Tris-KCl, pH 7.5) farklı sıcaklıklarda ve sürede tutulan enzimlerin aktivitesi ölçülmüştür. Aktivite ölçümünde kullanılan miktarlarda reaksiyon bileşenlerinin kullanımıyla 340 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Deney sürecinde enzim, sırasıyla 60°C, 50°C, 40°C ve 30°C sıcaklıklarında su banyosuna yerleştirilmiş ve 25 dakika boyunca bekletilmiştir. Her 5 dakikada bir aktivite ölçümü yapılarak enzimin sıcaklık karşısındaki stabilitesi belirlenmiştir (Nural vd. 2016).

2.3.3.3. Enzimin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Optimum pH deneyinde, aktivite ölçümünde kullanılan standart parametrelere ek olarak, bu reaksiyon farklı pH değerlerine sahip tamponlar (pH 7.0-8.5 için Tris-KCl, pH 9.0-10.0 için CHES) ile gerçekleştirilmiştir. Her pH değerinde, reaksiyonun diğer bileşenleri sabit tutularak, enzimin farklı pH koşullarındaki aktivitesi incelenmiştir. Bu sayede enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH değeri belirlenmiştir (Nural vd. 2016).

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

3.1. Dizi analizi

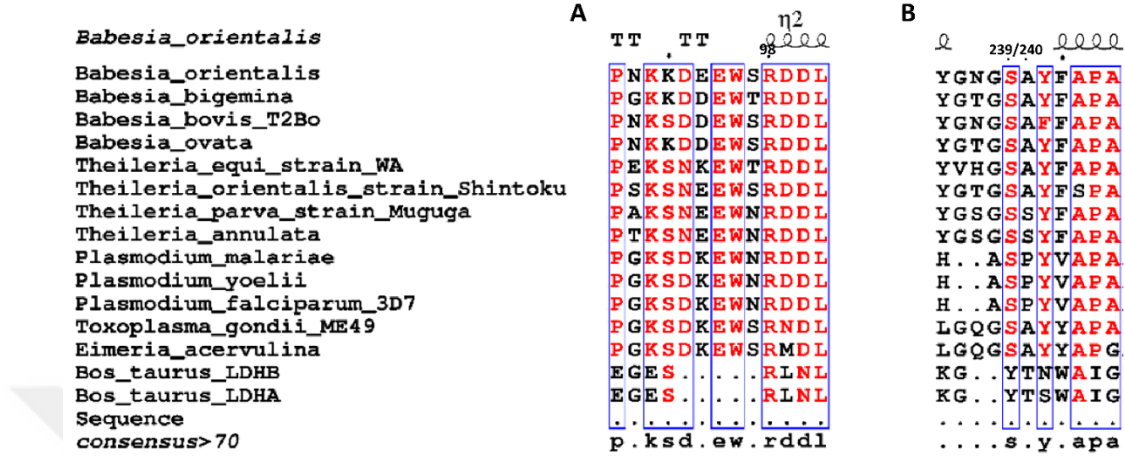
Nükleotid dizi analizi sonucunda, BbigLDH geninin 969 nükleotidlik bir açık okuma çerçevesini (open reading frame) içerdiği ve bu çerçevenin 322 amino asidi kodladığı belirlenmiştir. Diziler arası hizalama işlemi ClustalW kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1) ve sonuçlar ESPript 3 aracılığıyla görselleştirilmiştir (Şekil 3.1). BbigLDH ile en yüksek dizi benzerliği %95,34 ile *B. ovata* ve %85.98 ile *B. bovis* arasında gözlenmiştir. BbigLDH'ye yakın olan diğer türler arasında, *T. orientalis*'in %70,66 benzerliği gösterdiği, *P. falciparum*'un ise %50,31 oranında benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Önemli bir şekilde, *B. bigemina*'nın konağı olarak bilinen *B. taurus* LDH A, LDH B ile %30 oranında benzerlik tespit edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Clustal W analizi sonucunda *B. bigemina* LDH amino asit dizisinin diğer türlerle olan benzerlik yüzdeleri.

Veri bankası erişim numarası	Tür ismi	Yüzde benzerlik
XP_012766822.1	<i>Babesia bigemina</i>	%100.0
XP_028866450.1	<i>Babesia ovata</i>	%95.34
XP_001611047.1	<i>Babesia bovis</i> T2Bo	%85.98
XP_009689964.1	<i>Theileria orientalis</i> strain Shintoku	%70.66
XP_004833698.1	<i>Theileria equi</i> strain WA	%69.47
ADG45564.1	<i>Theileria annulata</i>	%65.42
XP_766703.1	<i>Theileria parva</i> strain Muguga	%64.98
ACM77785.1	<i>Eimeria acervulina</i>	%50.32
ABH03417.1	<i>Plasmodium falciparum</i>	%50.31
XP_001349989.1	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	%50.31
SBS88125.1	<i>Plasmodium malariae</i>	%50.16
XP_724101.1	<i>Plasmodium yoelii</i>	%49.22
XP_002368488.1	<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	%48.90
BAA14170.1	<i>Bos taurus</i> (LDH A)	%32.69
CAB96751.1	<i>Bos taurus</i> (LDH B)	%30.29

B. taurus türüne ait LDHA ve LDHB proteinlerinin ve apikompleksan parazitlerine ait LDH proteinlerinin dizi analizi sonuçlarına göre yalnızca apikompleksan parazitlerinin substrat spesifik döngü kısmında bulunan 5 aminoasitlik insersiyonun varlığı açıkça görülmektedir (Şekil 3.1A). Bu farklılık nedeniyle, apikompleksan parazitlerine yönelik LDH hedefli spesifik ilaç çalışmaları yapılmaktadır (Dunn vd. 1996). Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda olduğu gibi *B. bigemina* apikompleksan parazitinde de beş aminoasitlik insersiyon mevcuttur (He vd. 2022). Substrat spesifik döngüsünde yer alan insersiyon bölgesindeki önemli farklılık birçok ilaç çalışmasında hedef olarak kullanılmasını sağlamıştır. Bu bölgeye yönelik yapılmış olan inhibitör çalışmaları literatür taraması Giriş bölümünün en sonunda yer alan Tablo 1.3'te özetlenmiştir.

Substrat spesifik döngüsünün karşısındaki döngü (BbigLDH'de G236, T237, G238) "karşıt döngü (opposing loop)" olarak adlandırılır ve Şekil 3.1B'de gösterilmiştir. Modern *Plasmodium* LDH'lerindeki belirgin iki rezidünün silinmesi, AtasalLDH (AncLDH) ve *Toxoplasma* LDH'lerle paylaşılan döngü yapısıyla birlikte, önemli bir evrimsel sapmaya işaret etmektedir (Şekil 3.1B). Ayrıca, atasal LDH'nın genellikle modern *Toxoplasma* LDH'larıyla ortak olan bir oksaloasetat aktivitesini sergilediği, ancak bu yeteneğin *Plasmodium* LDH'lerinde bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bu ilginç korelasyon, karşıt döngü silinmesinin ve muhtemelen A236 ve P246'nın varlığının, modern *Plasmodium* LDH'lerinde gözlemlenen dikkate değer substrat spesifitesini şekillendirmede önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir (Boucher vd. 2014). Modern *Toxoplasma* LDH'lerinde olduğu gibi, BbigLDH'de karşıt döngüde bir silme gözlemlenmez, bu da onu bu açıdan modern *Plasmodium* LDH'lerinden ayırmaktadır. *Babesia* ve *Theileria* cinslerinde (*T. equi* hariç) karşıt döngüsünde bir G[QSTN]G desenini gözlemlenmektedir (Şekil 3.1B). *B. taurus* ve *Plasmodium* LDH'lerinde karşıt döngüsünden önceki rezidüleri pozitif yüklü (H ve K rezidüleri) iken, *Babesia* ve *Theileria*'da bu kalıntıların aromatik (Y) olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1. Çoklu dizi hizalama sonucunda elde edilen (A) substrat spesifik döngü (93-97) ve (B) karşıt döngü (236-238) hizalamaları.

InterPro veri bankası, bilinen protein ailelerinin depolandığı ve domain analizleri için kullanılan önemli bir sunucudur. Ayrıca InterPro sunucusu kullanılarak çoklu sekans hizalaması (multiple sequence alignments) ve Hidden Markov models (HMMs) verileri elde edilebilmektedir. Tablo 3.2’de gösterilen XP_012766822.1 erişim numarasına sahip BbigLDH protein dizisi, InterPro sunucusu kullanılarak bilinen protein domainleri tespit edilmiştir. İlgili diziye ait 2 protein domaini olduğu görülmektedir (Tablo 3.2). Birinci domain 9-152 amino asit aralığında yer alır ve Laktat/malat dehidrogenaz domaini (Ldh1N) içerir. Ayrıca bu domainde NAD bağlanma bölgesi de açıkça görülmektedir. İkinci domain Laktat/malat dehidrogenaz domaini (Ldh1C) içermektedir. Ayrıca N terminal uca yakın yerde Rossmannfold domaini içermektedir. Kofaktör bağlanması için önemli olan bu domain BbigLDH’de de görülmektedir.

Tablo 3.2. BbigLDH amino asit dizisinin (XP_012766822.1) InterPro analiz sonucu.

Domain İsmi	Erişim Numarası	Açıklaması	Amino Asit Aralığı
Ldh1N	PF00056	Laktat/malat dehidrogenaz, NAD bağlanma bölgesi	9-152
Ldh1C	PF02866	Laktat/malat dehidrogenaz, alfa/beta C-terminal bölgesi	157-315

Çoklu dizi hizalama BbigLDH, substrat spesifik döngü için apikompleksanların genelinde görülen beş amino asit insersiyon dizisi içerdiği görülmektedir (Şekil 3.2A). PDBsum 2B topoloji modeline göre BbigLDH yapısında 16 alfa-heliks, 14 beta-dizisi ve birçok döngü bulunmaktadır (Şekil 3.2B). Kristalografik analizler, PflDH'nın, bu eklemenin aktif bölgede karakteristik yapı oluşturmaya katkı sağladığını göstermiştir ve bu nedenle ilgili bölge ilaç geliştirme için bir hedef olarak kullanılmaktadır (Dunn vd. 1996). BbigLDH, tüm LDH'lerde korunan katalitik rezidüleri içermektedir. Bunlar R109, D168, H195 ve R171'dir (BbigLDH'de R98, D158, H185, R161 rezidüleridir) (Şekil 3.2A) (Hinrichs ve Makler 1993; He vd. 2022). Genellikle apikompleksan LDH'lerinde 93-97 rezidüleri (DDEWT), hareketli bir döngü oluşturmaktadır. Protein üçlü (ternary) komplekste, döngü aşağı doğru hareket ederek kapalı katalitik bölge oluşturmaktadır (Boucher vd. 2014).

A

Babesia orientalis

1 MLKGLSTMSPAVRNKTSLIGAGNTGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPKLGEAKALDIMANAIYDTAARKAIGTANYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDEWNSRDDI

Babesia bigemina

1 MAPVVRNKTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLARMGKKDDKNTARDI

*Babesia bovis*_T2Bo

1 MYKNILSTMAPVVRNKTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPKLGAALKALDIMANAIYDTSQNVIGTTSYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

Babesia ovis

1 MAPAVRRNKTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

*Theileria equi*_strain_WA

1 MTEAPVVRNKTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

*Theileria orientalis*_strain_Shintoku

1 MTEAPVVRNKTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

*Theileria parva*_strain_Muguga

1 MS.GIRKRLTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

Theileria annulata

1 MARNNRKLTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

Plasmodium malariae

1 MAPKTKIVLVGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

Plasmodium yoelii

1 MAPKTKIVLVGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

*Plasmodium falciparum*_3D7

1 MAPKTKIVLVGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

*Toxoplasma gondii*_ME49

1 MTGTVSRKKTSLIGSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

Eimeria acervulina

1 MAVFEKTRPKIAMVSGNIGGVMAIQAQLKELG.DVVLFDIAPTIGAAKALDIMANAYVDTSQRVIGTTKYEDTADSDVCITTAGLAKLPNKKDDKNTARDI

*Bos taurus*_LDH8

1 MATLKEKLIAPVAREETTPNNKTIIVGVGVGMACAIISLKLSTDLALVLDLKLKGMMDLQHG.SLPLQTPKIVADKDVSVTANSKIVVVTAVRQOEGES.....RLNL

*Bos taurus*_LDH9

1 MATLKDQLIQNLKKEH.VPQNKTIIVGVGVGMACAIISLKLSTDLALVLDLKLKGMMDLQHG.SLPLQTPKIVADKDVSVTANSKIVVVTAVRQOEGES.....RLNL

Sequence

consensus>70

.....i.lig.g.igg.m.i.....el.dvvlfdi.....k.ld.h.....g...ye.....dv.itaag...p.ksd.ew.rddi

Babesia orientalis

110 VAPNSKIMPTIGDNIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKATGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

Babesia bigemina

102 VGPNSKIMPTIGDNIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

*Babesia bovis*_T2Bo

110 VAPNSKIMPTIGDNIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

Babesia ovis

102 VGPNSKIMPTIGDNIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

*Theileria equi*_strain_WA

103 VSTNSKIMPTIGDNIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

*Theileria orientalis*_strain_Shintoku

103 VSTNSKIMPTIGDNIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

*Theileria parva*_strain_Muguga

101 VAPNAKIIITVAENIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

Theileria annulata

102 VGPNSKIMPTIGDNIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

Plasmodium malariae

99 LPLNNKIMIEGGHKKNCNPAFIVVTNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

Plasmodium yoelii

99 LPLNNKIMIEGGHKKNCNPAFIVVTNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

*Plasmodium falciparum*_3D7

99 LPLNNKIMIEGGHKKNCNPAFIVVTNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

*Toxoplasma gondii*_ME49

103 LPLNNKIMIEGGHKKNCNPAFIVVTNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

Eimeria acervulina

104 LPVNAKIMREVAAGIKKYAPNAFVICITNPLDVVMKMLKSTGFPKKNVVGMLGLDSSRMCHYIADKLVNFRYVHSGCTGGGDSMIPLVNVRVNGIPIQLFVERG.DITQA

*Bos taurus*_LDH8

111 VQRNVNIFKPIIPQIVKYSNACIIIVVSNPDIILVYVWKLKSLGPKHNVIGSGCNLSARFRLMAREKLGHPSSCHGWILGEGSSVAVVSGVNVAGVSLKLNHPGLGTDADKE

*Bos taurus*_LDH9

110 VQRNVNIFKPIIPQIVKYSNACIIIVVSNPDIILVYVWKLKSLGPKHNVIGSGCNLSARFRLMAREKLGHPSSCHGWILGEGSSVAVVSGVNVAGVSLKLNHPGLGTDADKE

Sequence

consensus>70

...n.ki...i...ikky.pnafvi.itnp.dvmv.....g.pkn.vqmgg.ldear...yi.dkl.v.p.v.....ig.hgd.nipl...v.gip...fi.....

Babesia orientalis

224 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

Babesia bigemina

226 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

*Babesia bovis*_T2Bo

224 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

Babesia ovis

226 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

*Theileria equi*_strain_WA

216 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

*Theileria orientalis*_strain_Shintoku

217 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

*Theileria parva*_strain_Muguga

216 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

Theileria annulata

216 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

Plasmodium malariae

213 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

Plasmodium yoelii

213 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

*Plasmodium falciparum*_3D7

213 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

*Toxoplasma gondii*_ME49

217 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

Eimeria acervulina

218 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

*Bos taurus*_LDH8

226 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

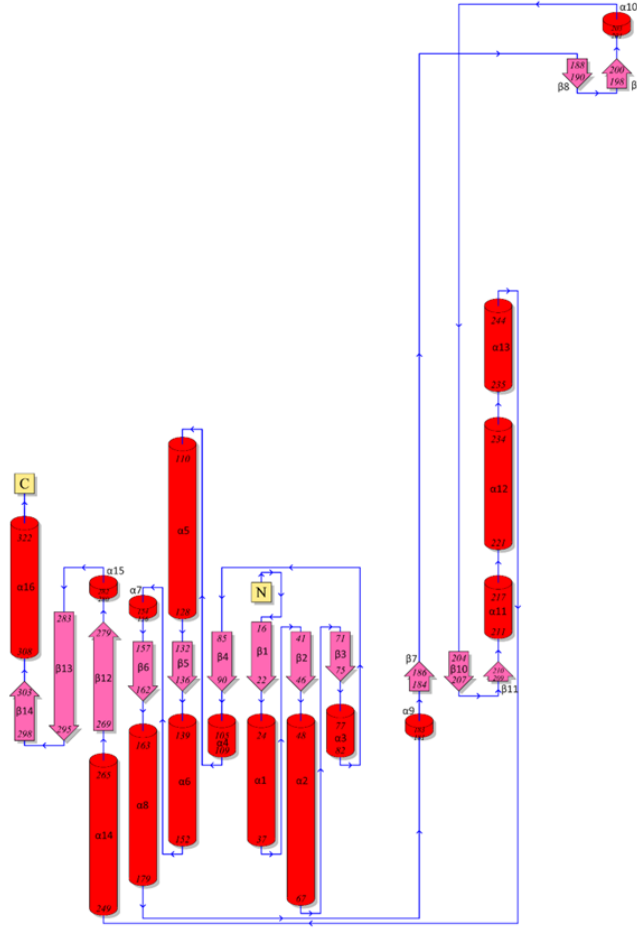
*Bos taurus*_LDH9

226 ELDAEERTIGSGMLVQLVGTGSAYFAPATAAIIEMASVINDKKSIVVCSYLEGEYGH.S.DVYLGTPTAILGANGVKHITITLKLSPBEQAKIDASVKIRRLREALG.....

Sequence

consensus>70

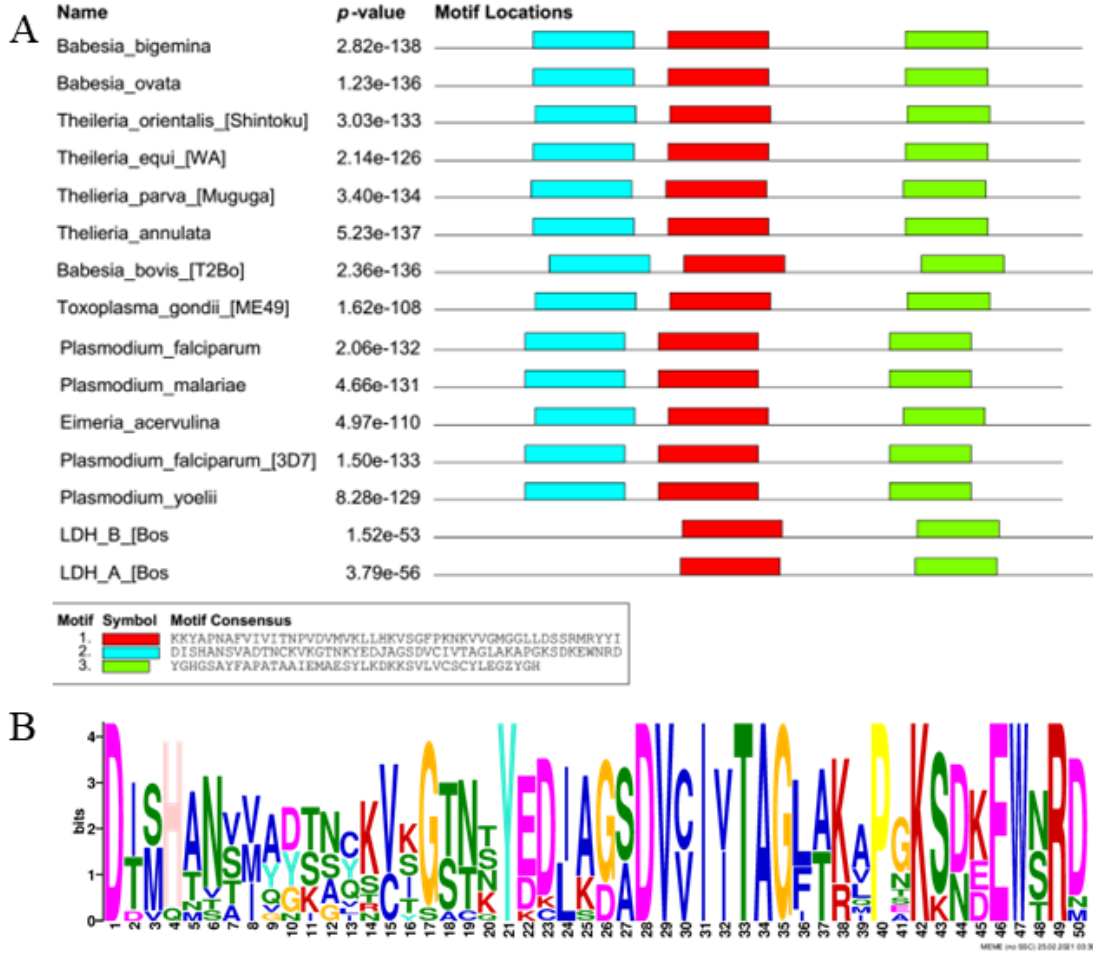
e...i...t...e...s.y.apa...iema...yl.d...v...cs...legeg...dvy.g.p.v.g...gve.vi.l.l...ee...d...i...e...l...

B

Şekil 3.2. (A) ESPrpt 3 ile renklendirilmiş ClustalW dizi hizalama sonuçları. Kırmızı, tam koruma ve kısmi korumayı gösterir, turuncu çizgi ile R98'den önceki 5 amino asitlik insersiyon dizisi (93-97 rezidüler) altı çizilerek işaretlendi. Sarı çizgi ile oposing döngü (236-238 rezidüler) altı çizilerek işaretlendi. (B) Homoloji modellemeye dayalı BbigLDH'nin PDBsum 2B topoloji modeli.

Protein amino asit dizileri kullanılarak, protein motif analizi yapılmıştır. Protein motifleri, proteinin korunmuş bölgeleri (CDD) hakkında da detaylı bilgiler vermektedir. Konak organizma olan *B. taurus* 'ta 50-100 numaralı amino asitler arasında büyütülmüş olarak gösterilen harflendirmeyi gösteren mavi renkli motife sahip olmadığı görülmektedir (Şekil 3.3). Bahsedilen mavi renkte simgelenen motif substrat spesifik döngüyü içine almaktadır ve burada apikompleksanlara özgü olduğu açıkça görülmektedir. Şekil 3.3'te

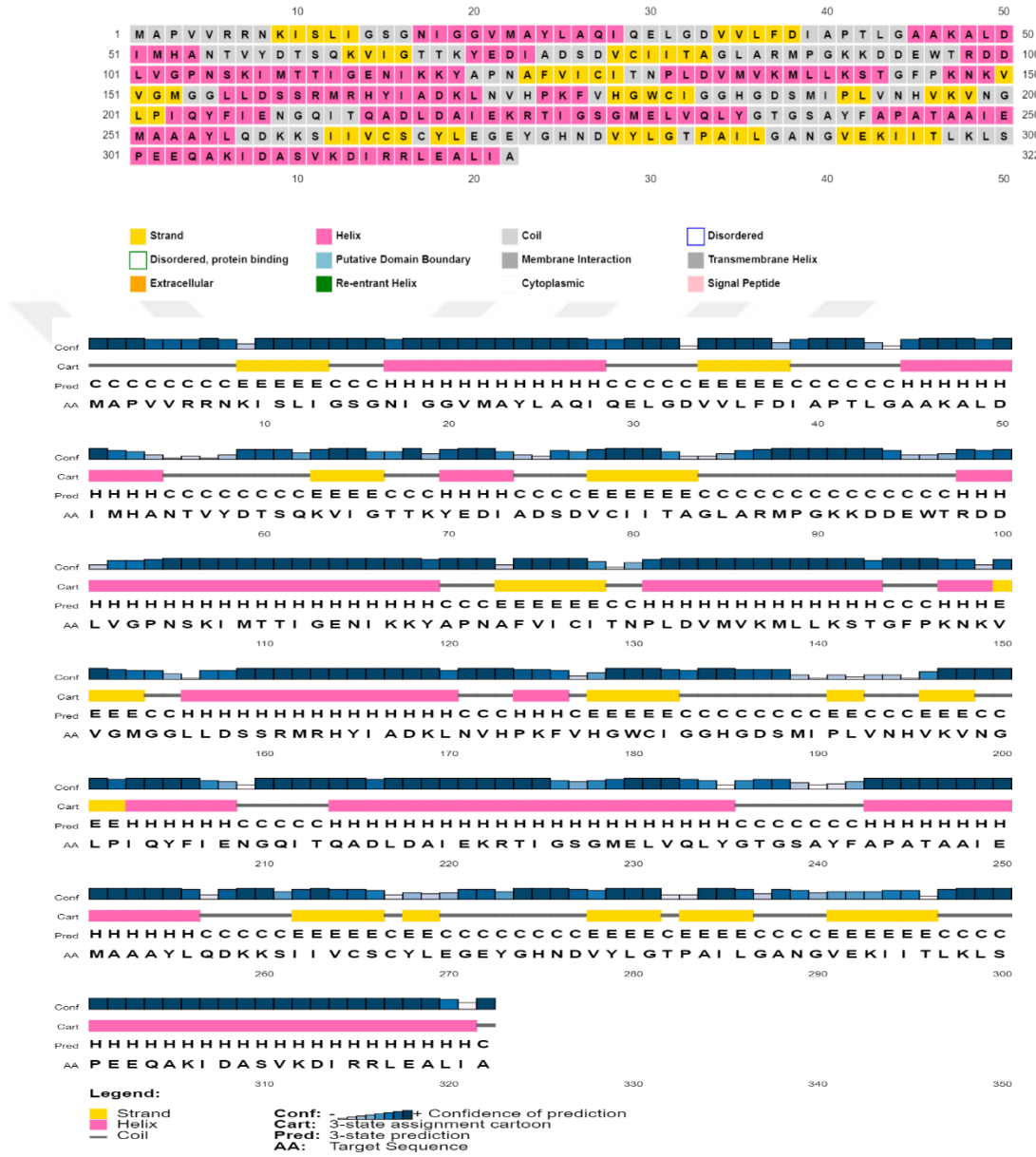
yer alan motifte 49. aminoasitin R98(109) olduğu görülmektedir. Mavi renkli motifte, R98(109) öncesi bulunan 5 amino asitlik insersiyon kısmını içeren substrat spesifik döngü gösterilmektedir.



Şekil 3.3. MEME suite motif analiz sonuçları. (A) Motif taraması görüntüleri, (B) Mavi renkli motif dizisine ait detaylı görüntü. İlgili motif aralığı 50-100. aminoasitler arasındaki kısımda kalmaktadır.

Protein dizisi bilinen ancak 3 boyutlu yapısı bilinmeyen proteinlerde, PSIPRED gibi protein amino asit dizisine dayalı olarak tahmini ikincilyapıyı gösteren sunucular mevcuttur. Çalışmada kullanılan ve Şekil 3.4'te gösterilen BbigLDH proteinine ait tahmini ikincilyapısı ile Beta zincirleri- α -heliks (strand-helix) ve kıvrım (coil) yapılarının hangi

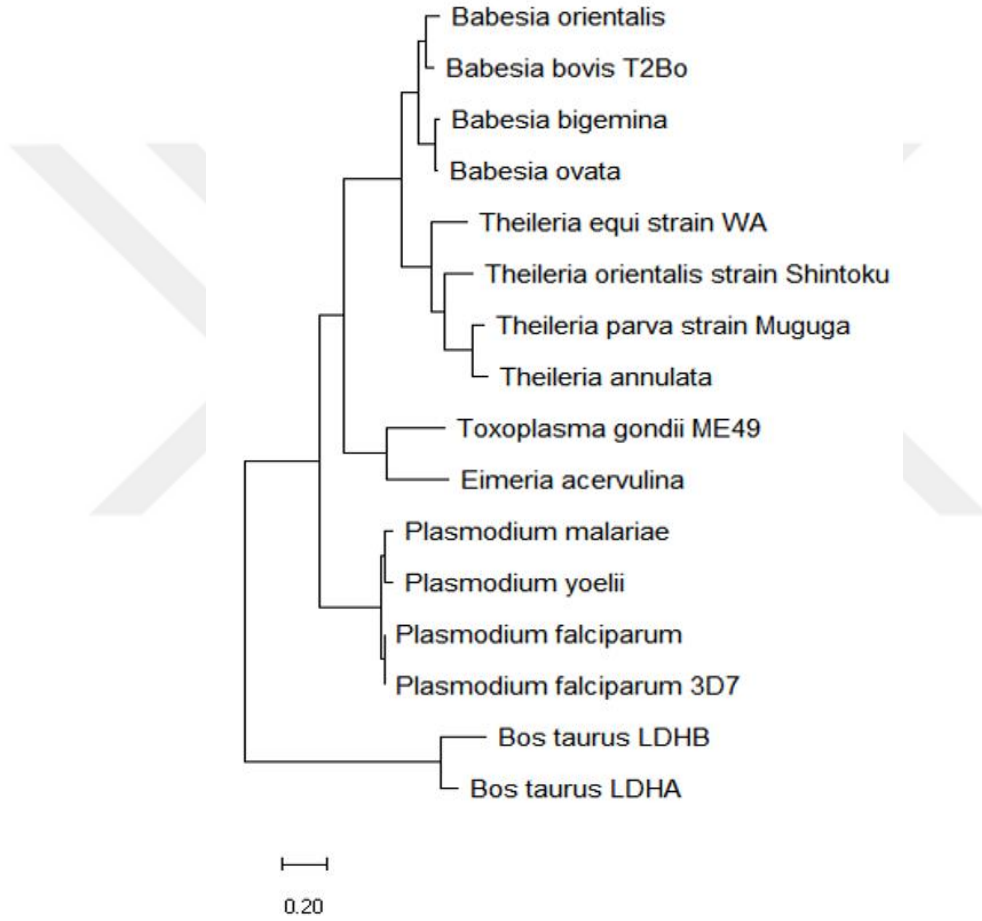
aminoasit dizisine tekabül ettiği belirtilmiştir. Tahminin güvenilirliği koyu maviden-beyaza doğru giden renklendirme basamaklarıyla gösterilmiştir.



Şekil 3.4. PSIPRED sunucusu ile elde edilen protein ikincilyapı analiz sonuçları.

Farklı türlere ait LDH proteinin çoklu dizi analizi yapılmasıyla türler arasındaki benzerlik ve farkların olduğu görülmüştür. Şekil 3.5'te yer alan görüntüdeki filogenetik ağaç MEGA11 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Ağaç oluşturulurken Neighbor-Join

ve BioNJ algoritması kullanılmıştır. Toplam 15 türe ait bu filogenetik ağaçta, konak organizma olan *Bos taurus* LDH'lerinin diğer apikompleksan LDH'leri ile evrimsel olarak yakınlık göstermediği ve apikompleksan parazitlerinin kendi içinde insan paraziti olma özelliği gösteren *Plasmodium* gibi türlerden ziyade *Theileria* gibi hayvan parazitleriyle evrimsel olarak daha yakınlık gösterdiği görülmektedir (Şekil 3.5).

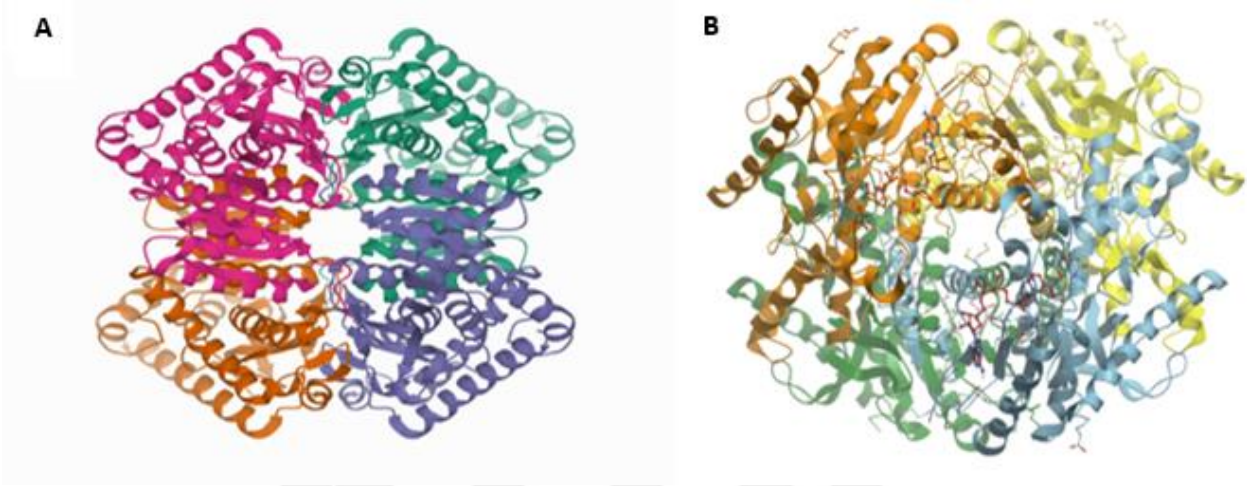


Şekil 3.5. Mega11 ile oluşturulan filogenetik ağacın gösterimi.

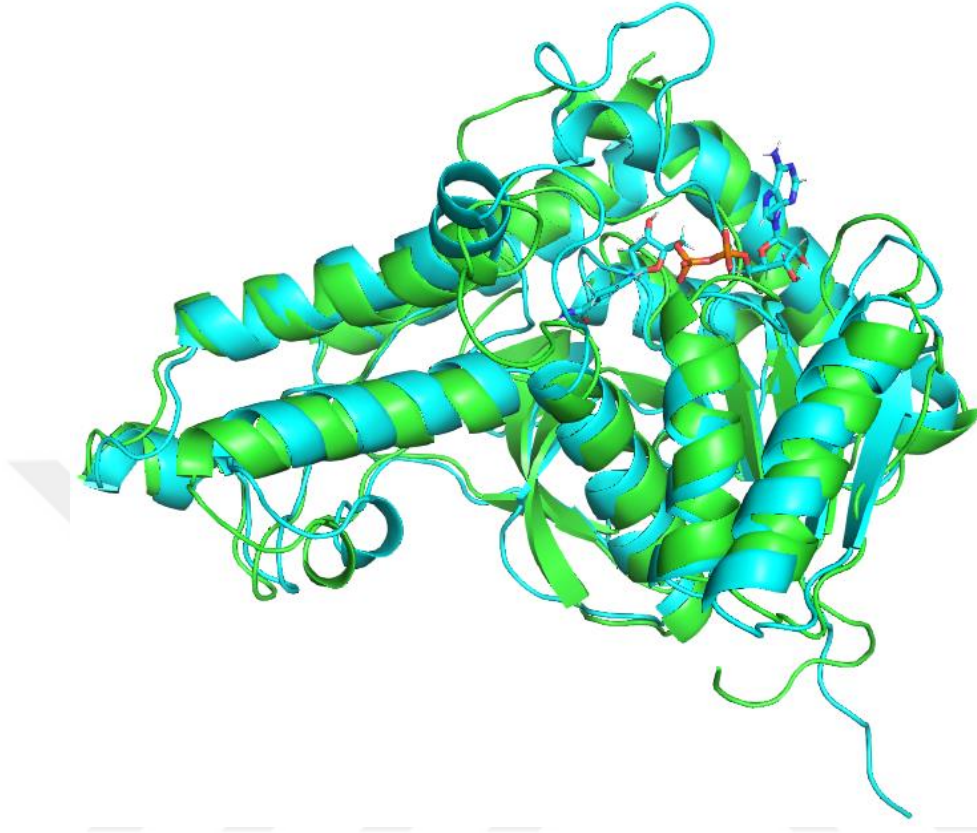
3.2. Homoloji Modelleme ve Yapı Validasyonları

Tez çalışmasında hedeflenen modeller BbigLDH'a ait olup proteinin kapalı ve açık formlarının monomer (A) yapıları için homoloji modellemesi yapılmıştır (Kullanılan kalıplar Şekil 3.6'da yer almaktadır). Monomer modelleme için MODELLER 9.23

programı kullanılarak modele iki ligand (Pirüvat ve NADH) eklenerek kapalı model elde edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Homolojiye dayalı protein modellemesi için gerekli olan ve PDB de bulunan X-ray kristalografi çalışması ile yapısı belirlenmiş olan kalıp (template) LDH proteinleri. (A) 1PZE (1.95 Å), *T. gondii* LDH1 apoenzim yapısı, açık konformasyonların modellenmesi için kullanıldı; (B) 4PLC (1.50 Å), apikompleksanlara ait atasal LDH'ı Pirüvat ve NADH ile birlikte, kapalı konformasyon için kullanılmıştır.



Şekil 3.7. MODELLER 9.23 programı kullanılarak modellenen BbigLDH açık konformasyonuna (yeşil) ve kapalı konformasyonuna (mavi) ait superimpoz görüntüleri; RMSD değeri 1.649 Å.

Kapalı ve açık modellerin süperimpoz yapıları ve RMSD değerleri verilmiştir. Ardından homoloji modelleme ile elde edilen modellerin validasyonlarına ait sonuçlar Tablo 3.3'te yer almaktadır. Validasyon için kullanılan programlardan biri olan ERRAT, yapıya-dayalı modellemelerde bulunan “nonbounded atomic contacts” (Colovos ve Yeates 1993) yani modellemedeki atomların etkileşimlerindeki tutarlılığı tespit edilebilmektedir. Her bir atomun durumuna bakılırken %99'i aşan protein rezidülerde yüksek oranda hata olduğu kabul edilmektedir. %80-99 civarında hata oranı uyarı teşkil etmektedir. Bu limitin altındakiler ise daha doğru etkileşim gösterdikleri kabul edilmektedir. Elde edilen değerler protein yapısının ileri araştırmalar için kullanıma uygun olduğunu göstermektedir. ERRAT için skorlar sırasıyla; açık ve kapalı yapılar için değerler 92.355, 82.484'tür.

Tablo 3.3. BbigLDH protein modellerine ait yapılan modellerin validasyonlarına ait sonuçların özeti.

Program		BbigLDH (açık)	BbigLDH (kapalı)
ERRAT		92.355	82.484
ProSA	z-skor	-10.52	-10.2
ProCHECK	Tercih edilen bölgedeki rezidüler (A,B,L)	(% 92.4) 256	(% 95.3) 264
	Ayrıca tercih edilen diğer bölge rezidüler (a,b,l,p)	(% 6.9) 19	(% 4) 11
	Yaklaşık olarak kabul edilebilir diğer bölge rezidüleri (~a, ~b, ~l, ~p)	(% 0.7) 2	(% 0.7) 2
	Bölgelerin dışında kalan rezidüler	(% 0) 0	(% 0) 0
Verify3D		Rezidülerin %91.30'u >= 0.2 3D-1D skoruna sahip: Geçer	Rezidülerin %94.10'u >= 0.2 3D-1D skoruna sahip: Geçer
QMEAN	Qmean4 değeri	-0.92	-0.52
ProQ	Tahmini LGscore	7.683	5.855
	Tahmini MaxSub	-0.281	0.519

Bir başka validasyon programı olan ProSA’da oluşturulan modellerin kalitesi değerlendirilmektedir. Bunu yaparken proteinin yapısal alan rezidülerinin enerji grafiği oluşturulmaktadır. Oluşturulan Z-skorları taranan 3B yapıların deneysel validasyonları ile elde edilmiş gerçek yapılar ile tutarlı olup olmadığına bakılarak değerlendirilirken yapı-içi rezidü ve enerji verim aralığına uygun aralığa giren modeller tescillenmiş olmaktadır (Wiederstein ve Sippl 2007), (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). ProSA için z skorları sırasıyla; açık ve kapalı yapılar için z score değerleri -10.52, -10.2’dir (Tablo 3.3).

ProQ model validasyonunda iki değer baz alınır; Maxsub ve LGscore. Maxsub, adından da anlaşılacağı üzere doğru protein yapısına uygun olan en yakın bölgenin hesaplamasıyla belirlenmektedir. LGscore ise en doğru yapıya dair polipeptit alt dizisine ait p olasılık değerleri kullanılmaktadır. Tablo 3.3’te yer alan değerler kapsamında değerlendirmeler yapılarak modelin kalitesi hakkında veriler elde edilebilir (Cristobal vd. 2001). Sırasıyla; açık ve kapalı yapılar için değerler LG_{score} için belirtilen 4’ün üzerindedir. Ancak MaxSub için açık modeller negatif değerlere sahiptir. Bunun yanında kapalı modeller 0.5 ile 0.8 arasında ortalama iyi model olarak değerlendirilebilir.

Kantitatif/Nicel Model Enerji Analizi (“Quantitative Model Energy Analysis”/QMEAN), protein yapılarında bulunan önemli geometrik yönlerden olan; doğal kıvrımların belirlenmesi ve aminoasitlerin torsiyon açısı potansiyellerini hesaplanmasını sağlayan başarılı bir araç olduğu bilinmektedir (Benkert, Tosatto, ve Schomburg 2008), (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>). Qmean4 skorları sırasıyla; açık ve kapalı yapılar için değerler -0.92, -0.52 olduğu görülmüştür (Tablo 3.3).

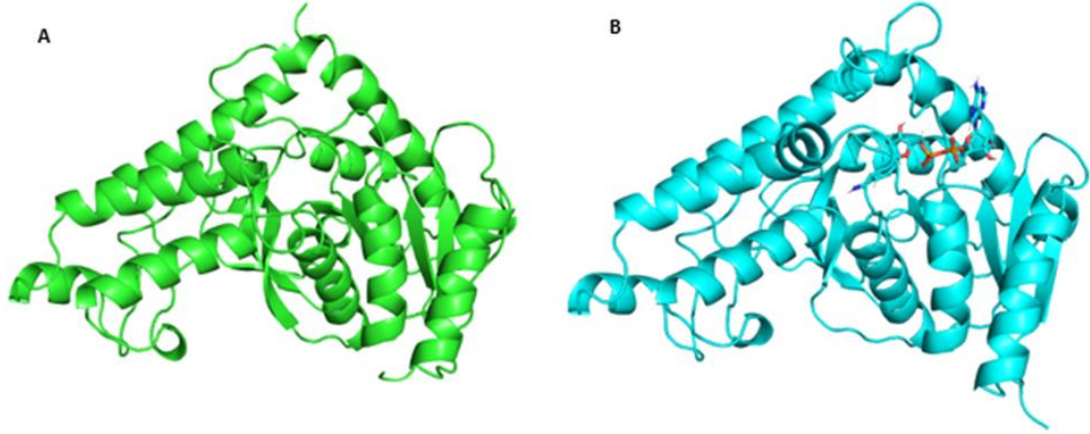
Verify3D validasyon programı; 3B yapı-dizi ilişkilerinde oluşan 3B-1B skorları ile model proteinin mutlak ikincil ve üçüncül katlanma davranışını belirleme açısından önemli bir değerlendirme imkânı sağlamaktadır. Sonuçlarda amino asitlerin belirlenen eşik değerinden daha yüksek olması beklenir ve toplamda oluşturulan basitleştirilmiş skor ile

yapı geçerliliği belirlenir (Bowie, Lüthy, ve Eisenberg 1991; Lüthy, Bowie, ve Eisenberg 1992). Bütün modellerin geçer sonuç aldığı görülmektedir (Tablo 3.3).

ProCHECK adlı bir validasyon programı, protein yapısında yer alan rezidülerin geometrik doğruluğunu değerlendirmek için kullanılır. Bu program, polipeptit omurgasının N-C α (Phi/ ϕ) ve C α -C (Psi/ ψ) bağları etrafındaki dönme hareketlerini analiz ederek rezidüleri farklı bölgelere ayırır. Rezidüler, “kabul edilebilir bölgeler” ve “kesinlikle izin verilmeyen bölgeler” olarak sınıflandırılır. Bu analiz sayesinde, model proteinlerin Ramachandran plot adı verilen bir grafikte görsel olarak temsil edilmesi sağlanır. Bu grafik, protein yapı kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir referans sunar (Laskowski vd. 1993), (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>). Modellerin %90 üzerinde istenen bölgelerde olması ileri analizler için kullanabileceklerini göstermiştir (Tablo 3.3). Tüm bu validasyon skorları değerlendirildiğinde modellerin ileri çalışmalar için uygun olduğu belirlenmiştir.

3.3. Minimize edilen modeller ve validasyonları

BbigLDH modelleri için daha sonra UCSF Chimera 1.13.1 programı kullanılarak minimizasyon işlemi yapılmıştır (Şekil 3.8). Homoloji modelleme veya yapay zekâ tabanlı modelleme ile oluşturulan protein yapılarında, yan zincir pozisyonları veya bağ açıları idealden sapmış olabilmektedir. Bu durumda protein minimizasyonu yapılarak bu tür hatalar düzeltebilmektedir.



Şekil 3.8. Monomer BbigLDH modellerinin, (A) Açık minimize (yeşil renkli) ve (B) Kapalı minimize (mavi renkli) yapılarının görüntüleri.

ERRAT sunucusundan elde edilen genel kalite faktörleri, sırasıyla açık ve kapalı modeller için 90.127, 93.949'dur. Bu değerler, model yapıların göreceli yüksek kalitesini göstermektedir. ProSA sonuçlarına göre, açık ve kapalı yapılar için Z-skorları sırasıyla -10.19, -10.02'dir. Kabul edilebilir kalıntı ve enerji verimliliği aralığına giren modeller güvenilir kabul edilmiştir. Sonuçlara göre, QMEAN4 değerleri sırasıyla açık ve kapalı yapılar için -2.47, -2.19'dur. Verify3D, bir model proteinin mutlak ikincilve üçüncül katlama davranışını değerlendiren bir doğrulama programıdır; bunu, 3D yapı-dizi ilişkileri bağlamında 3D-1D skorlarını analiz ederek yapmaktadır [73][68]. Amino asitler için eşik değeri ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir değer beklenmekte ve genel basitleştirilmiş skor, yapının geçerliliğini belirlemektedir. 3D-1D skorlarına dayalı değerlendirmede, sırasıyla açık ve kapalı yapılar için değerler sırasıyla 88.82, 93.79'dir. Ramachandran diyagramı, ProCHECK kullanılarak model proteinler için oluşturulmuştur. Tercih edilen bölgedeki rezidü yüzdesi sırasıyla açık ve kapalı yapılar modeller için %88.1, %86.6 değerleridir. Doğrulama değerlerinin değerlendirmesi temel alındığında, tüm bu doğrulama sonuçları, enzimlerin yüksek doğruluk ve güvenilirlikle modellendiğini onaylamaktadır. Detaylı sonuçlar, Tablo 3.4'te sunulmuştur.

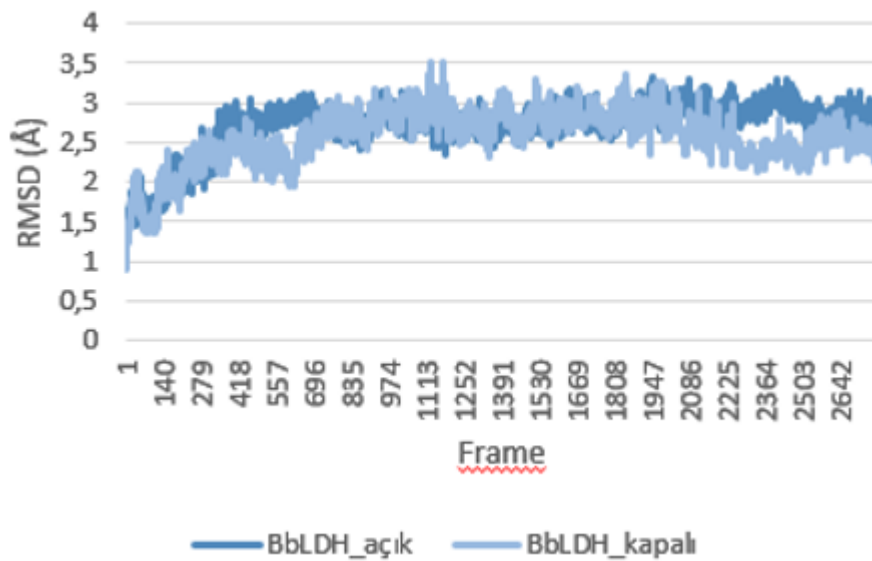
Tablo 3.4. BbigLDH protein modellerine ait minimizasyon sonrası yapılan validasyonlarına ait sonuçların özeti.

		Minimize BbigLDH (açık)	Minimize BbigLDH (kapalı)
ERRAT		90.127	93.949
ProSA	z-skor	-10.19	-10.02
ProCHECK	Tercih edilen bölgedeki rezidüler (A,B,L)	(% 88.1) 244	(% 86.6) 240
	Ayrıca tercih edilen diğer bölge rezidüler (a,b,l,p)	(% 10.8) 30	(% 12.3) 34
	Yaklaşık olarak kabul edilebilir diğer bölge rezidüleri (~a, ~b, ~l, ~p)	(% 0.7) 2	(% 0.7) 2
	Bölgelerin dışında kalan rezidüler	(% 0.4) 1	(% 0.4) 1
Verify3D		Rezidülerin %88.82'si ≥ 0.2 3D-1D skoruna sahip: Geçer	Rezidülerin %93.79'u ≥ 0.2 3D-1D skoruna sahip: Geçer
QMEAN	Qmean4 değeri	-2.47	-2.19
ProQ	Tahmini LGscore	8.456	8.247
	Tahmini MaxSub	-0.553	-0.546

3.4. NAMD ile moleküler dinamik simülasyonu

Homoloji modelleri genellikle tek bir statik konformasyon sunmaktadır. Ancak proteinler dinamik yapılardır ve farklı koşullarda farklı konformasyonlara geçebilmektedirler. Bunun için NAMD kullanılarak alternatif kapalı ve açık BbigLDH yapısı 100 ns simülasyon süresi sonunda elde edilen son pozlarla elde edilmiştir. MDS sonrasında oluşan DCD dosya boyutunun yüksek olmasından dolayı, VMD’de görüntüleme aşamasında stride değeri 9 olarak ayarlanarak atlamalar yapılmıştır. Konsantre edilen yeni DCD dosyası, 2777 çerçeveye (frame) indirgenmiştir.

RMSD kök ortalama kare sapması, simülasyonun başındaki protein zincir yapısı ile simülasyon sonrası yeni protein zincir yapısı arasındaki farkın ölçülmesi için kullanılır. Yani simülasyon ile protein konformasyonundaki değişimlerin analizi için gereklidir. Ölçüm sonrası değerin düşük çıkması yapının kararlılığının yüksek olduğunu gösterir. Yapılan analizlerin sonuçları RMSD ve çerçeve grafiği şeklinde oluşturulmuştur. Şekil 3.9’da ve Tablo 3.5’te yer alan grafikteki RMSD değerlerine bakıldığında, değerlerin 1-3.5 Å arasında olduğu görülmektedir. Açık BbigLDH protein zincir yapısı RMSD değeri öncelikle 418. çerçeve’ye kadar yükselmiş ardından stabil bir şekilde simülasyonu tamamlamıştır. Kapalı BbigLDH yapısı ise 700 çerçeve’ye kadar RMSD değeri yükselmiş ardından stabil olarak tamamlamıştır.

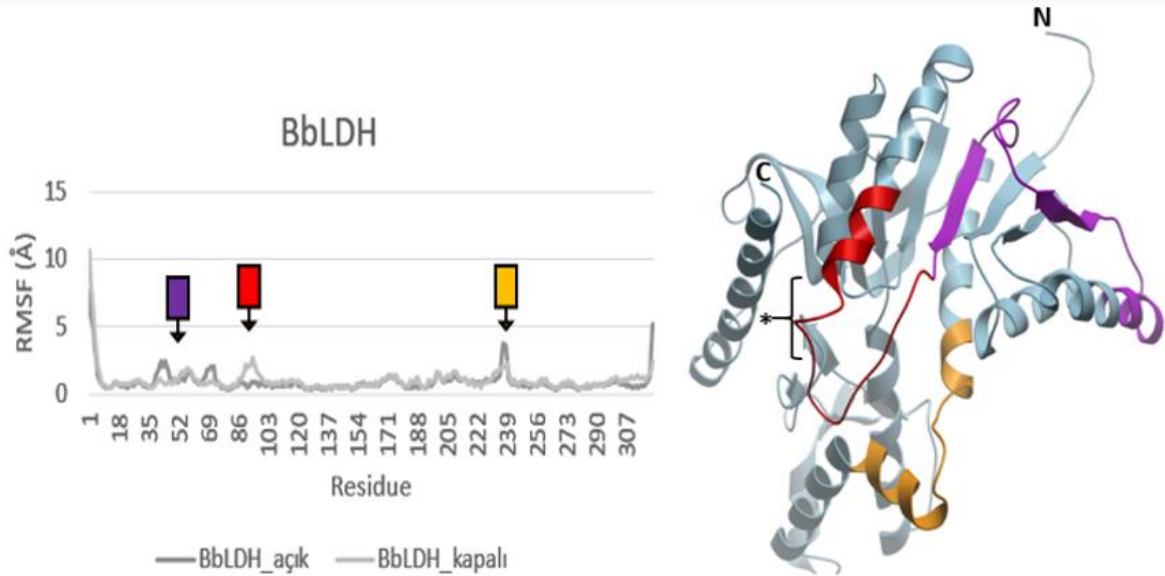


Şekil 3.9. MDS sonucu protein zincir yapısına ait RMSD/çerçeve grafiği.

Tablo 3.5. MDS sonucunda oluşangrafiğin sayısal değerleri.

Model İsmi	Ortalama RMSD (Å)	SD	min	max	num
BbigLDH_açık	2.658	0.220	0.890	3.364	2777
BbigLDH_kapalı	2.635	0.238	0.814	3.254	2777

Root-Mean-Square Fluctuation (RMSF, Å) yani kök ortalama kare dalgalanması, rezidü sayısı grafiği Şekil 3.10'da görülmektedir. Grafiğin üzerinde yer alan renkli kutular, BbigLDH proteinindeki renkli kısımlara denk gelecek şekilde aynı renklerle işaretleme yapılmıştır. Bu analiz sayesinde, simülasyon sırasında dinamik özellik gösteren kısımlar belirlenmiştir. Protein üzerindeki renklendirmeler için Molsoft ICM-Browser64-3.9-2b programı kullanılmıştır (Molsoft, LLC, La Jolla, CA, USA). Şekil 3.10'da yer alan renkli bölgeler RMSF analizlerine göre dinamik özellik gösteren bölgelerdir. Kırmızı substrat bağlanma döngüsünü içine alırken ve sarı renkli protein kısımları da karşıt döngüyü içine almaktadır. Bu iki bölge karşılıklı olup substrat ve kofaktör bağlama özelliği gösteren ve ayrıca aynı bölgelerde katalitik özelliğe sahip spesifik amino asit residülerini içermektedir. Açık yapıda substrat bağlanma döngüsünün hareketli olduğu görülürken kapalı yapıda stabildir. Ancak karşıt döngüyü içine alan sarı bölge her ikisi için dinamiktir.



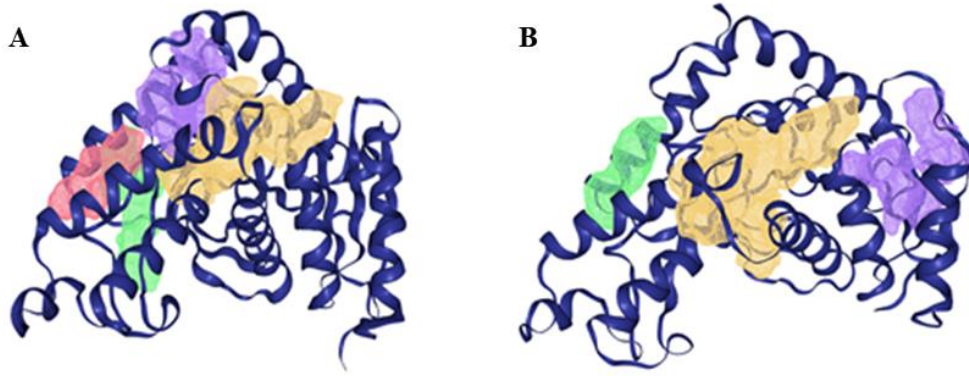
Şekil 3.10. MDS sonrası açık ve kapalı BbigLDH yapıları için RMSF (Å) / rezidü grafikleri. RMSF değerlerinin artış gösterdiği residü aralıklarının hemen üstünde yer alan renk kutucukları, aynı zamanda protein yapısı üzerinde aynı renklendirmeler yapılarak ilgili residü

aralıkları gösterilmiştir. Mor renk (52-69. residüleri), kırmızı renk (86-103. residüleri), sarı renk (222-239. residüleri) temsil etmektedir. Protein yapısında yer alan yıldız (*) işareti, kırmızı renkli gösterimde yer alan ve BbigLDH için önemli olduğu belirtilen 5 amino asitlik insersiyon bölgesini (93-97. amino asitler) göstermektedir. N, proteinin N terminal ucunu; C, proteinin C terminal ucunu göstermektedir.

3.5. DoGSiteScorer ile İlaç Hedeflenebilir Bölgelerin Tespiti

DoGSiteScorer otomatize edilmiş ve ilaç hedeflenebilir bölge tespitine uygun olarak geliştirilmiş yaygın olarak kullanılan bir araçtır. Bahsedilen web sunucusuyla, liganda bağlanma gösterecek olan cep (pocket) tahmini, cebin karakterizasyonu ve ilaç için hedeflenebilir bölge tespiti gibi birçok sonuç elde edilebilmektedir (A. Volkamer vd. 2012). Tezde yer alan açık ve kapalı BbigLDH yapılarına yönelik olarak hangi bölgelerin ilaç hedeflenebilir olduğunu ilerleyen figürlerde (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12) ve ceplere dair değerler tablolarda (Tablo 3.6-3.13) gösterilmiştir.

Açık BbigLDH yapıları incelendiğinde (Şekil 3.11), MDS öncesi ve sonrası modeller için sarı renkli cep bölgelerinin ilaçlanabilirlik açısından ortaklık gösterdiği açıkça görülmektedir. Ayrıca aynı cep bölgesine ait ilaç skorları diğer cep bölgelerine göre daha yüksek değerlerle ifade edilmektedir (Tablo 3.6 ve 3.8). Buna ek olarak sarı renkli cep bölgelerinin, tahmini olarak ligandla diğer ceplere nazaran daha yüksek oranda etkileşebildiğini gösteren değerlere sahip olduğu da görülmektedir. MDS öncesi aktif bölge sarı ve mor ceplerken, MDS sonrası sadece sarı cep ile gösterilmiştir. MDS öncesi ve sonrası için aktif bölge ilaçlanabilirliğinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durumda her iki protein yapısında da P_0 sarı cep bölgeleri, tahmini ilaçlanabilir cep olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.



Şekil 3.11. BbigLDH açık modelinin üç boyutlu yapısı üzerinde yer alan ilaç-hedeflenebilir bölgelerinin DoGSiteScorer ile tahmini olarak hesaplanmış konumlarının gösterimi. DogSiteScorer sunucusunda görüntülenen, tahmini cepler; (A) MDS öncesi için P_0 (sarı) aktif bölge, P_1 (mor) aktif bölge, P_2 (yeşil), P_3 (kırmızı) oluşturan bölgeler, (B) MDS sonrası P_0 (sarı), P_1 (mor) ve P_2 (yeşil) bölgeler gösterilmiştir.

Tablo 3.6. BbigLDH açık model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.

Cepler	Toplam Hacim	Yüzey Alanı	İlaç Skoru	Basit Skor
P_0 (sarı)	989.76	1080.07	0.81	0.6
P_1 (mor)	396.74	709.68	0.73	0.2
P_2 (yeşil)	385.28	558.47	0.75	0.27
P_3 (kırmızı)	363.84	540.77	0.62	0.21

Tablo 3.7. BbigLDH açık model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.

Parametreler	Cepler			
	P_0	P_1	P_2	P_3
Hacim ($\text{\AA}^3$)	986.76	396.74	385.28	363.84
Yüzey ($\text{\AA}^2$)	1080.07	709.68	558.47	540.77
Derinlik ($\text{\AA}$)	21.3	16.76	17.58	13.63
H-bağı akseptörü	62	41	25	25
H-bağı donörü	24	10	9	8
Hidrofobik Etkileşimler	37	23	36	23
Hidrofobisite	0.30	0.31	0.51	0.41
Negatif Amino Asit	0.05	0.19	0.04	0.28
Pozitif Amino Asit	0.05	0.19	0.19	0.17
Polar Amino asit	0.47	0.22	0.27	0.17
Apolar Amino asit	0.42	0.41	0.50	0.39

Tablo 3.8. BbigLDH açık model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.

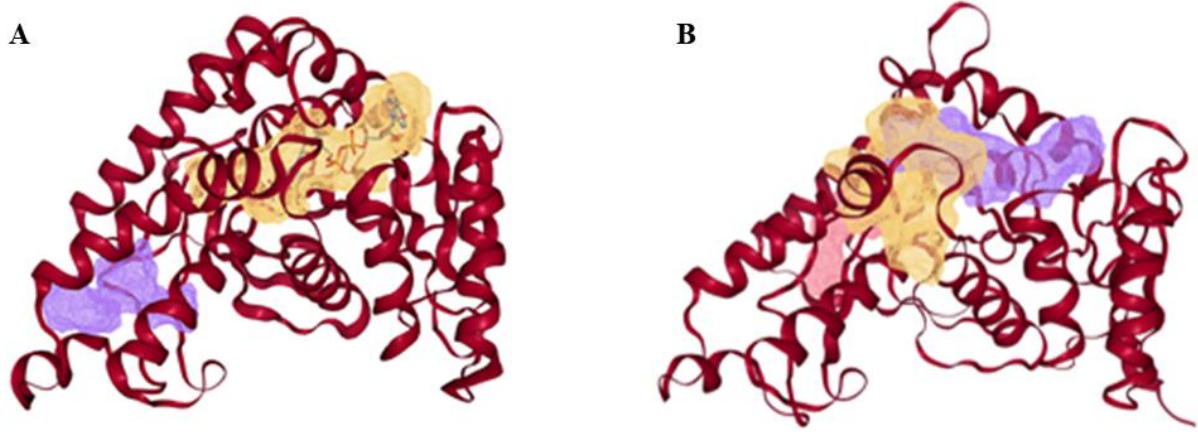
Cepler	Toplam Hacim	Yüzey Alanı	İlaç Skoru	Basit Skor
P_0 (sarı)	1493.8	1519.31	0.81	0.6
P_1 (mor)	447.87	863.21	0.83	0.26
P_2 (yeşil)	296.58	479.48	0.67	0.13

Tablo 3.9. BbigLDH açık model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.

	Cepler		
Parametreler	P_0	P_1	P_2
Hacim ($\text{\AA}^3$)	1493.38	447.87	296.58
Yüzey ($\text{\AA}^2$)	1519.31	863.21	479.48
Derinlik ($\text{\AA}$)	24.59	21.31	16.30
H-bağı akseptörü	86	48	24
H-bağı donörü	30	22	4
Hidrofobik Etkileşimler	48	38	17
Hidrofobisite	0.29	0.35	0.38
Negatif Amino Asit	0.08	0.06	0.29
Pozitif Amino Asit	0.05	0.06	0.12
Polar Amino asit	0.44	0.34	0.18
Apolar Amino asit	0.44	0.54	0.41

Kapalı BbigLDH yapıları incelendiğinde (Şekil 3.12), MDS öncesi ve sonrası modeller için sarı renkli cep bölgelerinin ilaçlanabilirlik açısından ortaklık gösterdiği açıkça görülmektedir. Yalnızca MDS sonrası mor cepte ilaçlanabilir özellik taşımaktadır. Ayrıca aynı cep bölgesine ait ilaç skorları diğer cep bölgelerine göre daha yüksek değerlerle ifade edilmektedir (Tablo 3.10 ve 3.12). MDS sonrası kapalı yapılarda aktif bölge ilaçlanabilirliği değişmemiştir. Buna ek olarak sarı renkli cep bölgelerinin, tahmini olarak ligandla diğer ceplere nazaran daha yüksek oranda etkileşebildiğini gösteren değerlere sahip olduğu da görülmektedir. Bu durumda her iki protein yapısında da P_0 sarı cep bölgeleri, tahmini ilaçlanabilir cep olarak değerlendirilmesi

gerekmektedir. Benzer durumun kapalı BbigLDH modellerinin her ikisinde de P_0 sarı renkle temsil edilen cepler içinde geçerli olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda yanaştırma çalışmaları için aktif bölge olan NADH ve pirüvatın bağlandığı bölge ilaçlanabilir bölge olmasından dolayı seçilmiştir.



Şekil 3.12. BbigLDH kapalı modelinin üç boyutlu yapısı üzerinde yer alan ilaç-hedeflenebilir bölgelerinin DoGSiteScorer ile tahmini olarak hesaplanmış konumlarının gösterimi. DogSiteScorer sunucusunda görüntülenen, tahmini cepler; (A) MDS öncesi için tahmini cep P_0 (sarı), P_1 (mor) bölgeler; (B) MDS sonrası tahmini cep P_0 (sarı), P_1 (mor) ve P_2 (kırmızı) bölgeler gösterilmiştir.

Tablo 3.10. BbigLDH kapalı model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.

Cepler	Toplam Hacim	Yüzey Alanı	İlaç Skoru	Basit Skor
P_0 (sarı)	926.34	1015.54	0.83	0.59
P_1 (mor)	300.48	446.48	0.71	0.1

Tablo 3.11. BbigLDH kapalı model için MDS öncesi DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.

	Cepler	
Parametreler	P_0	P_1
Hacim ($\text{\AA}^3$)	926.34	300.48
Yüzey ($\text{\AA}^2$)	1015.54	446.65
Derinlik ($\text{\AA}$)	28.14	17.24
H-bağı akseptörü	59	23
H-bağı donörü	28	7
Hidrofobik Etkileşimler	49	12
Hidrofobisite	0.36	0.29
Negatif Amino Asit	0.06	0.05
Pozitif Amino Asit	0.06	0.14
Polar Amino asit	0.42	0.27
Apolar Amino asit	0.46	0.55

Tablo 3.12. BbigLDH kapalı model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç hedeflenebilir protein cep tahminleri.

Cepler	Toplam Hacim	Yüzey Alanı	İlaç Skoru	Basit Skoru
P_0 (sarı)	1036.1	1633.57	0.81	0.62
P_1 (mor)	651.07	885.09	0.85	0.42
P_2 (kırmızı)	249.09	509.17	0.54	0.16

Tablo 3.13. BbigLDH açık model için MDS sonrası DoGSiteScorer ile ilaç-hedeflenebilir ceplerin ayrıntılı fizyokimyasal parametreleri.

	Cepler		
Parametreler	P_0	P_1	P_2
Hacim ($\text{\AA}^3$)	1036.10	651.07	249.09
Yüzey ($\text{\AA}^2$)	1633.57	885.09	509.17
Derinlik ($\text{\AA}$)	30.41	22.36	13.25
H-bağı akseptörü	79	40	16
H-bağı donörü	33	18	4
Hidrofobik Etkileşimler	59	34	27
Hidrofobisite	0.35	0.37	0.57
Negatif Amino Asit	0.12	0.10	0.13
Pozitif Amino Asit	0.06	0.03	0.07
Polar Amino asit	0.42	0.39	0.33
Apolar Amino asit	0.40	0.48	0.47

3.6. X-ray Kristalogrofisi ile Yapısı Bilinen Apikompleksan LDH Protein Yapıları ve İnhibitörleri

Apikompleksan LDH yapılarına yönelik ilaç adaylarının belirlenmesinde kullanılan moleküler yanaştırma yönteminde protein yapısı bilinmese de hesaplamalı-biyoloji yaklaşımına yönelik birçok proses araştırmalara büyük katkı sağlamaktadır. Ancak günümüzde X-ray kristalogrofi yöntemi kullanılarak protein yapısı bilinen ve buna ek olarak belirlenen inhibitörlerin protein yapısına bağlı olarak bulunması diğer proseslere göre daha maliyetli ve zordur. Bu nedenle günümüzde buna yönelik kısıtlı miktarda çalışma mevcuttur. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla PflLDH yapısı ve bazı inhibitörlerin etkileşimi PDB yapısıyla analiz edilebilmektedir (Tablo 3.14).

Tablo 3.14. PDB veri bankasında kristal yapıları bilinen *P. falciparum* LDH yapısında bulunan inhibitörlere ait veriler.

PDB NO/ Form	Ligand	Çözünürlük (Å)	Kaynak
1CET/ Açık	CLQ	2.05	(Read vd. 1999)
1T26/ Kapalı	GBD	1.80	(Cameron vd. 2004)
1T24/ Kapalı	OXQ	1.70	(Cameron vd. 2004)
1LDG/ Kapalı	OXM	1.74	(Dunn vd. 1996)
1T25/ Kapalı	GAG	1.90	(Cameron vd. 2004)
1U5A/ Açık	BIK	1.80	(Connors vd. 2005)
1U4O/ Açık	NDD	1.70	(Connors vd. 2005)
1XIV/ Açık	RB2	1.70	(Connors vd. 2005)
1U4S/ Açık	BIH	2.00	(Connors vd. 2005)

Kristal yapısı bilinen PflLDH ve homoloji modelleme yöntemiyle elde edilen BbigLDH yapılarına ait proteinler süperimpozisyon (superimpose) edilmiştir. Bu işlem

sonucunda inhibitörlerin bağlandığı bölgeler her iki yapıda karşılık gelen rezidülerle eşleştirilmiş ve bu rezidüler PyMOL yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. (Tablo 3.15). Ayrıca, iki protein yapısındaki aynı rezidü numarasında yer alan ancak farklılık gösteren amino asitler belirlenmiştir. Farklı rezidüler, özellikle bağlanma bölgelerindeki polar veya hidrofobik amino asit değişiklikleri, inhibitörün bağlanma afinitesini etkileyebilir. İlgili değişimlerin fonksiyonel etkileri, bağlanma bölgesindeki etkileşimlerin detaylı incelenmesiyle belirlenebilir. Katalitik rezidülerde korumanın olduğu görülmüştür (Şekil 3.15). İlerleyen sonuçlarda burada yer alan ligandlar BbigLDH yapısına da yansıtılarak daha detaylı olarak aktif bölgeyle olan etkileşimleri gösterilmiştir.

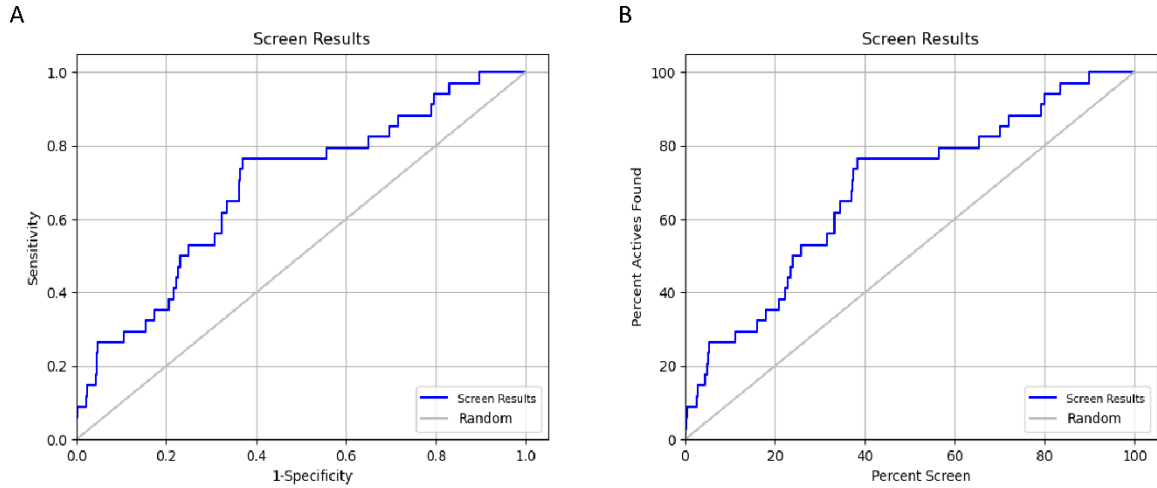
Tablo 3.15. Kristal yapısı bilinen LDH yapısı üzerinde yer alan inhibitörlerin etkileştiği rezidüleri karşılık olarak BbigLDH yapısında bulunan rezidülerin gösterimi. Siyah renklendirilen amino asit kısaltılmış harfleri PflDH, kırmızı renkte belirtilen amino asit simgeleri ise BbigLDH için kullanılmıştır.

PDB NO	Ligand	Rezidüler
1CET	CLQ	V26 ^I , G27, F52, D53, I54, Y85, A98, F100, K118, I119, E122 ^T , I123
1T24	OXQ	W107, R108, N140, L167, D168, R171, H195, A236 ^G , S245 ^T , P246 ^G , P250
1T25	GAG	W107, R109, N140, L167, D168, R170, H195, A236 ^G , S245 ^T , P246 ^G , P250
1T26	GBD	T101 ^A , W107, R108, N140, L167, D168, R171, H195, A236 ^G , S245 ^T , P246 ^G , P250
1U4O	NDD	G29, M20 ^N , I31, G32, V138 ^I , L163 ^M , L167, R171, H195, A236 ^G , S245 ^T , P246 ^G , Y247, P250.
1U4S	BIH	R109 ^P , N140, P141, L167, D168, R171, H195, G196, T235 ^S , A236 ^G , P246 ^G , P250.
1U5A	BIK	N140, P141, L167, D168, R171, H195, G196, N197 ^D , A236 ^G , P246 ^G , P250.
1XIV	RB2	V26 ^I , G27, F52, D53, I54, Y85, A98, G99, F100, I119, E122 ^T , I123.

3.7. Zenginleştirme Hesaplamaları (Enrichment Calculations)

Zenginleştirme hesaplamasının sonuçları, sanal tarama veya ilaç keşfi deneylerinde bir hesaplama modeli veya algoritmanın etkinliği hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. Model, 34 bilinen aktif bileşiği içeren toplam 1000 liganddan oluşan bir veri seti kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.13 ve Tablo 3.16). Amacı, modelin

aktif bileşikler doğru bir şekilde sıralama ve bunları sıralamanın en üst kısmında zenginleştirme kapasitesini belirlemektir. Elde edilen BEDROC değerleri 0.229 ile 0.332 arasında değişmiş ve bu durum modelin orta düzeyde bir zenginleştirme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.13. (A) İlaç keşfi sürecinde sanal tarama için kullanılan hesaplama modelinin sınıflandırma performansını gösteren Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic, ROC) eğrisi. B) Sanal tarama sırasında sıralanmış listede aktif bileşiklerin birikimini gösteren taranan bileşik yüzdesine ilişkin grafik.

Tablo 3.16. Zenginleştirme rapor sonuçları (1122 sahte + 34 aktif set).

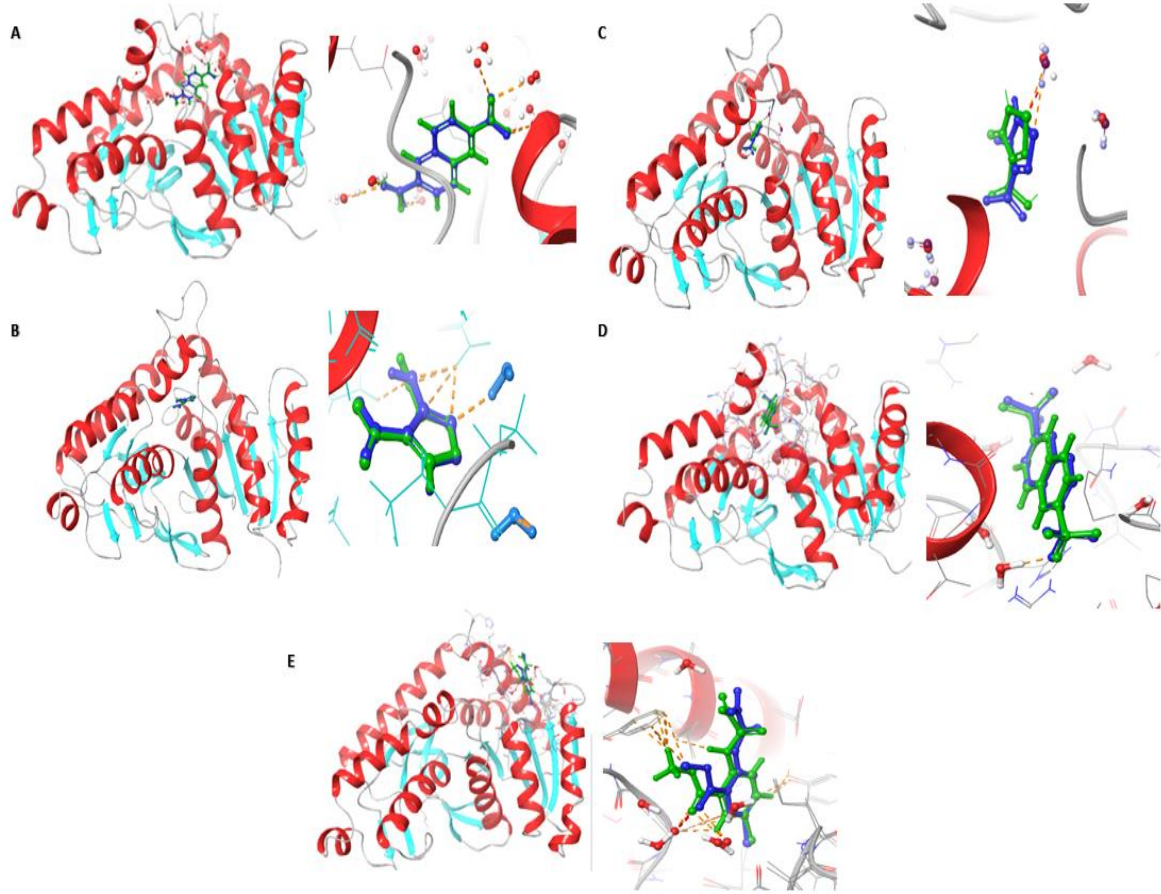
Yanıtıcı sonuçların ilk N%'lik dilimindeki aktiflerin sayısı ve yüzdesi					
% Sahteler	1%	2%	5%	10%	20%
# Aktifler	3	3	9	9	12
% Aktifler	8.8	8.8	26.5	26.5	35.3
Count and percentage of actives in top N% of results.					
% Sahteler	1%	2%	5%	10%	20%
# Aktifler	3	3	7	9	12
% Aktifler	8.8	8.8	26.5	26.5	35.3
Sonuçların ilk N%'lik dilimindeki aktiflerin sayısı ve yüzdesi					
% Örnek	1%	2%	5%	10%	20%
EF	9	4.5	4.1	2.7	1.8
Validasyon parametreleri					
ROC	RIE	AUAC	BEDROC (alpha)		
			160.9	20.0	8.0
0.69	3.43	0.68	0.332	0.229	0.320

Ayrıca, modelin genel sınıflandırma doğruluğunu değerlendirmek için alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrisi ve buna bağlı eğri altındaki alan (AUAC) analiz edilmiştir. ROC değeri 0.69 olarak bulunmuş, bu da modelin aktif ve aktif olmayan bileşikleri belirli bir düzeyde ayırt edebilme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Birikim eğrisi altındaki alan (AUAC) değeri 0.68 olup, tarama sürecinin erken aşamalarında önemli sayıda aktif bileşiğin tanımlandığını göstermektedir. RIE (Yeniden Zenginleştirme İndeksi) değeri ise 3.43 olarak hesaplanmış, bu da modelin rastgele bir seçimden daha iyi performans gösterdiğini ancak daha fazla geliştirmeye ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

3.8. Kontrol Moleküler Yanaştırma Yöntemi

Hesaplamalı-biyoloji metodlarında kullanılacak olan moleküler yanaştırma prosedürünün validasyonu, yöntemin geçerliliği ve güvenilirliği için gerekli bir ön adımdır. Kristal yapısı bilinen PflDH yapılarında yer alan inhibitörlerin, seçilen moleküler yanaştırma prosedürüyle yeniden orijinal protein yapısına yanaştırma işleminin yapılması gerekmektedir. Prosedürün doğruluğunun sağlandığı kontrol işleminde sonuç olarak elde edilen protein yapısı ile orijinal protein yapısı süperimpozisyonuyla protein yapısı, ligandın bağlanma modu ve RMSD değerleri incelenmektedir. RMSD değerlerinin düşük olması iki yapı arasındaki benzerliğin yüksekliğini ifade etmektedir.

Süperimpoz görüntüleri incelendiğinde kristal yapılarıdaki ligandlarla moleküler yanaştırma sonrası ligandların görüntüsü yüksek oranda çakışmaktadır (Şekil 3.14). RB2 hariç diğer ligandlar aktif bölgede bağlanma göstermektedir. Yanaştırma sonrası ligandlar orijinal yapıda olduğu gibi aynı bölgede konumlanmışlardır. Yapıların hiçbirinde kofaktör bulunmamaktadır, manuel olarak silinmiştir. Ayrıca ligand RMSD değerleri incelendiğinde GBD ve BIH hariç ligand RMSD'leri düşüktür. Ayrıca Glide score değerleri de GBD ve BIH dışında düşüktür, iyi bağlanma gösterdikleri görülmektedir (Şekil 3.17). Bu durumda, genel olarak kullanılan moleküler yanaştırma prosedürünün yapı-temelli sanal tarama yöntemi için uygun olduğuna karar verilmiştir.



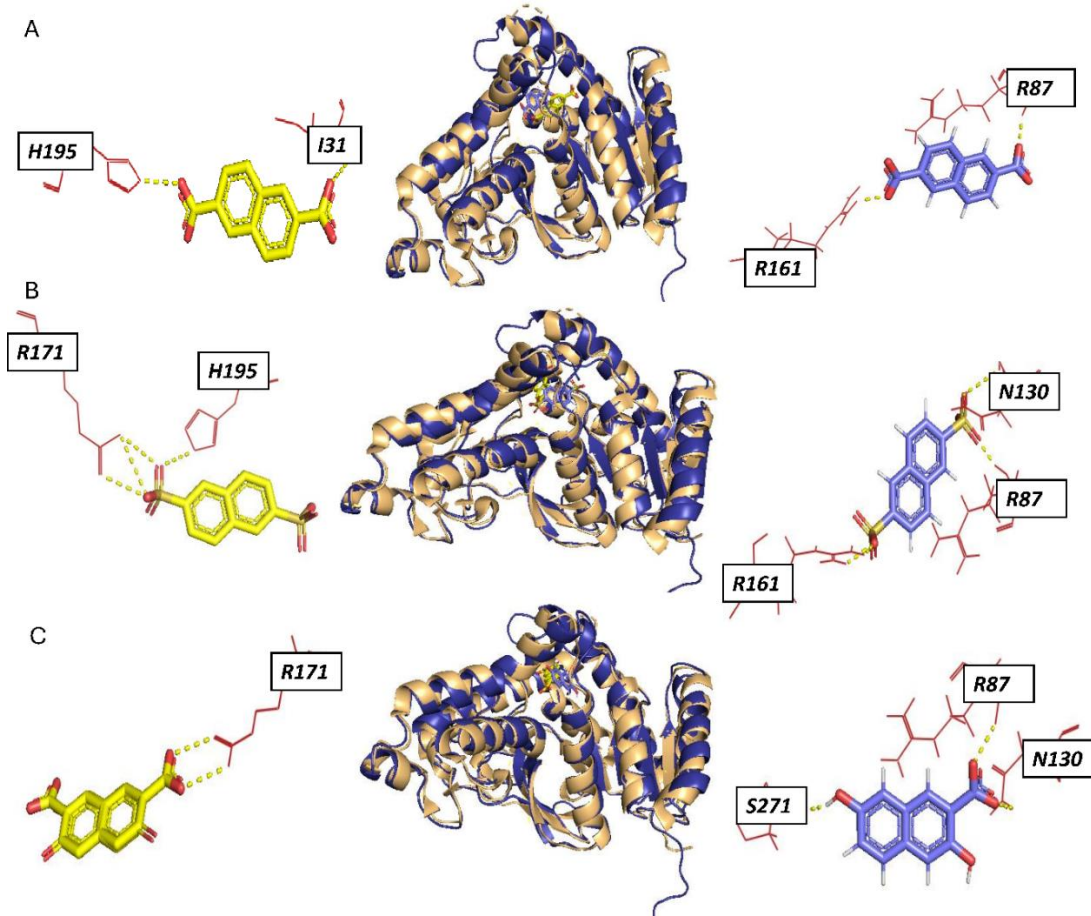
Şekil 3.14. Superimpoz görüntüleri (PDB ID: Ligand); (A) 1U4O: NDD, (B) 1T25: GAG, (C) 1T26: GBD, (D) 1U4S: BIH, (E) 1XIV: RB2. Görüntülerde yer alan yeşil renk gösterilen, moleküler yanaştırma sonrası oluşan ligandı; mavi renkle gösterilen ise kristal yapıda yer alan ligandı temsil etmektedir.

Tablo 3.17. Kontrol dock için kullanılan protein PDB yapılarında yer alan referans ligandlar ile yeniden proteine yanaştırılması sonrası oluşan protein yapısında yer alan ligandın RMSD, glide score ve glide emodel (kcal/mol) değerleri.

PDB NO	Ligand	RMSD (Å)	Glide score (kcal/mol)	Glide emodel (kcal/mol)
1U4O	NDD	0.1434	-7.622	-76.554
1T25	GAG	0.2141	-7.895	-32.720
1T26	GBD	1.0640	-4.931	-37.061
1U4S	BIH	1.2671	-5.396	-66.093
1XIV	RB2	0.3290	-6.123	-48.393

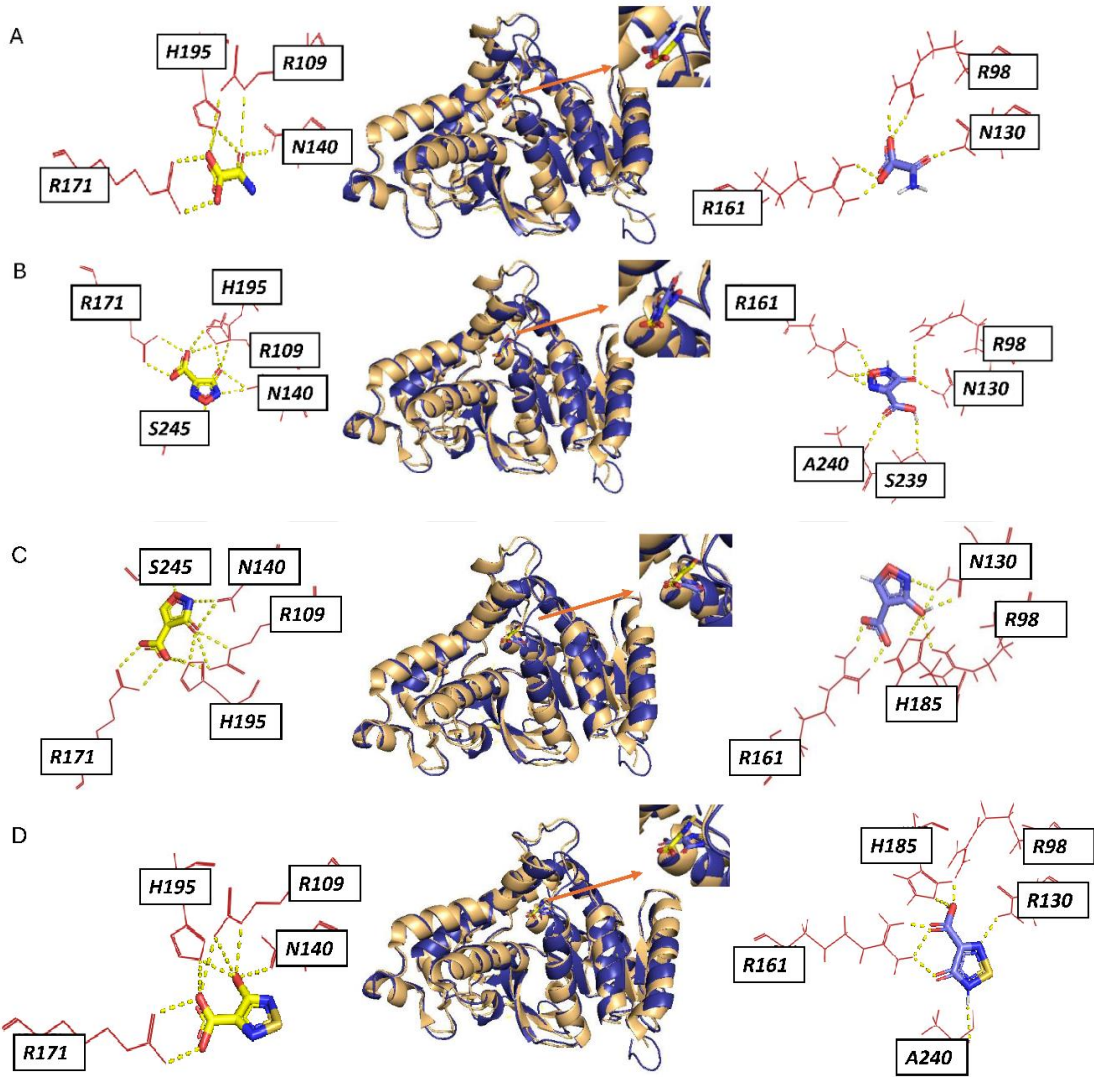
3.9. BbigLDH ile Bilinen İnhibitörlerin Moleküler Yanaştırma İşlemi ve Orjinal Kristal Yapılarıyla Karşılaştırılması

Açık ve kapalı BbigLDH yapılarına, PDB yapısı bilinen açık (1U4O, 1U4S, 1U5A) ve kapalı PflDH (1T24, 1T25, 1T26 ve 1LDG) yapılarında bulunan inhibitörler (NDD, BIH, BIK, OXM, OXQ, GBD, GAG) yanaştırılmıştır. Orjinal PDB yapılarının inhibitörle etkileşimi ile BbigLDH yapılarının aynı inhibitörle etkileşimi gösterilmiştir. Açık PflDH yapılarının substrat spesifik döngü kısmında stabil bir bölge olmamasından kaynaklı eksikliğin olması açık BbigLDH yapısıyla farklılıkların olduğu görülmektedir. Ayrıca açık BbigLDH yapısında ligandla etkileşen ve aynı zamanda bazılarında katalitik özelliği olduğu bilinen rezidülerin R87, I128, N130, R161(171) olduğu görülmektedir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Açık BbigLDH (lacivert) ile kristal yapıları (turuncu) bulunan ligandların superpozisyon görüntüleri ve bu görüntülerin solunda yer alan ligandlar kristal yapıyla olan bağlanma modlarını ve sağda bulunan ligandlar ise açık BbigLDH ile gösterdiği bağlanma modlarını göstermektedir. (Kristal yapı PDB:BbigLDH:Ligand) (A) 1U4O:BbigLDH:NDD, (B) 1U4S:BbigLDH:BIH, (C) 1U5A:BbigLDH:BIK.

Kapalı BbigLDH ve kapalı PflLDH yapılarının süperimpoz görüntüleri incelendiğinde (Şekil 3.16), orijinal PDB yapılarında substrat spesifik döngü kısmındaki kararlılığın olması (kristalogrofi yapılarında eksik aminoasitin olmamasından dolayı) BbigLDH-PflLDH inhibitör moleküler yanaştırma görüntülerinde birbirine daha yakın sonuçlar elde edilmiştir. Kapalı BbigLDH için ligandla etkileşim gösteren rezidülerden en önemlilerinin R98(109), N130, R161(171), H185(195), S239, A240 olduğu görülmektedir.



Şekil 3.16. Kapalı BbigLDH (lacivert) ile kristal yapıları (turuncu) bulunan ligandların superpozisyon görüntüleri ve bu görüntülerin solunda yer alan ligandlar kristal yapıyla olan bağlanma modlarını ve sağda bulunan ligandlar ise kapalı BbigLDH ile gösterdiği bağlanma modlarını göstermektedir. (Kristal yapı PDB:BbigLDH:Ligand) (A) 1LDG:BbigLDH:OXM, (B) 1T24:BbigLDH:OXQ, (C) 1T25:BbigLDH:GAG, (D) 1T26:BbigLDH:GBD.

BbigLDH-PfLDH inhibitör moleküler yanaştırma işlemi sonrasında elde edilen yapıların protein-protein ve ligand-ligand yapıları arasındaki benzerlikler RMSD değerleri olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.18). Kapalı yapılara ait benzerliklerin daha yüksek olduğu RMSD değerlerinin düşük çıkmasından da görülmektedir. Ayrıca Glide XP yanaştırma sonuçları değerlendirildiğinde, Glide HTVS yanaştırma sonuçlarının değerlendirilmesi için tercih edilecek baraj değeri olarak yanaştırma skoru için -7.00 kcal/mol değeri belirlenmiştir.

Tablo 3.18. PDB yapıları bilinen açık (1U4O, 1U4S, 1U5A) ve kapalı PfLDH (1T24, 1T25, 1T26 ve 1LDG) yapılarında bulunan ligandların, BbigLDH ile yanaştırılması sonucu elde edilen yeni yapılar ile kristal yapıların karşılaştırılması.

PDBLigand	RMSD (Protein - Protein) Å	RMSD (Ligand - Ligand) Å	Docking score (kcal/mol)	Glide emodel (kcal/mol)
1LDG/OXM	0.7586	0.860	-3.907	-23.406
1T24/OXQ	0.1999	0.876	-5.318	-34.008
1T25/GAG	0.5664	0.2555	-5.695	-25.313
1T26/GBD	1.0476	0.9406	-5.512	-35.190
1U4O/NDD	0.844	0.7813	-6.188	-39.836
1U4S/BIH	0.830	0.8819	-6.913	-49.134
1U5A/BIK	0.822	0.7874	-5.920	-39.236

3.10. Yüksek Verimli Sanal Tarama (HTVS)

HTVS büyük ligand kütüphanelerinin hızlıca taranması için kullanılan bir metottur. Sınırlı konformasyonel örneklemeye sahiptir. Standart precision (SP- Standart hassasiyette) yanaştırma, kalitesi bilinmeyen çok sayıda ligandın taranmasında kullanılmaktadır. Extra-precision (XP- Ekstra hassasitte) yanaştırma daha güçlü ve daha ayırt edici bir yöntem olup SP yanaştırma yöntemine göre daha uzun sürmektedir. XP, SP yanaştırması ile yüksek puanlı olduğu belirlenen ligand pozlarını kullanmak üzere tasarlanmıştır. Hazırlanan ligand kütüphanesine (567,760 ligand) Glide manuelinde önerildiği üzere VSW (Sanal Tarama Akışı-Virtual Screening Workflow) metodunda HTVS sonuçlarının en iyi %10'luk diliminin seçilmesinin ardından, SP yanaştırma işlemi uygulanarak en iyi %10'luk dilimdeki sonuçların XP yanaştırma yöntemiyle yeniden moleküler yanaştırma yapılmasıyla en iyi 100 ligand poz seti elde edilmiştir. Ardından listedeki ligandların, belirlenen aktif bölge rezidüleriyle olan etkileşimlerine

bakılmıştır. BbigLDH yapısına PflLDH inhibitörlerinin moleküler yanaştırılmasıyla belirlenen rezidülerle etkileşim göstermeyen ligandlar elenmiştir. Böylece 256 bileşik kalmıştır.

Ardından Schrödinger Qikprop modülü kullanılarak ADME analizi yapılmıştır. Sonuçlar için manuelde belirtilen referans değerler arasında yer alan inhibitör adayları belirlenmiştir. Ligandların ilaç adayı olabilmesi için birçok kriter ve uygun değer aralığı mevcuttur. Bunlardan başlıcası Lipinsky'nin temel 5 prensibidir ($MA < 500$ g/mol, $CLogP < 5$, Hbağ donörü < 5 , Hbağ alıcısı < 10) (Lipinski 2000). Buna göre moleküler ağırlık 500 kDa'dan az olmalıdır. Hidrojen bağ donör sayısı 5'ten az olmalıdır. Hidrojen bağ alıcı sayısı 10'dan az olmalıdır. ClogP (oktanol-su dağılım katsayısı) 5'ten küçük değerde olmalıdır. Bunun yanı sıra, suda çözünürlüğünü ifade eden LogS için -6.5 - 0.5 değer aralığı (Jorgensen ve Duffy 2000), oktanol/ su ayırım katsayısını ifade eden $LogP_{o/w}$ (Jorgensen ve Duffy 2000) için -2.0 – 4 değer aralığı dikkate alınmaktadır. İlaç olma özellikleri için ayrıca HERG K + kanallarının tıkanması için öngörülen IC50 değerini ifade eden Log HERG (Cavalli vd. 2002), öngörülen kan/beyin bariyer katsayısı Log BB (Luco 1999), insan serum albüminine bağlanma kapasitesi LogKhsa (Colmenarejo, Alvarez-Pedraglio, ve Lavandera 2001), bağırsak ilaç emiliminde dikkate alınan Caco-2 hücre geçirgenliği (Yazdanian vd. 1998), insan oral emilim yüzdesi gibi kriterlere de dikkat edilmektedir. Bileşiklerin seçilimindeki belirlenen değer aralıkları; Plog değerleri hem hERG kanal blokajı hem de serum albümin bağlanması için referans aralıkları içinde olmalıdır. HERG K+ kanallarını bloke etme için tahmini IC50 değeri kabul edilen aralık içinde olmalı ve -5.0'den büyük değerler olmalıdır. Tahmini Caco-2 hücre geçirgenliği değerlendirilmelidir, eğer 25'ten küçükse düşük geçirgenlik, 500'den büyükse yüksek geçirgenlik göstermelidir. Tahmini kan-beyin bariyeri geçirgenlik katsayısı -3.0 ila 1.2 aralığında olmalıdır. İnsan serum albüminine bağlanma kapasitesi, -1.5 ila 1.5 aralığında ise uygun kabul edilmektedir. Tahmini insan oral absorpsiyonu, 0 ila 100 arasında bir ölçekte değerlendirildiğinde, %70'in üzerinde ise kabul edilmektedir.

Bu değerler dikkate alındığında açık BbigLDH (53), kapalı BbigLDH (36), MDS sonrası açık BbigLDH (11), MDS sonrası kapalı BbigLDH (33) olmak üzere toplam 133 bileşik elde edilmiştir (Tablo ek 1.1-1.4).

3.11. QM-Polarize Ligand Yanaştırma Yöntemi

Kuantum Mekanik Polarize Ligand Yanaştırma yönteminde, ligandın sahip olduğu kısmi yükler yerine kuantum mekanik hesaplama sayesinde türetilen yüklerin değiştirilmesiyle reseptöre yeniden yanaştırma işleminin gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemle ligandın sahip olduğu yüklerin reseptör tarafından polarizasyonu hesaba katılır ve aynı ligandın başka yük içeren türevleriyle yeniden kenetlenmeleri Glide XP yanaştırma metodunda daha güvenilir sonuçların elde edilmesi sağlanmaktadır. Protokolde, her bir ligand için en iyi poz seti hazırlayarak, yükleri QM/MM hesaplamasının ardından her bir poz için yeniden yanaştırma yapılmaktadır. Son adımda en iyi pozları seçerek son bir set sunmaktadır. QPLD her bir ligandı alt işe ayırıp tüm protokolü her bir alt işe uygulamaktadır. QSite (Jaguar) hesaplamaları için tek bir CPU kullanılmaktadır. CPU sayısının katlarında alt iş sayısını ayarlamak daha dengeli yük dengelemesi sağlamaktadır. Tez çalışmasında protein yapıları için daha önce belirlenmiş olan reseptör grid konumu kullanılmıştır. QSite (Jaguar) tarafından QM yükleri yeniden hesaplanarak yeniden yanaştırılan her bir liganda ait poz setinden Glide emodel değeri en düşük olanları seçilmiştir. Ardından XP Gscore değerlerine göre -7.00 kcal/mol ve üstü değere sahip sonuçlar tüm modeller için en düşüktten başlayarak sıralanmıştır (Tablo 3.19).

Sonuç olarak açık BbigLDH (29), kapalı BbigLDH (1), MDS sonrası açık BbigLDH (19), MDS sonrası kapalı BbigLDH (21) olmak üzere toplam 70 bileşik elde edilmiştir.

Tablo 3.19. Kuantum Mekanik Polarize Ligand Yanaştırma (QPLD) yöntemine ait sonuçların en düşük XP Gscore (kcal/mol) değerine göre sıralanması.

BbigLDH açık			BbigLDH açık MD sonrası			BbigLDH kapalı MD sonrası		
Catalog ID	XP GScore	glide emodel	Catalog ID	XP GScore	glide emodel	Catalog ID	XP GScore	glide emodel
Z2752838050	-8.972	-71.495	Z2390808760	-7.231	-57.681	Z2382289374	-8.864	-69.994
Z2912483577	-8.795	-81.850				Z2634130261	-8.605	-69.214
Z1531526443	-8.706	-85.465	BbigLDH kapalı			Z826473056	-8.530	-76.748
Z3071641271	-8.660	-71.977	Z973658262	-9.182	-81.550	Z1478445725	-8.515	-71.088
Z2357820281	-8.642	-58.407	Z19650139	-9.111	-64.837	Z1640818270	-8.473	-85.413
Z1591490121	-8.533	-75.961	D2033086	-8.927	-59.395	Z2229179035	-8.461	-68.910
Z357158808	-8.474	-94.279	Z2400537901	-8.919	-63.588	Z733555858	-8.403	-82.870
Z2201943136	-8.443	-62.546	Z1956090322	-8.636	-61.248	Z30900215	-8.319	-71.900
Z1538316765	-8.439	-85.026	D7117850637	-8.616	-38.905	K784-2016	-8.170	-84.113
Z962973942	-8.419	-75.803	Z1616793138	-8.555	-56.865	Z1246322905	-8.140	-73.291
Z1609497731	-8.372	-67.963	Z370733756	-8.467	-65.667	Z2052340459	-8.138	-64.685
Z2636996344	-8.362	-70.064	Z509196536	-8.389	-81.972	Z595072666	-8.112	-70.901
Z2959426649	-8.281	-70.811	Z112058834	-8.377	-77.787	Z1632697137	-8.080	-76.646
Z2060912694	-8.274	-67.169	Z1160802236	-8.329	-68.434	Z2953881032	-7.972	-67.074
Z1599321666	-8.176	-73.548	Z1436595596	-8.287	-59.385	Z2373310039	-7.958	-79.034
Z2064093654	-7.933	-62.064	Z604033838	-8.250	-83.590	Z2433250026	-7.783	-71.626
Z2063989764	-7.750	-68.909	Z1609738390	-8.112	-61.449	Z1840256745	-7.748	-73.068
Z2390800433	-7.638	-79.017	Z928443586	-8.072	-64.279	Z1850128238	-7.545	-78.708
Z2755571099	-7.525	-67.317	Z1609524968	-8.025	-53.813	Z278525320	-7.480	-70.898
Z1730412966	-7.458	-57.069	Z1253206711	-7.731	-75.824	Z1875223490	-7.307	-74.537
Z2669706492	-7.444	-59.435	Z1424270493	-7.598	-83.331	Z225044536	-7.253	-70.047
Z1444165891	-7.431	-81.004	Z2504203916	-7.549	-72.993			
Z2061571744	-7.406	-72.194						
Z1748045271	-7.394	-75.577						
Z1862633894	-7.352	-73.653						
Z2055833084	-7.328	-54.790						
Z2781625968	-7.263	-67.808						
Z2304219726	-7.182	-52.358						
Z2061573680	-7.020	-76.124						

3.12. İndüklenmiş Uyum Yanaştırması (IFD) ve Konak LDH'leri ile Moleküler Yanaştırma

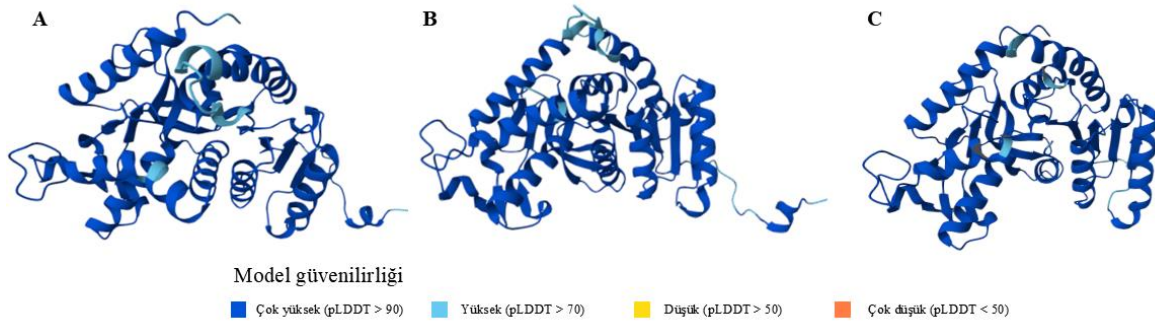
İndüklenmiş uyum yanaştırması (IFD) yöntemi reseptörde yeniden düzenleme yaparak ligandın rahatlamış bir reseptöre Glide ile yeniden yanaştırılmasını (XP yanaştırma) sağlamaktadır. Yanaştırma aşamasında oluşturulan yapıların daha spesifik olarak ligandlarla etkileşiminin incelenmesi ve en iyi aday bileşiklerin seçiliminin yapılması için ileri yanaştırma tekniği olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak elde edilen 70 pozisyon, IFD skorlarına göre sıralandı ve düşük skora sahip olanlar sıralanmıştır (Tablo 3.20).

Tablo 3.20. IFD yanaştırma sonrası belirlenen ligandların HTVS, QPLD ve IFD XPGScore, prime enerji ve IFD skor değerleri. (*) Skor ve enerji değerleri kcal/mol olarak verilmiştir.

Bileşik no	Veribankası no	BbigLDH	HTVS; XP GScore*	QPLD; XP GScore*	IFD; XP GScore*	Prime enerji*	IFD skoru*
C1	Z1478445725	MDS sonrası kapalı model	-8.343	-8.515	-9.569	-13590.36	-689.09
C2	Z1246322905	MDS sonrası kapalı model	-8.608	-8.140	-9.048	-13502.23	-684.16
C3	Z826473056	MDS sonrası kapalı model	-8.236	-8.530	-11.017	-13460.85	-684.06
C4	Z509196536	Kapalı model	-8.997	-8.389	-10.565	-13452.59	-683.19
C5	Z1424270493	Kapalı model	-8.869	-7.598	-9.404	-13471.78	-682.99
C6	Z278525320	MDS sonrası kapalı model	-9.497	-7.480	-10.557	-13439.77	-682.55
C7	Z1640818270	MDS sonrası	-8.479	-8.473	-7.652	-13462.95	-680.8

		kapalı model					
C8	Z604033838	Kapalı model	-8.382	-8.250	-10.285	-13409.02	-680.74
C9	Z2373310039	MDS sonrası kapalı model	-8.173	-7.958	-7.998	-13442.56	-680.13
C10	Z973658262	Kapalı model	-9.176	-9.182	-9.803	-13401.97	-679.9
C11	Z1616793138	Kapalı model	-8.648	-8.555	-9.624	-13403.46	-679.8
C12	Z2953881032	MDS sonrası kapalı model	-8.202	-7.972	-8.058	-13428.81	-679.5
C13	Z1253206711	Kapalı model	-8.925	-7.731	-10.617	-13374.26	-679.33
C14	Z19650139	Kapalı model	-8.701	-9.111	-7.606	-13429.61	-679.09
C15	Z2400537901	Kapalı model	-10.464	-8.919	-9.831	-13379.26	-678.79
C16	Z2201943136	Açık model	-8.992	-8.443	-8.72	-13399.65	-678.70
C17	Z2060912694	Açık model	-8.774	-8.274	-10.44	-13364.38	-678.66
C18	Z2063989764	Açık model	-9.105	-7.750	-9.56	-13377.59	-678.43
C19	Z1531526443	Açık model	-8.641	-8.706	-9.55	-13338.36	-676.47
C20	Z2055833084	Açık model	-8.482	-7.328	-9.19	-13311.35	-674.76

Yapısı bilinmeyen *B. taurus* LDH'leri için modeller AlphaFold 2.0 veri bankasından elde edilmiştir. Şekil 3.17'de görüldüğü üzere tüm *B. taurus* LDH'leri çok yüksek yapısal güvenilirliğe sahiptir. Bu nedenle bu aşamada AlphaFold 2.0 model yapıları kullanılmıştır.



Şekil 3.17. AlphaFold veri bankasındaki *B. taurus* LDH yapıları. (A) LDHA - P19858, (B) LDHB - Q5E9B1, (C) LDHAL6B - Q3T056. AlphaFold, her bir rezidü için 0 ile 100 arasında değişen bir model güven skorunu (pLDDT) üretmektedir.

IFD aşamasından sonra geriye kalan kalan 70 bileşik aynı zamanda *B. taurus* LDH enzimlerine (*Bos taurus* LDHA, LDHB ve LDHAL6B) Glide XP moleküler yanaştırma yapılarak inhibitör adaylarından yalnızca parazit LDH'sine yüksek afinite gösteren bileşikler belirlenmiştir. Tablo 3.21'de bulunan sonuçlara göre, konak LDH'larla daha düşük afinite sergileyen yirmi bileşik seçilmiştir.

Tablo 3.21. IFD sonrası belirlenen ligandların konak LDH'leri ile Glide XP moleküler yanaştırması sonrasında elde edilen XP GScore değerleri (kcal/mol).

Bileşik no	Veri bankası no	BtLDHA	BtLDHB	BtLDHA-likeB	Ortalama
C1	Z1478445725	-4.311	-5.156	-4.875	-4.78067
C2	Z1246322905	-4.495	-5.448	-3.34	-4.42767
C3	Z826473056	-4.253	-4.534	-4.414	-4.40033
C4	Z509196536	-4.233	-5.03	-4.275	-4.51267
C5	Z1424270493	-4.559	-4.411	-5.247	-4.739
C6	Z278525320	-4.464	-4.047	-4.283	-4.26467
C7	Z1640818270	-4.863	-5.026	-4.731	-4.87333
C8	Z604033838	-3.745	-3.219	-4.344	-3.76933
C9	Z2373310039	-4.842	-5.14	-4.485	-4.82233
C10	Z973658262	-4.959	-3.858	-3.883	-4.23333
C11	Z1616793138	-4.507	-4.505	-4.672	-4.56133
C12	Z2953881032	-4.596	-3.577	-4.391	-4.188

C13	Z1253206711	-4.843	-4.798	-4.772	-4.80433
C14	Z19650139	-4.249	-4.068	-4.262	-4.193
C15	Z2400537901	-5.409	-4.512	-4.829	-4.91667
C16	Z2201943136	-4.8	-4.406	-5.435	-4.88033
C17	Z2060912694	-4.114	-4.636	-4.857	-4.53567
C18	Z2063989764	-3.427	-5.208	-5.287	-4.64067
C19	Z1531526443	-4.526	-5.325	-4.901	-4.91733
C20	Z2055833084	-4.401	-4.787	-4.808	-4.66533

3.13. Moleküler dinamik simülasyonları ve bağlanma enerjisi hesaplamalarına dayalı olarak ligandların belirlenmesi

Bu çalışmada, öncelikle Desmond programı kullanarak 20 protein-ligand kompleksinin MD simülasyonları (20 ns) ve bağlanma serbest enerjisi hesaplamaları (son 5 ns için) gerçekleştirilmiştir. Ardından, ligandın daha uzun MDS süreleri boyunca kararlılığını belirlemek için GROMACS ile 100 ns süren MDS yapılmıştır (Tablo 3.22).

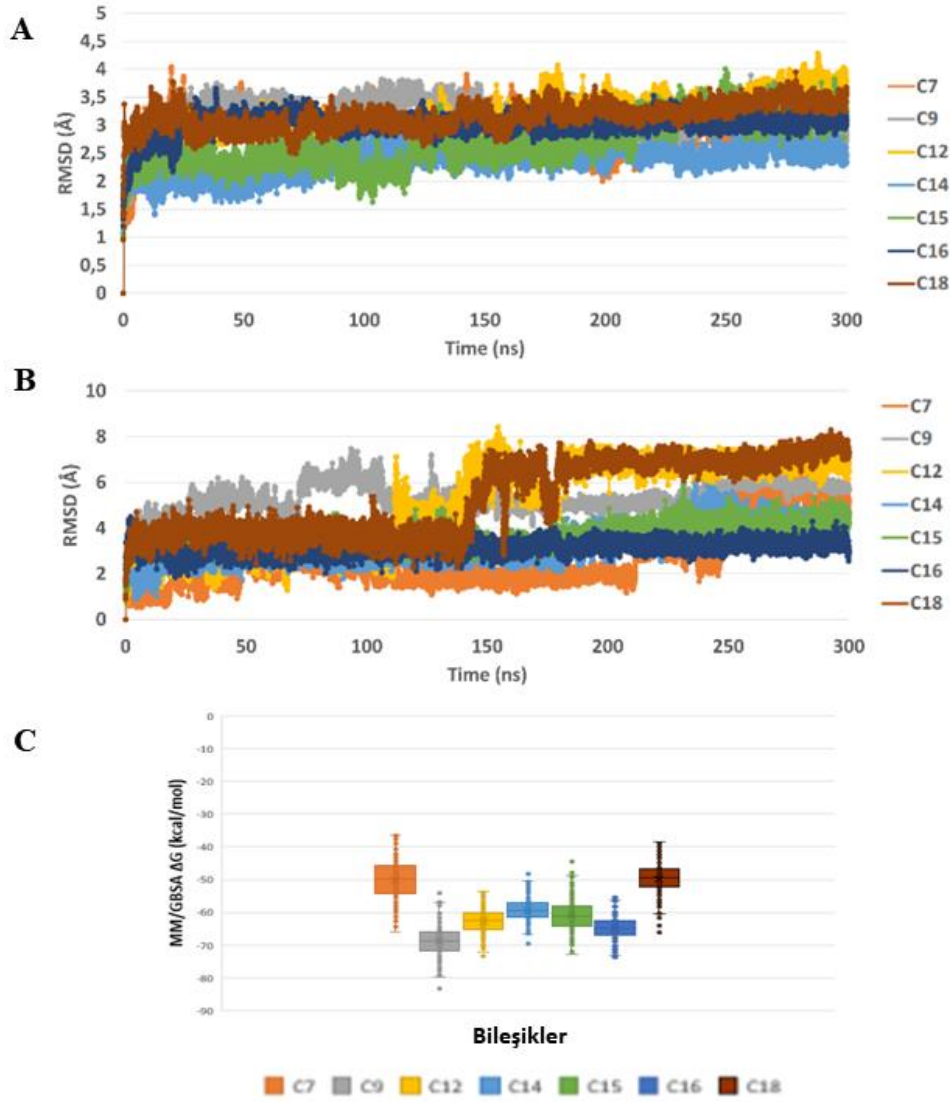
Tablo 3.22. GROMACS 100 ns MDS sonrası Lig-fit-prot RMSD ortalama değerleri ve Desmond ile son 5 ns için MM/GBSA ΔG ortalama hesaplama sonuçları.

Bileşik No	RMSD Ortalama (nm)	SD	min	max	ΔG Ortalama (kcal/mol)
C1	0.320	0.185	0.103	1.545	-67.3425
C2	0.573	0.056	0.207	1.090	-58.4571
C3	0.604	0.069	0.343	0.949	-64.0088
C4	0.646	0.118	0.391	0.948	-57.2994
C5	0.295	0.052	0.138	0.458	-60.7591
C6	0.658	0.234	0.237	0.955	-54.8145
C7	0.148	0.033	0.071	0.301	-64.4233
C8	0.411	0.196	0.161	1.030	-66.175
C9	0.424	0.053	0.283	0.586	-75.825
C10	0.332	0.099	0.083	0.578	-46.3542
C11	0.246	0.115	0.088	0.973	-46.0935

C12	0.365	0.043	0.261	0.509	-71.5432
C13	0.520	0.102	0.284	0.769	-53.7573
C14	0.265	0.050	0.077	0.491	-60.4939
C15	0.464	0.030	0.153	0.634	-67.0062
C16	0.178	0.046	0.049	0.311	-60.9869
C17	0.498	0.048	0.121	1.005	-60.6208
C18	0.130	0.021	0.059	0.241	-72.3022
C19	1.140	0.149	0.412	2.240	-72.2696
C20	0.332	0.034	0.155	0.525	-44.1338

GROMACS ile gerçekleştirilen 100 ns MDS sonrası düşük RMSD ortalamalarına ve stabil yapıya sahip olan ve Desmond ile gerçekleştirilen 20 ns MDS ve son 5 ns için hesaplanan bağlanma enerjileri değerlendirildiğinde, 8 protein-ligand kompleksinden C7, C9, C12, C14, C15, C16, C18 ve C19 yapıları daha uzun simülasyon (300 ns) için seçilmiştir.

Ardından, 300 ns süren MD simülasyonundan elde edilen RMSD değerleri değerlendirilmiştir (Şekil 3.18). C19 bağlanma cebinden çıkmıştır. Şekil 3.18B'deki Lig-fit-prot RMSD değerlerine göre, C16, simülasyon boyunca 3 Å RMSD değerini koruyarak dikkate değer bir kararlılık sergilenmiştir. C16'yı takiben, C9, 4-6 Å aralığında kısmi bir kararlılık gösterdi. Şekil 3.18C'deki MM/GBSA ΔG dağılım grafiğine göre hem C9 hem de ardından C16, 300 ns simülasyonunun son 30 ns'inde bağlanma enerjilerine göre en iyi bağlanmayı sergiledikleri görülmektedir. C18 için RMSD değerindeki yükselme 150. ns'de görülmektedir, ancak daha sonrasında daha stabildir. Ayrıca ΔG enerjisi diğer bileşiklere göre düşük olduğu görülmektedir. Ancak GROMACS analizinde en iyi sonuca sahip olduğu için ve bağlanma cebinden uzaklaşmadığı ve -50 kcal/mol ΔG bağlanma enerjisini koruduğu için elenmeyerek ileri analize eklenmiştir. C15 için ise RMSD değerlerinde stabil ilerlediği görülmektedir. Ayrıca -50 kcal/mol ΔG bağlanma enerjisine sahip olduğu için seçilmiştir.

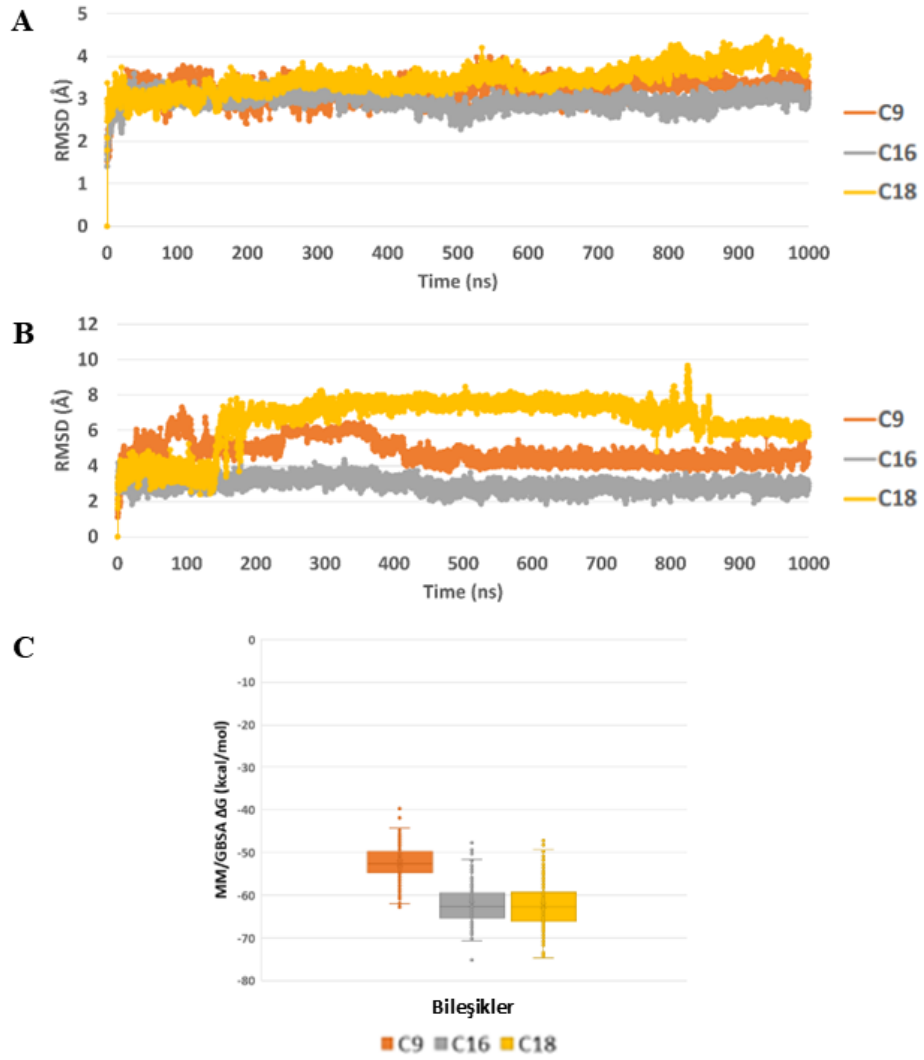


Şekil 3.18. Desmond ile gerçekleştirilen 300 ns moleküler dinamik simülasyonu sonrası RMSD Analizi Grafikleri. (A) C-alfa RMSD (Å)/ns. (B) Lig-fit-prot RMSD (Å)/ns. (C) 300 ns MD simülasyonunun son 30 ns'inde elde edilen MM/GBSA dG Dağılım grafiği.

Sonuç olarak, C9, C15, C16 ve C18 (Desmond MDS'ye göre 300 ns'de stabilitesini koruduğu için) daha uzun MDS (1000 ns) için seçilmiştir.

Sonraki aşamada, daha kapsamlı bir analiz için 1000 ns simülasyon süresinde C9, C15, C16 ve C18 yapıları MDS yapılmıştır. Şekil 3.19B'de gösterilen RMSD analizi grafiği, C16'nın 2-4 Å aralığında istikrarlı bir şekilde tamamlandığı görülmektedir. Ancak C18'in simülasyonu 4-8 Å arasında stabilitesini koruduğu görülmektedir. C9 için, istikrarlı bir RMSD değer aralığı 400 ns sonrasında gözlenmiştir. C15, bağlanma bölgesinden uzaklaştığı için RMSD analizi gerçekleştirilmedi. Şekil 3.19C'de 1000 ns simülasyonun son 100 ns için serbest bağlanma enerjisi hesabı yer almaktadır. C9 için

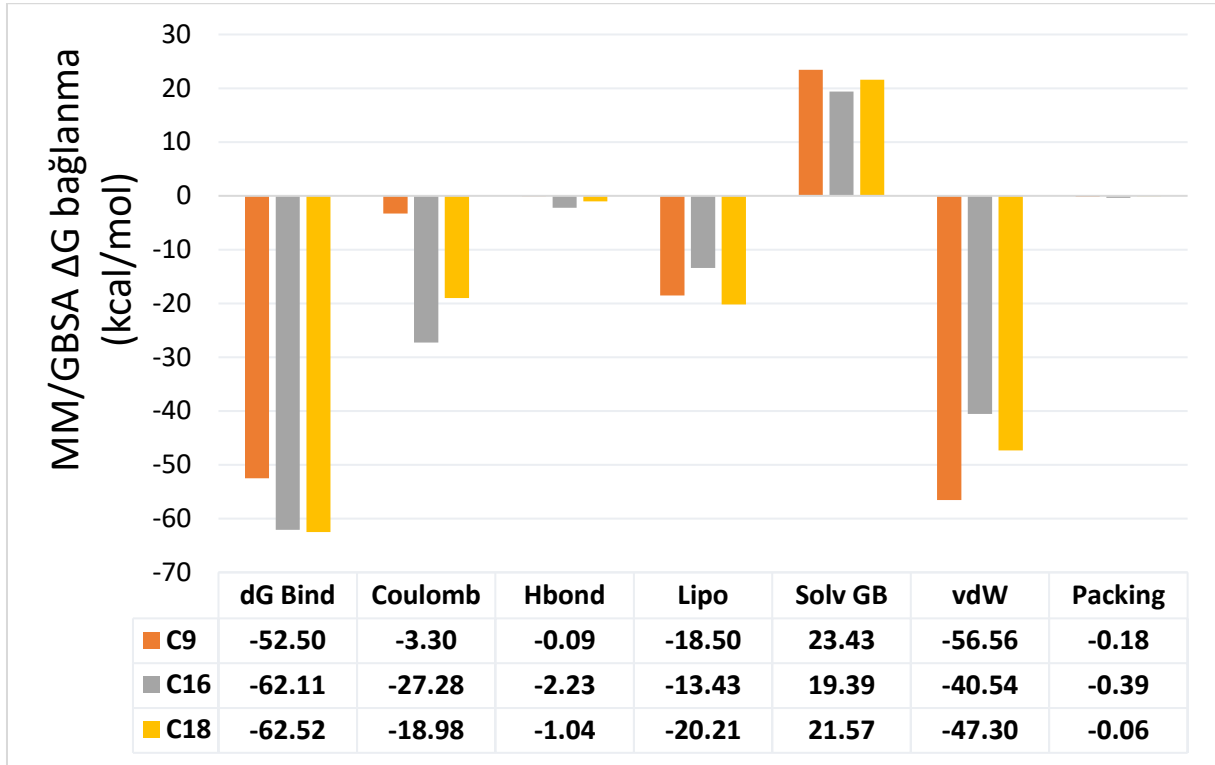
serbest bağlanma enerjisi simülasyonun sonunda düşüş gösterirken C16 ve C18 için yükselmiştir.



Şekil 3.19. 1000 ns Desmond moleküler dinamik simülasyonu sonrası RMSD Analiz Grafikleri. (A) C-alfa RMSD (Å)/ns. (B) Lig-fit-prot RMSD (Å)/ns. (C) 1000 ns MD simülasyonunun son 100 ns'inde elde edilen MM/GBSA ΔG Dağılım grafiği. Tüm ölçümler 0.1 ns aralıklarla alınmıştır.

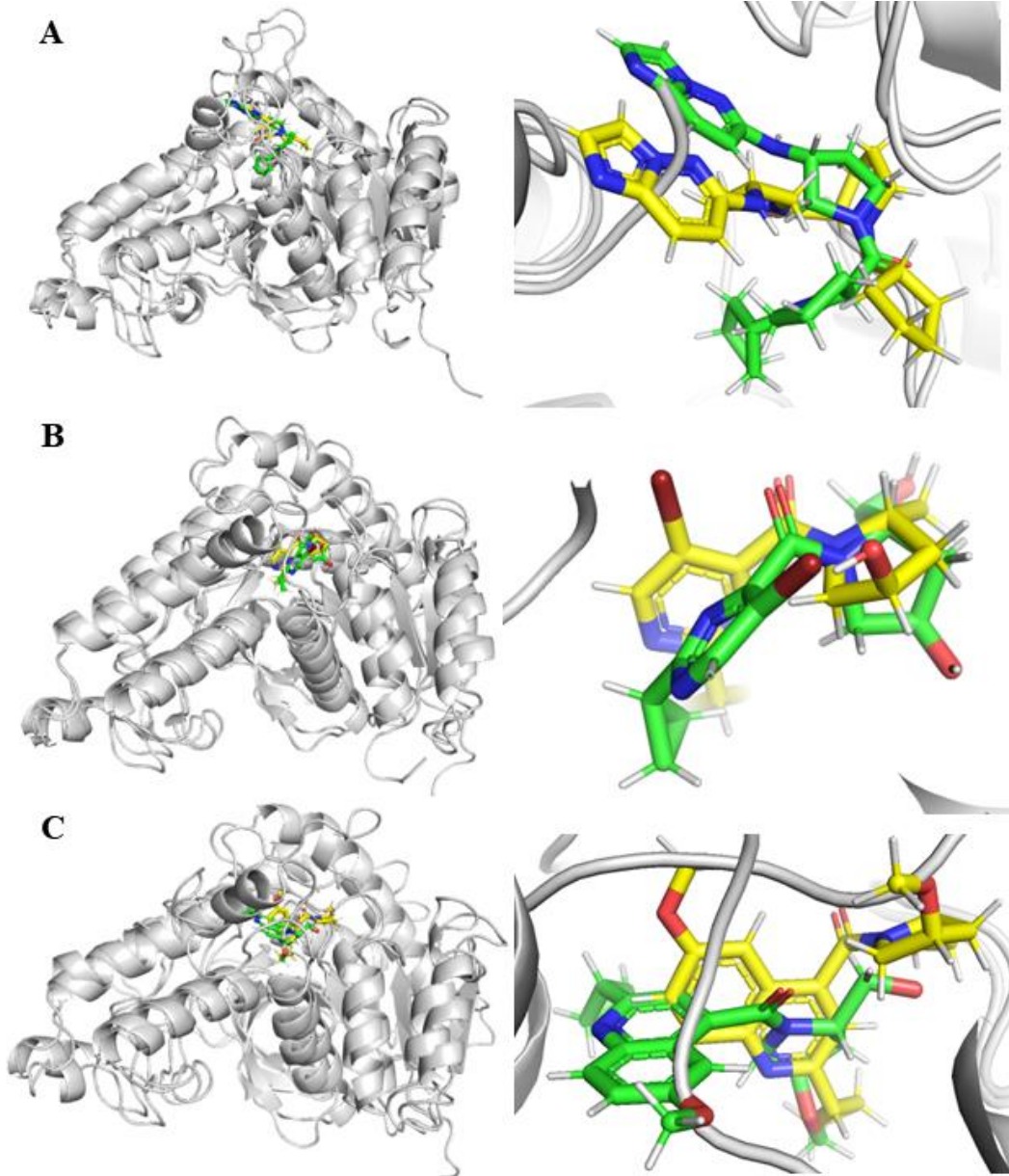
Şekil 3.20, genel MM/GBSA bağlanma enerjisine katkıda bulunan ortalama enerjileri göstermektedir. Hesaplamalar, 1000 ns'lik bir moleküler dinamik simülasyonun son 100 ns'inden çıkarılan anlık verilere dayanarak yapılmıştır. MM/GBSA ΔG bağlanma enerjileri, sırasıyla -62.11 ve -62.52 kcal/mol değerleriyle C16 ve C18 için karşılaştırılabilir düzeydedir. Ancak, bu bağlanma enerjilerinin ardında yatan enerji türleri farklılık göstermektedir. C9-

protein bağlanmasında, başlıca katkı sağlayan faktörler lipofilik enerji ve van der Waals (vdW) enerjisidir. Buna karşılık, C16 ve C18'in bağlanmasında Coulomb ve hidrojen bağı (H-bağı) enerjilerinin katkıları, C9-protein bağlanma sürecinde gözlemlenenlere kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir.



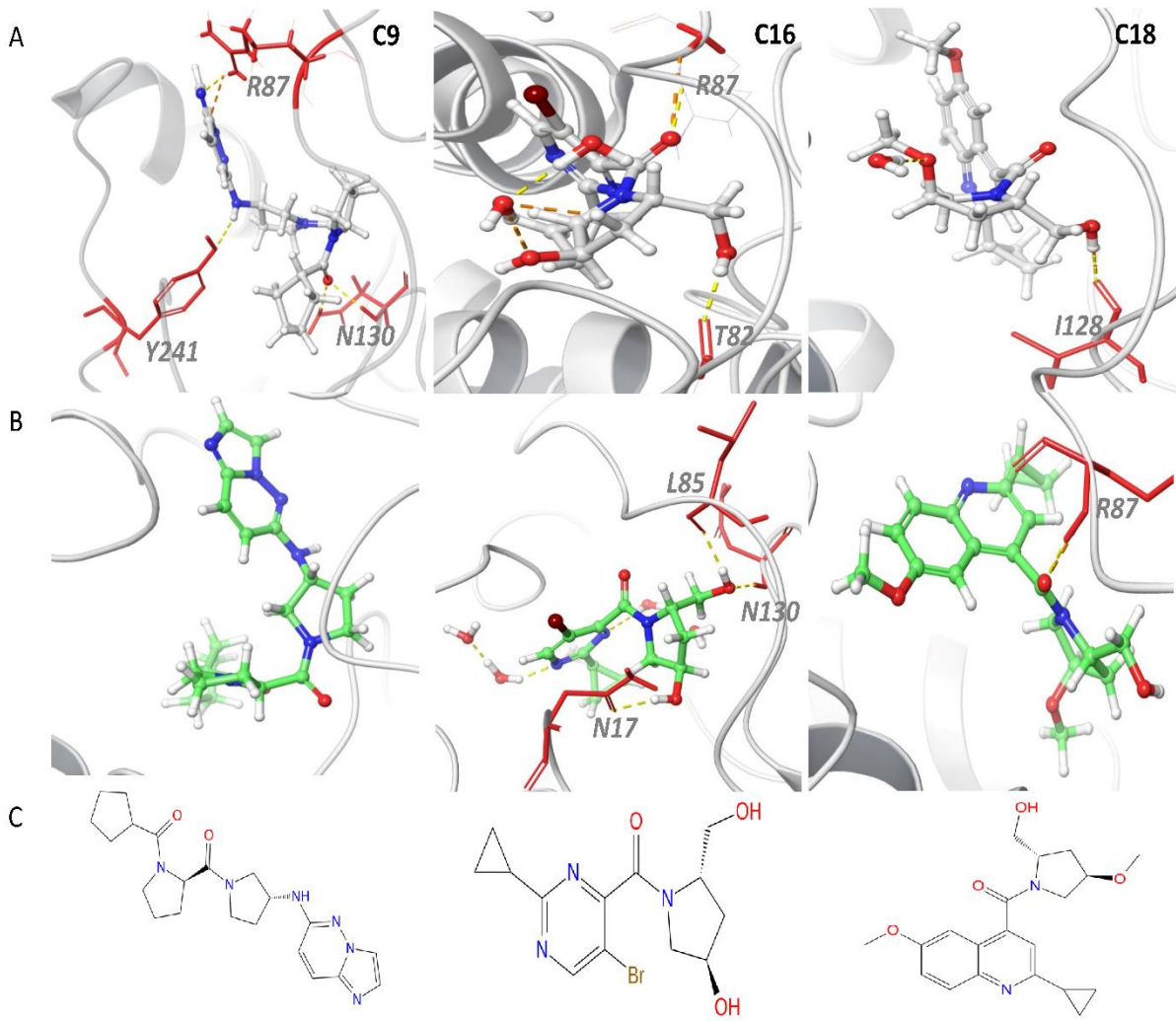
Şekil 3.20. MM/GBSA ΔG bağlanma enerjisi bileşenleri. ΔG : Bağlanma serbest enerjisi, Coulomb: Elektrostatik etkileşimlerin enerji katkısı, Hbond: Hidrojen bağları, Lipo: Lipofilik (hidrofobik) etkileşimlerin enerji bileşeni, vdW: Van der Waals kuvvetlerinden kaynaklanan enerji bileşeni, Solv GB: Genel Born (GB) solvent modeli ile hesaplanan solvasyon enerjisi, Packing: Moleküler yerleşim veya sıkışma ile ilgili enerji katkısı.

Şekil 3.21’de bulunan MDS öncesi ve sonrası süperimpoz görüntülerine göre bileşikler bağlanma cebinde bulunmaya devam etmişlerdir. C9 ve C16’da büyük değişim görülmezken C18’de bağlanma cebi içinde kaymıştır. Bu nedenle 150 ns’de RMSD değerinde yükselme gözlemlenmiştir. Ancak Şekil 3.21’de görüldüğü üzere bağlanma cebindeki varlığını kararlı bir şekilde sürdürmüştür.



Şekil 3.21. BbigLDH komplekslerinin IFD sonrası (sarı) ve 1000 ns MDS sonrası (yeşil) süperimpoz görüntüleri. (A) BbigLDH-C9, (B) BbigLDH-C16, (C) BbigLDH-C18 kompleksleri.

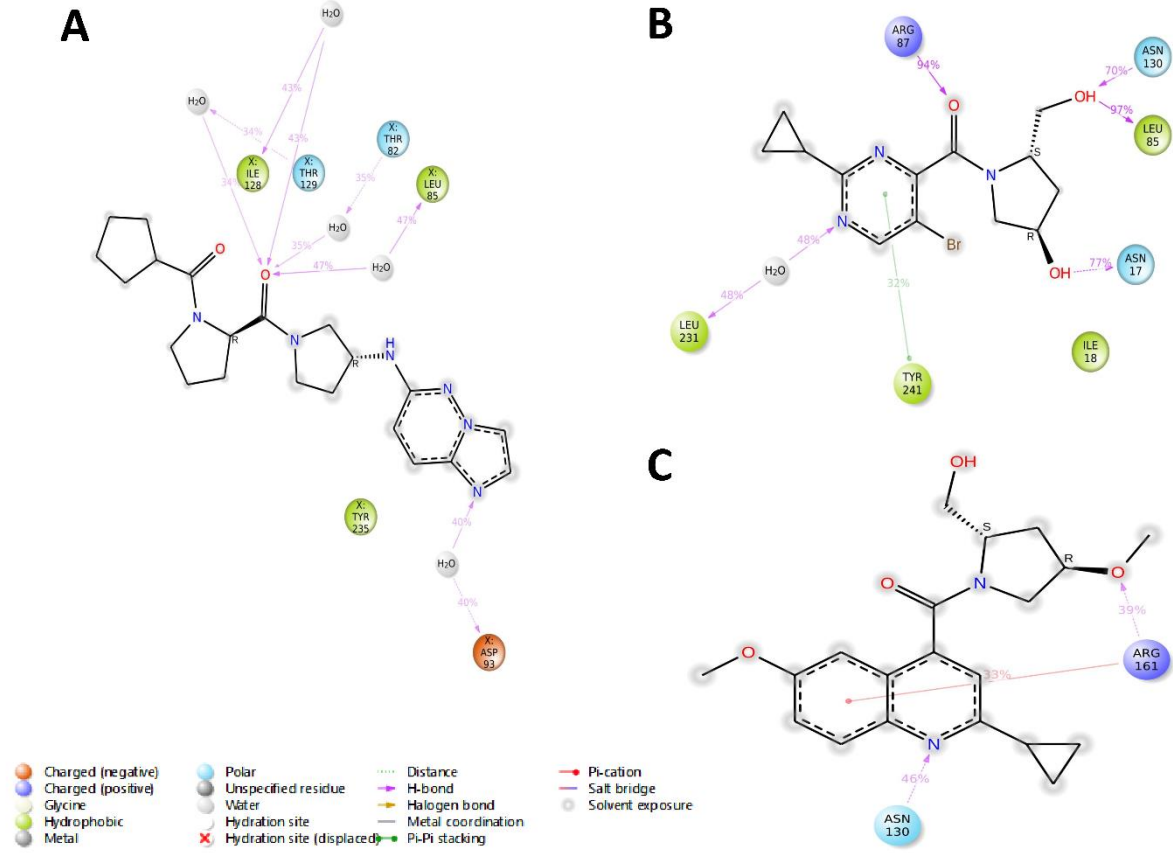
Moleküler yanaştırma aşamasında IFD sonuçlarına göre, bileşiklerle genellikle R87, I128 ve N130 rezidüleri ile etkileşimler gözlenmiştir (Şekil 3.22A). Şekil 3.22B incelendiğinde, 100 ns MD simülasyonunun sonucunda BbigLDH-C9'da su molekülleri ile hidrojen bağı etkileşimleri bulunmakla birlikte, herhangi bir rezidü ile etkileşimi görülmemektedir. Diğer yandan, Şekil 3.22B incelendiğinde, BbigLDH-C16'da N17, L85 ve N130 rezidüleri ile hidrojen bağı etkileşimi gözlemlenmektedir. Şekil 3.22B'de, BbigLDH-C18'de hidrojen bağı etkileşimi R87 ile görülmektedir.



Şekil 3.22. C9, C16 ve C18 ile 3 boyutlu BbigLDH yapısına ait bağlanma modları. (A) IFD (gri) sonrası, (B) 1000 MDS (yeşil) sonrası, (C) Ligandların 2 boyutlu yapısı. H bağ etkileşimleri sarı, pi-pi etkileşimleri turuncu, etkileşim gösteren rezidü yapıları kırmızı renkle gösterildi.

1000 ns MD boyunca BbigLDH-C9 etkileşim olarak T82, L85, D93, I128 ve T129 ile su köprüleri (water bridge) olduğu Şekil 3.23'te görülmektedir. Residüleriyle doğrudan H-bağ etkileşimleri oluşturmamıştır. C16 bileşiği için ise N17 (%77, etkileşim yüzdesi), L85 (%97), R87 (%94) ve N130 (%70) rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Ayrıca L231 ile su köprüsü ve Y241 ile de pi-pi stacking etkileşimleri gözlemlenmektedir. C18 için de N130 (%46) ve R161 (%39) H-bağı etkileşimi

görülmektedir. Bu rezidülerin BbigLDH'ye karşı inhibisyon üzerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

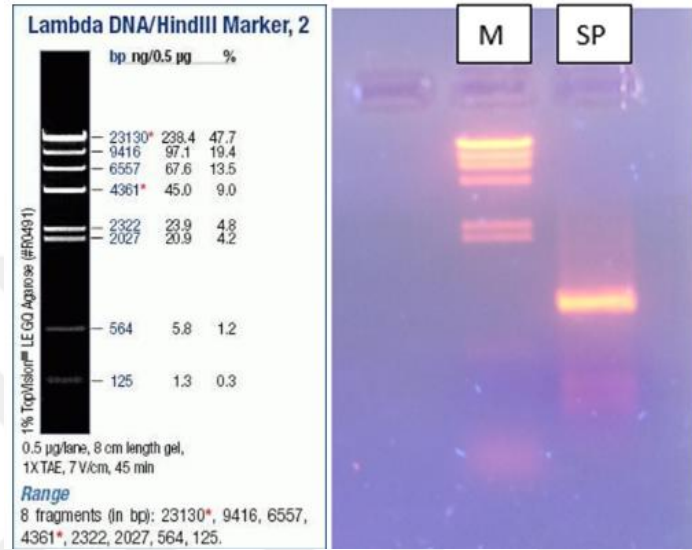


Şekil 3.23. 1000 MDS boyunca bileşik ve protein rezidüleri arasında oluşan etkileşimlerin 2 boyutlu görüntüsü ve etkileşimlerin yüzdeleri. (A) C9, (B) C16, (C) C18.

Moleküler yanaştırma, MDS ve MM/GBSA bulgularına göre, C16'nın BbigLDH ile stabil etkileşim gösterdiği dikkate alındığında, in vitro inhibitör çalışmaları için umut verici bir aday olabileceğini açıkça göstermektedir. C9 yapısının C16 ve C18 yapılarından farklı olması dolayısıyla farklı sonuçlar vermiştir. C16 ve C18 ΔG sonuçları birbirine yakındır. C9 etkileşimi 300ns'den sonra 1000 ns'e geçişte düşüş göstermiştir. Bunun bir nedeni H-bağ etkileşimlerini büyük oranda kaybetmiş olması olabilir. C9 için ΔG enerji katkılarından olan Coulomb etkileşimi de diğer bileşiklere göre düşüktür. Tüm bu bulgulara göre, Z2373310039 (C09), Z2201943136 (C16) ve Z2063989764 (C18) babesiosis üzerindeki potansiyel terapötik etkilerini anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

3.14. PZR Yöntemi ile BbigLDH Geninin Amplifikasyonu ve Gen Konsantrasyon Tayini

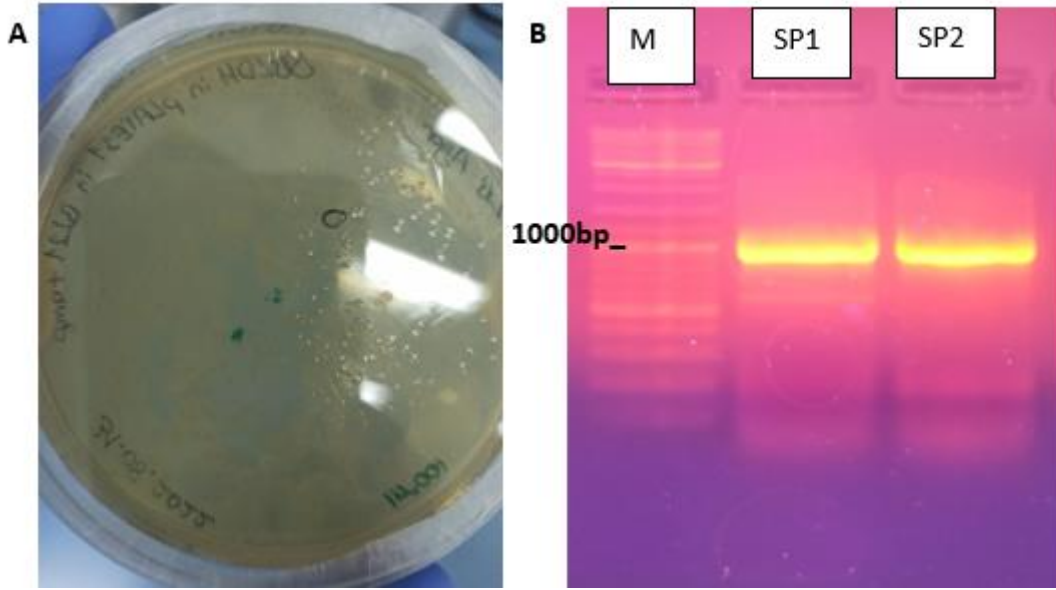
PZR yöntemiyle firma aracılığıyla elde edilen sentetik BbigLDH geninin varlığı ve miktar tayini yapılmıştır. Şekil 3.24'te yer alan jel görüntüsünde bant parlaklığına bakılarak marker bant parlaklık referansı baz alınarak miktar tayini yapılmıştır (70 ng).



Şekil 3.24. PZR yöntemi ile BbigLDH geninin amplifikasyonu sonucunda oluşan bantlaşma. M: Marker, SP: BbigLDH gen örneği.

3.15. pLATE31 Vektörünün *E. coli* Hücrelerine (BL21 (DE3)) Transformasyonu ve Koloni PZR ile BbigLDH gen amplifikasyonu

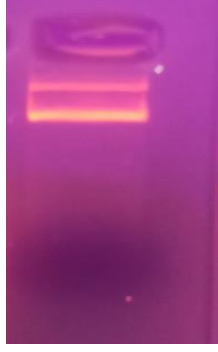
BbigLDH geninin pLATE31 vektörüne transformasyonu ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine alt klonlanması sonucunda Şekil 3.25A'da görüldüğü üzere amfisilinli LB agarda koloni oluşumları görülmektedir.



Şekil 3.25. BbigLDH geninin pLATE31 vektörüne alt klonlanmasının devamında *E. coli* BL21 (DE3) kompetan hücrelerine transformasyonu. (A) *E. coli* BL21 (DE3) kompetan hücrelerine transformasyon sonrası LB agarda kolonilerin görüntülenmesi ve tekli koloni seçimi. (B) Koloni PZR yönteminin ardından BbigLDH geni içeren pLATE31 vektöründen BbigLDH geninin amplifikasyonuna ait jel görüntüsü. M: Marker (Generuler DNA Marker Ladder Mix DNA, 100-10.000 bç), SP1 ve SP2: BbigLDH geni.

Tekli koloni seçilimi ile sıvı LB kültüründe yeniden yetiştirilen kültürden koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR sonucunda Şekil 3.25B'de SP1 ve SP2 kuyularında bulunan bantlaşmalar elde edilmiştir. 1000 bç civarında olan bu parlak bantlar pLATE31 vektöründen amplifiye edilen BbigLDH genine (969 nt) ait olduğu tespit edilmiştir.

Koloni PZR ile amplifiye edilen BbigLDH geni Mini prep ile saflaştırılmıştır. Sekanslama öncesi firmaya gönderilerek spesifik gen varlığı kanıtlanmıştır (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. Miniprep ardından elde edilen agaroz jel görüntüsü.

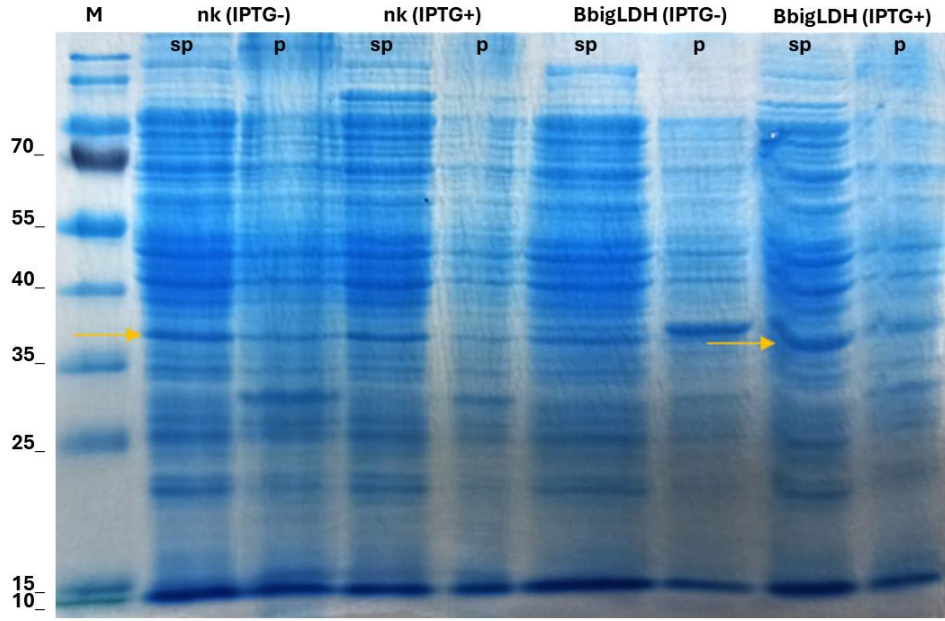
3.16. Sekanslama İşlemi

Sanger sekanslama sonuçlarına göre, Forward (Şekil ek 1.1) ve Reverse (Şekil ek 1.2) primerler kullanılarak elde edilen dizilerde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bu sayede, klonlama ile elde edilen BbigLDH proteininin beklenen şekilde elde edildiği kanıtlanmıştır.

3.17. Protein Ekspresyonu ve Saflaştırılması

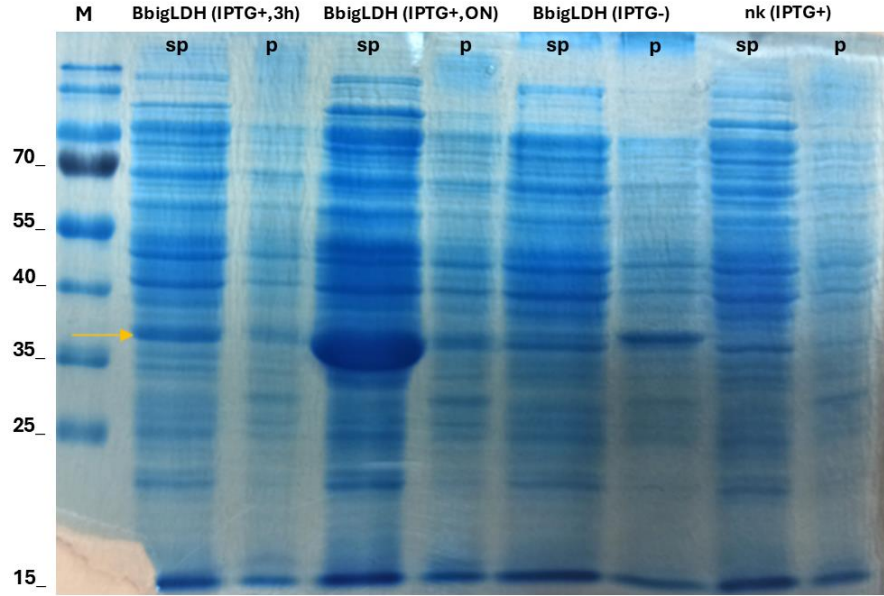
Çalışmanın bu aşamasında protein ekspresyonu için en uygun koşulların bulunabilmesi için farklı sürelerde ve IPTG varlığında indüklenme süresi için optimizasyon yapılmıştır (3, 5 saat ve bir gün).

Şekil 3.27’de negatif kontrol (nk) örnekleri BbigLDH geni olmayan kültüre ait örneklerdir. IPTG varlığında veya yokluğunda 36 kDa’da herhangi BbigLDH ekspresyonuna dair bantlaşma göstermemektedir. Ancak BbigLDH geni taşıyan kültüre ait örneklerde yalnızca IPTG varlığında BbigLDH ekspresyon bantlaşması görülmektedir.



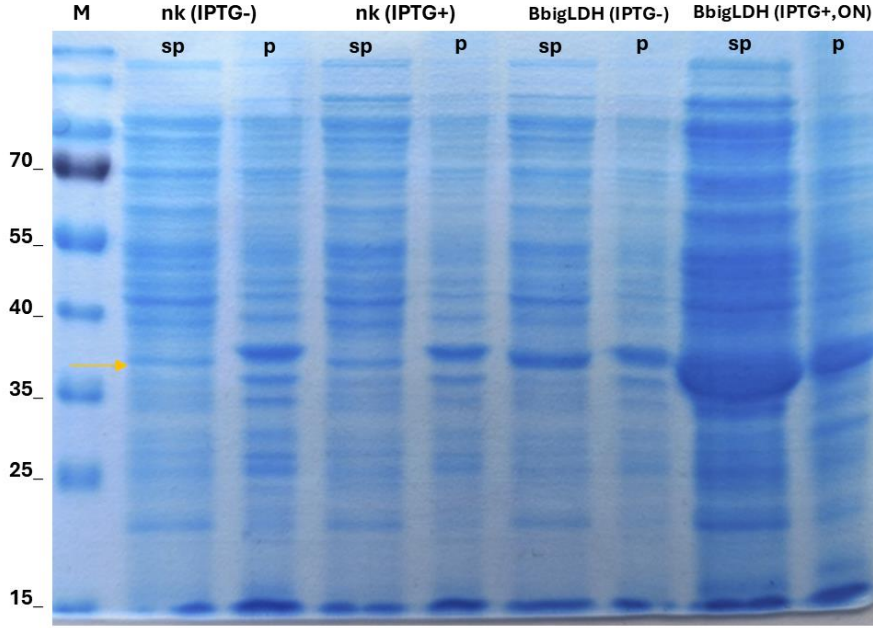
Şekil 3.27. Örnekler 1 mM IPTG ile indüklenerek 3 saat inkübe edilmiştir, sarı ok 36 kDa olduğu ve BbigLDH proteininin varlığını gösteren bantlaşma olduğu tahmin edilmektedir. M: Marker, Page Ruler Prestrained Protein Ladder 10 to 180 kDa, Sp: Süpernatant, p: Pellet.

Şekil 3.38’de yer alan görselde ise BbigLDH proteinini ekspres edebilen kültürlerle 3 saat ve bir gece inkübasyon süreleri üzerine çalışma yapılmıştır. Bir gecede yapılan inkübasyonda süpernatant örneğindeki 36 kDa’da oluşan BbigLDH ekspresyon bantlaşması 3 saate göre oldukça belirgin ve kalındır.



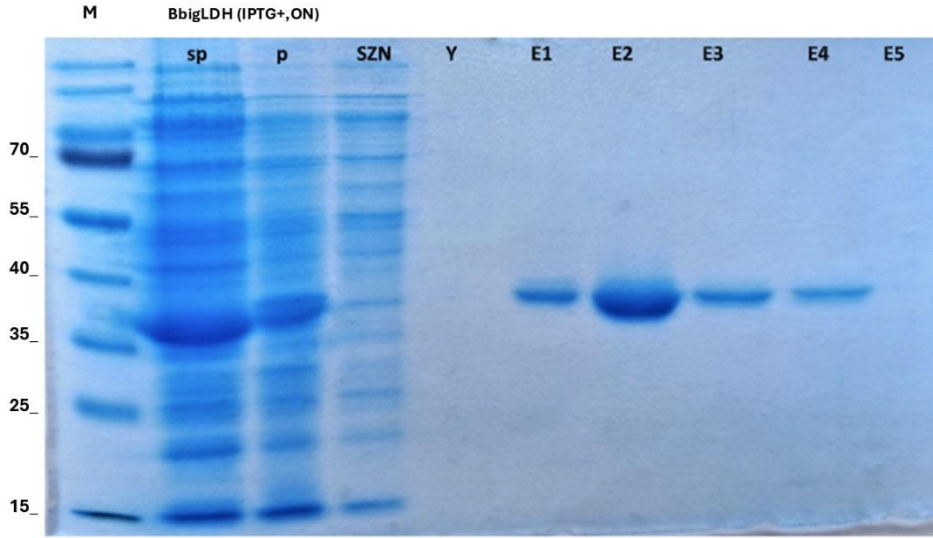
Şekil 3.28. Örnekler 1 mM IPTG ile indüklenerek 3 saat ve bir gece inkübe edilmiştir, sarı ok 36 kDa olduğu ve BbigLDH proteininin varlığını gösteren bantlaşma olduğu tahmin edilmektedir. M: Marker, Page Ruler Prestrained Protein Ladder 10 to 180 kDa, Sp: Süpernatant, p: Pellet.

Şekil 3.29’da, optimize edilmiş koşullarda 1 mM IPTG varlığında, bir gece süren inkübasyon sonucunda 37°C’de başarılı ekspresyon gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, IPTG varlığının ekspresyonu tetiklediği de açıkça görülmektedir. BbigLDH geninin ekspresyonu sonucunda, bir gece boyunca 1 mM IPTG ile indüklenen süpernatantta, yaklaşık 36 kDa moleküler ağırlığında belirgin bir bant oluşumu gözlenmiştir. Bu kalın bant, proteinin yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermektedir.



Şekil 3.29. Örnekler 1mM IPTG ile indüklenerek bir gece inkübe edilmiştir, sarı ok 36 kDa olduğu ve BbigLDH proteininin varlığını gösteren bantlaşma olduğu tahmin edilmektedir. M: Marker, Page Ruler Prestrained Protein Ladder 10 to 180 kDa, Sp: Süpernatant, p: Pellet.

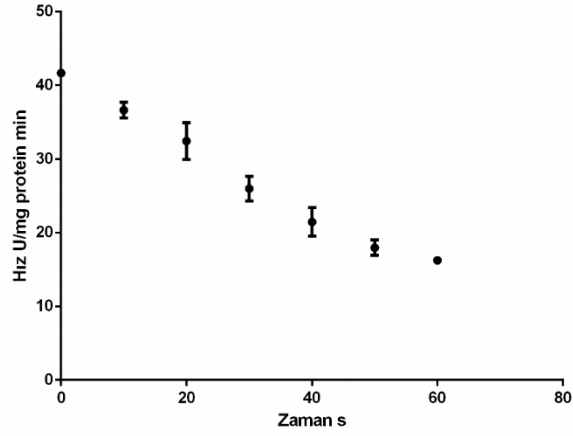
Bu tez çalışmasında, HisTALON metal afinite kromotografisi kullanılarak BbigLDH proteinini yüksek saflıkta elde edilmiştir. BbigLDH geni içeren pLATE31 vektörüne sahip BL21 (DE3) kültüründen 37°C’de 220 rpm çalkalamalı inkübatörde geliştirilen ve ardından 1 mM IPTG ile bir gece (ON) aynı koşullarda inkübe edilen hücrelerden eksprese edilen proteinin SDS-Page jel görüntüsü Şekil 3.30’da yer almaktadır. Sp kuyusunda yer alan jel görüntüsünde süpernatantta görülen kalınlaşmış bantta proteinin yüksek oranda eldesi görüntülenmektedir. Aynı zamanda saflaştırma aşamasında SZN ve Y kuyularında süzüntü ve yıkamada herhangi bir protein bandına rastlanmamıştır, örnekler beklenildiği üzere temizdir. Elüsyon kuyularına bakıldığında en çok E2 nolu kuyu olan 2. Elüsyon tüpünde BbigLDH protein varlığı görülmektedir. Bu nedenle 37°C’de, 220 rpm, 1mM IPTG ile bir gece (ON) koşullarda inkübe edilen hücreler saflaştırma için kullanılmıştır.



Şekil 3.30. Rekombinant BbigLDH-pLATE31 in BL21 (DE3) kültürünün 37°C-220rpm koşulunda geliştirilerek 1mM IPTG ile indüklemenin ardından bir gece bekletilerek (ON) elde edilen protein örneklerinin SDS-Page yöntemiyle görüntülenmesi. M: Marker, Page Ruler Prestrained Protein Ladder 10 to 180 kDa, Sp: Süpernatant, p: Pellet, SZN: Süzüntü, Y: yıkama, E: Elüsyon örneklerini ifade etmektedir.

3.18. Aktivite ve Kinetik Analizi

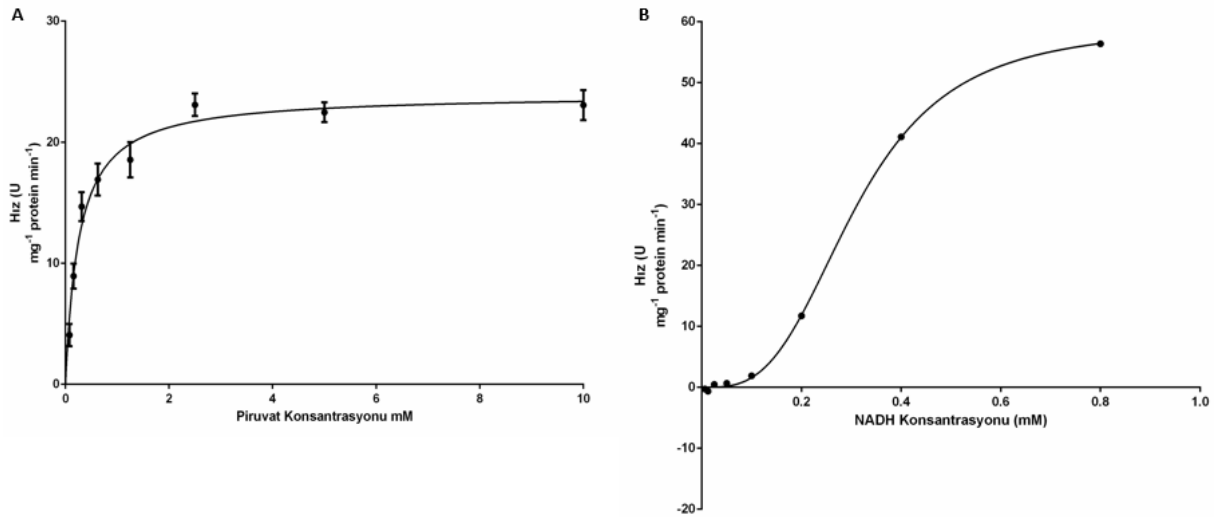
E2, aktivite ve kinetik analizlerinde kullanılmıştır. LDH aktivitesi, ileri reaksiyon için pirüvatın NADH ile substrat olarak bulunduğu koşullarda değerlendirilmiştir. Optimal substrat konsantrasyonu, maksimum hızı ve sabit bir hızda ürün oluşumunu gösteren en düşük doyurucu konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Ayrıca, enzim için seri seyreltmelerin aktiviteleri için lineer regresyonlar bu belirlemede dikkate alınmıştır. E2 için yapılan Bradford analizine göre, protein konsantrasyonu 0.65 µg/µL olarak belirlenmiştir. BbigLDH enzim aktivitesi, 1 dakikada 360 nm'de ölçülmüştür. BbigLDH enzim aktivitesi için başlangıç absorbans değeri 0.945'ti. 1 dakika sonra, absorbans değeri 0.3685'e düşmüştür (Şekil 3.31). BbigLDH'nin kinetik sonuçlarına göre, yarı-maksimum hızda görülen görünür substrat konsantrasyonu ($S_{0.5}$) için NADH 0.3094 mM olarak belirlenip, pirüvat için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ise 0.2585 mM olarak bulunmuştur. Maksimum hızlar (V_{max}), sırasıyla NADH için 59.2 U mg⁻¹ protein min⁻¹ ve pirüvat için 23.97 U mg⁻¹ protein min⁻¹ olarak ölçülmüştür (Tablo 3.23 ve Şekil 3.32).



Şekil 3.31. BbigLDH enziminin oda koşullarında 1 dk. boyunca aktivite değerleri.

Tablo 3.23. BbigLDH kinetik parametreleri.

Kinetik parametreler	Değerler
$S_{0.5}$ NADH (mM)	0.3094
K_m Pirüvat (mM)	0.2585
V_{max} NADH ($U\ mg^{-1}\ protein\ min^{-1}$)	59.2
V_{max} Pirüvat ($U\ mg^{-1}\ protein\ min^{-1}$)	23.97



Şekil 3.32. BbigLDH için (A) Pirüvat: 0.078-10 mM ve (B) NADH: 0.006-0.8 mM substrat konsantrasyonuna karşı başlangıç hızı (V_i).

Farklı apikompleksan LDH'sine yönelik olarak yapılan NADH ve pirüvat kinetik değerleri Tablo 3.24'te gösterilmiştir. K_m değerinin artması, kataliz fonksiyonunu normal bir şekilde yerine getirirken enzimin substrat bağlanma afinitesinde önemli ölçüde azalma yaşandığını gösterir. Pirüvata göre K_m değerleri değerlendirildiğinde; *B. microti* LDH'si en yüksek, *P. falciparum* LDH'si en düşük değere sahiptir. *B. bigemina* LDH'si ise genel değerlere göre ortalama bir K_m değerine sahiptir. NADH'a göre K_m değerlerine bakıldığında; *T. gondii* LDH-2 ise en düşük değere sahiptir. *B. bigemina* LDH'si ise en yüksek $S_{0.5}$ değerine sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 3.24. Farklı apikompleksan türlerine ait LDH ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonucunda elde edilen NADH ve pirüvat K_m değerleri.

Tür	K_m (Pirüvat)	K_m (NADH)	Referans
<i>Babesia bigemina</i>	0.2585 mM	*0.3094 mM	Bu çalışma
<i>Babesia bovis</i>	0.307 mM	0.0081 mM	(Bork vd. 2004)
<i>Babesia orientalis</i>	0.102 mM	0.126 mM	(Yu vd. 2022)
<i>Babesia microti</i>	1.011 mM	0.140 mM	(Yu vd. 2019)
<i>Theileria annulata</i>	0.13 mM	-	(Nural vd. 2016)
<i>Toxoplasma gondii</i> (LDH-1)	0.12 mM	0.0042 mM	(Dando vd. 2001)
<i>Toxoplasma gondii</i> (LDH-2)	0.8 mM	0.0019 mM	(Dando vd. 2001)
<i>Plasmodium falciparum</i>	0.051 mM	0.026 mM	(Dunn vd. 1996; Chaikuad vd. 2005)
<i>Plasmodium vivax</i>	0.052 mM	0.022 mM	(Chaikuad vd. 2005)
<i>Plasmodium berghei</i>	0.057 mM	0.021 mM	(Winter 2003)
<i>Homo sapiens</i> (LDH-5/liver)	0.398 mM	0.150 mM	(Pettit, Nealon, ve Henderson 1981)
<i>Bovine</i> LDH1	0.096 mM	0.039 mM	(Kuang vd. 2010)

*Michealis Menten grafiği sigmodial olduğu için $S_{0.5}$ değeri hesaplanmıştır.

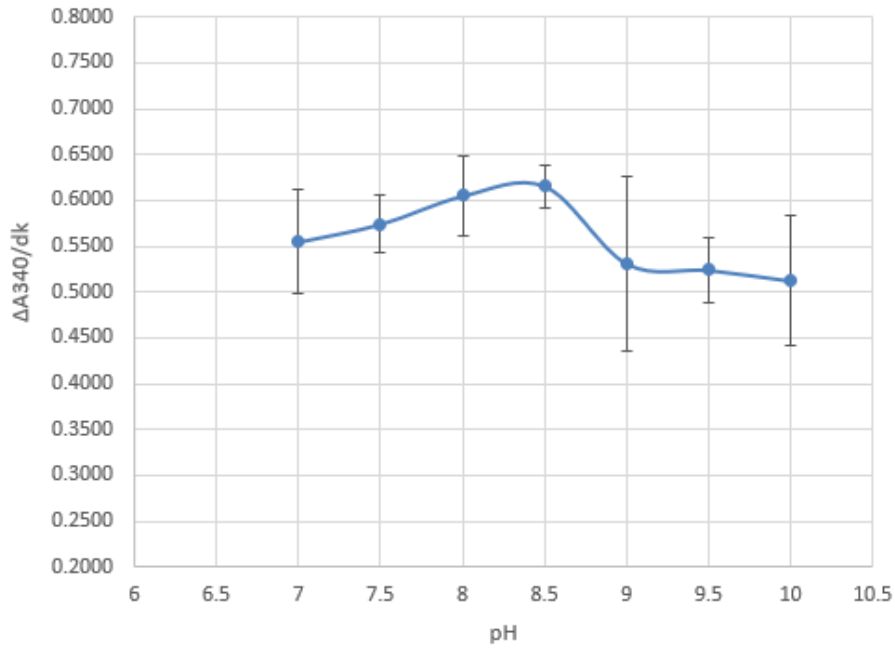
3.19. BbigLDH Enziminin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

BbigLDH proteininin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'ı belirlemek için standart reaksiyon, 7 farklı pH değerine sahip tampon çözeltilerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde, pH 7.0-8.5 arası için Tris-KCl tamponu ve pH 9.0-10.0 için CHES tamponu kullanılmıştır. Standart aktivite protokolü doğrultusunda, reaksiyon UV spektrofotometrede 340 nm'de ölçülmüş ve 1 dakikalık sürede üç kez ölçüm alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu deney, E2 elüsyon örneği ile yapılmış olup, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak enzimin optimum pH'ı belirlenmiştir.

Tablo 3.25. Çoklu tekrarların sonucunda elde edilen aktivite değerleri.

pH	Aktivite Ölçüm 1 ($\Delta A_{340}/dk$)	Aktivite Ölçüm 2 ($\Delta A_{340}/dk$)	Aktivite Ölçüm 3 ($\Delta A_{340}/dk$)
7.0	0.5937	0.4903	0.5811
7.5	0.5604	0.5520	0.6106
8.0	0.5554	0.6216	0.6381
8.5	0.6239	0.6327	0.5896
9.0	0.5983	0.4638	
9.5	0.4989	0.5495	
10.0	0.5736	0.5287	0.4353

Şekil 3.33'teki grafiğe göre enzim pH 7.0-10.0 arasında yüksek aktivite göstermektedir. Ancak optimum pH deneyinin sonucunda, BbigLDH enziminin en yüksek aktiviteyi pH 8.5'te gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, enzimin en verimli çalıştığı pH aralığını belirlemek açısından önemli olup, gelecekteki çalışmalar ve uygulamalar için uygun pH koşullarının optimize edilmesine yardımcı olacaktır.



Şekil 3.33. Ortalama değerlere göre belirlenen pH-absorbans değerleri.

Yapılan diğer apikompleksan LDH çalışmalarında *T. annulata* ve *P. falciparum* için optimum pH 7.5'tir (Nural vd. 2016), (Tian vd. 2021).

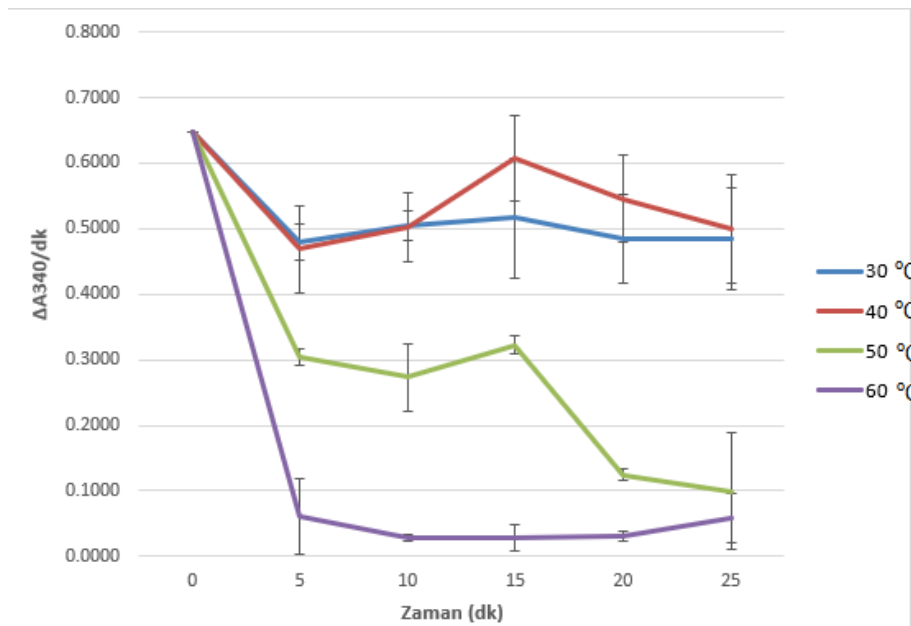
3.20. BbigLDH Enziminin Termostabilitesinin Belirlenmesi

BbigLDH enziminin termostabilite deneyi, belirli sıcaklıklarda ve sürelerde inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Enzim, farklı sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra her 5 dakikada bir UV spektrofotometrede 340 nm'de aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler sonucunda elde edilen absorbans değerleri kullanılarak, enzimin sıcaklık değişimlerine karşı aktivitesinin nasıl etkilendiği belirlenmiştir. Deneylerde, standart aktivite protokolü uygulanmıştır ve zamana bağlı olarak elde edilen absorbans değerleri Tablo 3.33'te sunulmaktadır. Bu veriler, enzimin hangi sıcaklıklarda daha stabil olduğunu ve aktivitesinin nasıl bir değişim gösterdiğini ortaya koymuştur.

Tablo 3.26. BbigLDH enziminin termostabilite deneyi sonucundaki ortalama absorbans değerleri ($\Delta A_{340}/dk$).

Dakika	Absorbans değeri (ΔA_{340})			
	30°C	40°C	50°C	60°C
0	0.6485	0.6485	0.6485	0.6485
5	0.4792	0.4685	0.3047	0.0615
10	0.5039	0.5023	0.2737	0.0078
15	0.5161	0.6071	0.3224	0.0174
20	0.4847	0.5459	0.1246	0.0056
25	0.4845	0.4997	0.0996	0.0467

Elde edilen absorbans değerleri grafik haline getirildiğinde, BbigLDH enziminin aktivitesinin sıcaklıkla nasıl değiştiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.34). Enzim, 30°C ve 40°C’de aktivite göstermiş, ancak 50°C’de absorbans değerlerinin azalmasıyla birlikte, sıcaklığın artmasıyla aktivitenin düştüğü ve 15. dakikadan sonra enzimin reaksiyonu gerçekleştiremediği tespit edilmiştir. Ayrıca, 60°C’de enzimin hiç etkin olmadığı ve bu sıcaklıklarda stabilitesini koruyamadığı görüldüğü için, BbigLDH’nin yüksek sıcaklıklara dayanıklı bir enzim olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.34. BbigLDH enziminin termostabilite deneyi sonucunda elde edilen absorbans değerleri ve zaman grafiği.

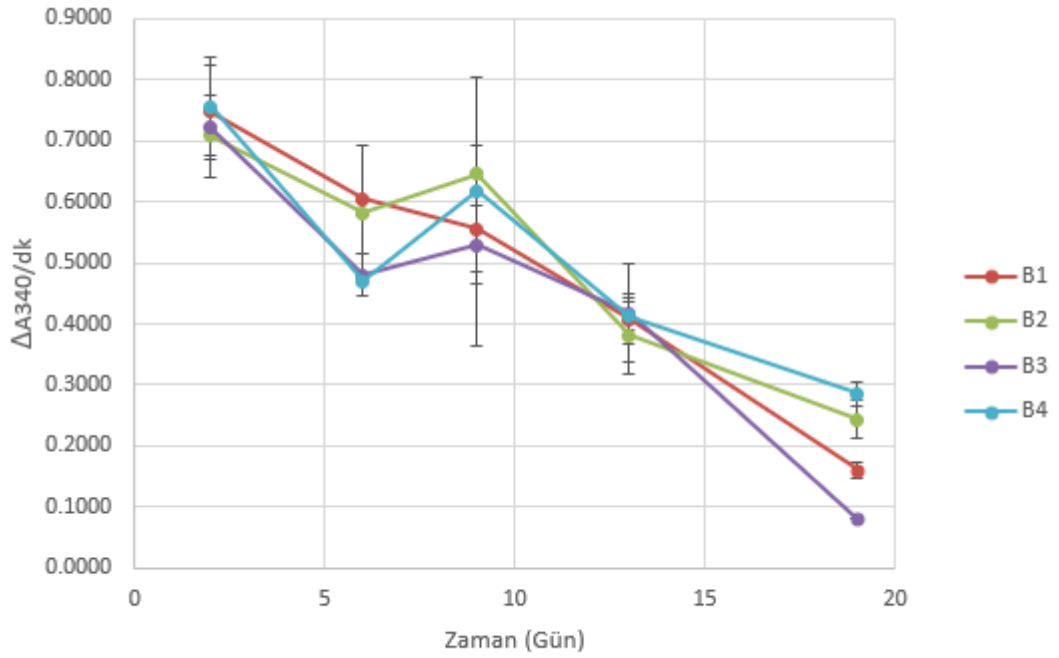
Yapılan diğerk apikompleksan LDH alışmalarında *T. annulata* (Nural vd. 2016), *P. falciparum* için de benzer sonuçlar olduğu görülmüştür (Tian vd. 2021). *T. annulata* LDH'ında 20°C, 30°C ve 40°C'lerde enzim aktivitesini korurken, 50°C ve 60°C'lerde aktivite en 15. dakikada tamamen düşmüştür. *P. falciparum* LDH'sinde ise 25°C-45°C arasında yüksek aktivite görülürken, 50°C-65°C'lerde aktivite azalmakta ve devamında görülmemektedir. BbigLDH'nin de 30°C ve 40°C sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterdiği 50°C'de azalmayla beraber sonlandığı ve 60°C'de ise aktivite göstermediği görülmüştür. Bu durumda apikompleksan LDH'lerinin 20°C-40°C arasında yüksek aktivite gösterdiği ancak daha yüksek sıcaklıklara dayanamadığı anlaşılabilmektedir.

3.21. BbigLDH Uygun Saklama Koşullarının Belirlenmesi

Enzim stabilizasyonu amacıyla, DTT, EDTA ve gliserol gibi stabilizatörler farklı konsantrasyonlarda hem tek başlarına hem de çeşitli kombinasyonlar halinde saflaştırılan enzim çözeltisine eklenmiştir. Stabilizatrlerin etkilerine bakıldığında, EDTA'nın Ca^{2+} ve Fe^{3+} gibi metal iyonları ile kompleks oluşturarak, enzimdeki -SH gruplarının bu metaller tarafından oksitlenmesini engelleyerek enzimin stabilizasyonunu sağladığı bilinmektedir (Batista-Viera, Janson, ve Carlsson 2011). DTT ise proteinlerin sistein amino asitleri arasında disülfid bağlarının oluşumunu engelleyerek enzim stabilitesini artırmaktadır (Cleland 1964). Gliserol, proteinlerin yapısal bütünlüğünü korumak ve enzimlerin aktivitesini stabilize etmek için yaygın olarak kullanılan bir stabilizatrdr (nl ve Takaç 2018). Bu zellik, gliserolün aşağıdaki etkilerinden kaynaklanmaktadır; (1) Hidratasyonun korunması: Gliserol, proteinlerin çevresindeki su molekülleriyle etkileşime girerek, enzimlerin hidratasyon durumunu stabilize eder ve denatürasyona karşı koruma sağlamaktadır. (2) Termal stabilizasyon: Gliserol, enzimlerin erime sıcaklığını artırıp termal denatürasyona karşı koruma sağlamaktadır. Bu, özellikle yüksek sıcaklıklarda çalışan enzimler için önemlidir. (3) Konformasyonel stabilite: Gliserol, proteinlerin katlanmış durumlarını stabilize etmekte ve yanlış katlanmayı ya da agregasyonu önlemektedir (4) Solvent etkileri: Gliserol, zc ortamın viskozitesini artırarak enzim üzerinde mekanik stresin azalmasını sağlamaktadır (nl ve Takaç 2018). Bu stabilizatörlerin enzim üzerindeki etkileri, enzim aktivitesini koruma ve uzun süreli stabilite sağlama açısından önemli bir rol oynamaktadır.

Tablo 3.27. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda +4°C’de saklanan enzim aktivitesinin üç ölçümün ortalamaları.

GÜN	B1	B2	B3	B4
2	0.7480	0.7083	0.7208	0.7565
6	0.6045	0.5813	0.4801	0.4692
9	0.5549	0.6457	0.5288	0.6179
13	0.4083	0.3811	0.4178	0.4131
19	0.1608	0.2441	0.0813	0.2854



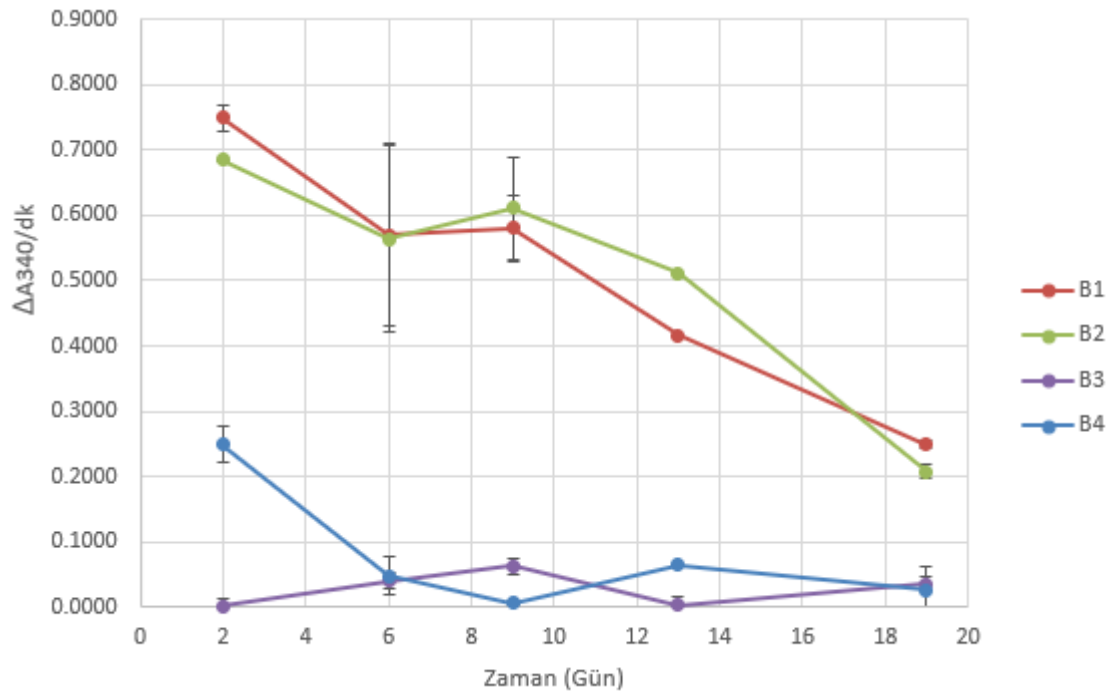
Şekil 3.35. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda +4°C’de saklanan enzim aktivite ölçümleri. B1: EDTA+DTT+gliserol, B2: DTT+gliserol, B3: DTT, B4: Katkısız. Üç ölçümün ortalaması olarak hata ölçümleri verilmiştir.

+4°C’de yapılan stabilizasyon deney sonuçlarına göre (Şekil 3.35), 9. güne kadar bütün örneklerin yüksek aktiviteye sahip olduğu ancak 13. güne doğru hepsinin aktivitesinde düşüş olduğu görülmektedir. Ancak 19. Güne gelindiğinde yalnızca katkısız olan B4 ve DTT ve gliserol olan B2 de düşüğe olsa aktivite görüldüğü tespit

edilmiştir. Enzim 9 güne kadar saf bir şekilde +4°C’de saklandığı takdirde aktivitesini korumakta 19. günde ise düşük aktiviteye sahiptir.

Tablo 3.28. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -20°C’de saklanan enzim aktivitesinin üç ölçümün ortalamaları.

GÜN	B1	B2	B3	B4
2	0.7492	0.6854	0.0010	0.2488
6	0.5705	0.5630	0.0404	0.0473
9	0.5800	0.6108	0.0628	0.0067
13	0.4158	0.5118	0.0037	0.0647
19	0.2491	0.2073	0.0357	0.0267



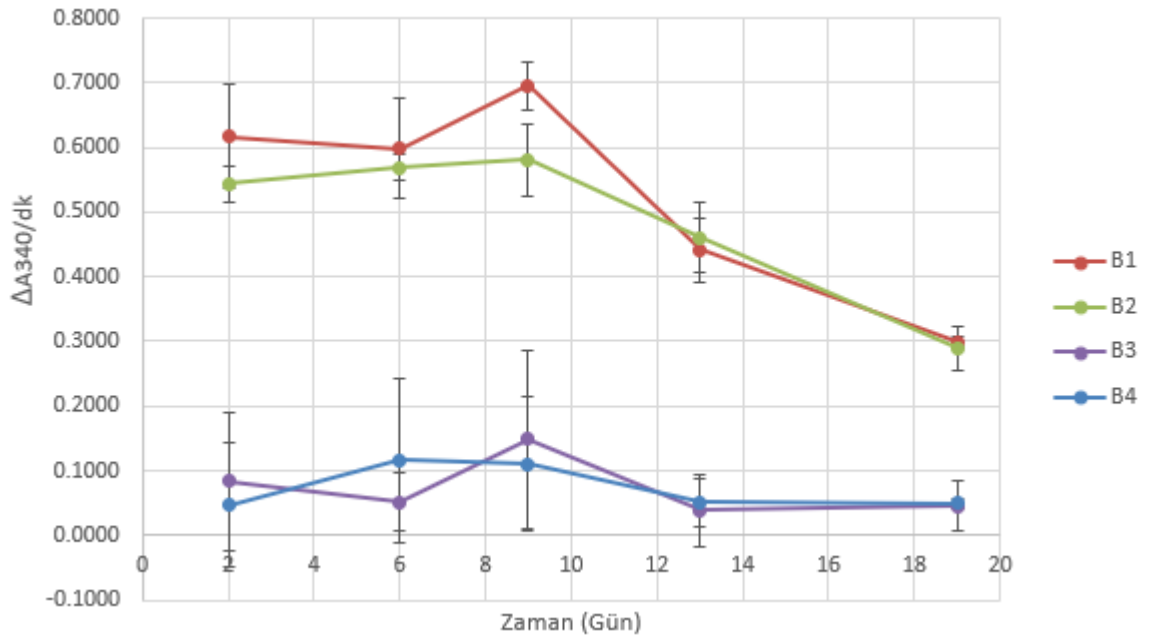
Şekil 3.36. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -20°C’de saklanan enzim aktivite ölçümleri. B1: EDTA+DTT+gliserol, B2: DTT+gliserol, B3: DTT, B4: Katkısız. Üç ölçümün ortalaması olarak hata ölçümleri verilmiştir.

-20°C’de yapılan stabilizasyon deney sonuçlarına göre açıkça görülüyor ki (Şekil 3.36), enzim katkısız (B4) bir şekilde bu sıcaklıkta saklanamamaktadır. Aynı sıcaklıkta enzim yalnızca DTT (B3) ile de stabil bir şekilde de saklanamamaktadır.

Ancak B1 ve B2 örneklerine bakıldığında her ikisinin de benzer biçimde stabilizasyon sonuçlarına sahip oldukları gözlemlenmiştir. 9. güne kadar enzim aktivitesi korunurken 13. ve 19. günlerde aktivite de düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak gliserol eklenmesi halinde enzim, 9. güne kadar aktivitesini koruyarak 19. güne kadar ise -20°C’de düşük aktiviteye sahip olarak saklanabilmektedir.

Tablo 3.29. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -80°C’de saklanan enzim aktivitesinin üç ölçümün ortalamaları.

GÜN	B1	B2	B3	B4
2	0.6174	0.5442	0.0836	0.0463
6	0.5989	0.5696	0.0517	0.1159
9	0.6952	0.5807	0.1491	0.1102
13	0.4413	0.4605	0.0382	0.0514
19	0.2999	0.2896	0.0457	0.0495



Şekil 3.37. 2., 6., 9., 13. ve 19. günün sonunda -80°C’de saklanan enzim aktivite ölçümleri. B1: EDTA+DTT+gliserol, B2: DTT+gliserol, B3: DTT, B4: Katkısız. Üç ölçümün ortalaması olarak hata ölçümleri verilmiştir.

-80°C’de yapılan stabilizasyon deney sonuçlarına göre (Şekil 3.37), enzim katkısız (B4) bir şekilde bu sıcaklıkta saklanamamaktadır. Devamında ise bu sıcaklıkta aynı zamanda enzim yalnızca DTT (B3) ile de stabil bir şekilde saklanamamaktadır. Ancak B1 ve B2 örneklerine bakıldığında her ikisinin de benzer biçimde stabilizasyon sonuçlarına sahip oldukları gözlemlenmiştir. 9. güne kadar enzim aktivitesi korunurken 13. ve 19. günlerde aktivite de düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak gliserol eklenmesi halinde enzim, 9. güne kadar aktivitesini koruyarak 19. güne kadar ise -80°C’de düşük aktiviteye sahip olarak saklanabilmektedir. Her koşulda da 9. günden sonra aktivitede düşüş gözlemlenmekle birlikte tüm sıcaklıklar değerlendirildiğinde en iyi saklama koşulunun ise +4°C’de katkısız (9. güne kadar) olduğu anlaşılmaktadır.

4. SONUÇLAR VE GELECEĞE BAKIŞ

Günümüze kadar yayınlanan raporlara göre, mevcut kullanımdaki anti-babesial ilaçlara karşı direncin varlığı bilinmektedir (Bork vd. 2004). Bu durum, farklı etki mekanizmalarına sahip yeni ilaçların geliştirilmesi için hedeflerin belirlenmesinin aciliyetini vurgulamaktadır. Laktat dehidrogenaz enzimi, parazitin anaerobik yolağındaki önemli rolü nedeniyle, ileriye dönük ilaç tasarım çabaları için umut vadeden bir adaydır (Dunn vd. 1996; Gomez vd. 1997; He vd. 2022).

Bu çalışmada,

1. *In vitro* yöntemlerle; *B. bigemina* laktat dehidrogenazı klonlanmış ve enzim metal afinite kromatografisi ile saf bir şekilde elde edilmiştir. Elde edilen enzim karakterizasyonu için aktivite ve kinetik ölçümlerinin yanısıra termostabilite, farklı koşullarda enzim stabilitesi ve farklı pH aralıklarındaki aktivite ölçümleride gerçekleştirilmiştir. BbigLDH'nin kinetik sonuçlarına göre, yarı-maksimum hızda görülen görünür substrat konsantrasyonu ($S_{0.5}$) için NADH 0.3094 mM olarak belirlenip, pirüvat için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ise 0.2585 mM olarak bulunmuştur. Maksimum hızlar (V_{max}), sırasıyla NADH için 59.2 U mg⁻¹ protein min⁻¹ ve pirüvat için 23.97 U mg⁻¹ protein min⁻¹ olarak ölçülmüştür. Pirüvata göre K_m değerleri değerlendirildiğinde; *Babesia microti* LDH'si en yüksek, *Plasmodium falciparum* LDH'si en düşük değere sahiptir. *Babesia bigemina* LDH'si ise genel değerlere göre ortalama bir K_m değerine sahiptir.

Stabilite testlerinde ise BbigLDH için +4°C'de 9. güne kadar katkısız saklama koşullarının en uygun olduğu görülmüştür. Termostabilite deneylerinde ise *T. annulata* ve *P. falciparum* LDH'lerindeki yapılan çalışmalara paralel olarak 30°C ve 40°C'lerde yüksek aktivite gösteren enzim 50°C ve 60°C'lerde aktivite göstermemiştir. Yapılan bir diğer deney olan farklı pH ortamlarında BbigLDH aktivite ölçümünde, optimum pH 8.5 olduğu görülmüştür. Diğer apikompleksan LDH'leri ile karşılaştırıldığında *P. falciparum* ve *T. annulata* için optimum pH 7.5 olduğu görülmektedir.

BbigLDH enziminin yüksek saflıkta saflaştırılması hem biyokimyasal hem de yapısal biyoloji çalışmaları için önemli bir temel sağlamaktadır. İleride substrat spesifikliğı ve inhibitör bağlanma dinamikleri gibi detaylı biyokimyasal analizler

gerçekleştirilerek, BbigLDH'nin fonksiyonel özellikleri ve kinetik parametreleri daha iyi anlaşılabilir. Ayrıca, kristalografi veya kriyo-elektron mikroskobu gibi yapısal biyoloji teknikleriyle enzimin üç boyutlu yapısı çözülerek, aktif bölgeye özgü moleküler etkileşimler detaylı şekilde incelenebilir. Bu veriler, BbigLDH'yi hedefleyen yüksek spesifikte ve düşük toksisiteli inhibitörlerin tasarımı için kullanılabilir ve bu inhibitörler, *Babesia bigemina* gibi apikompleksan parazitlere karşı yeni ve etkili ilaç adaylarının geliştirilmesine öncülük edebilir.

2. *In silico* çalışmalarda ise; Yapı için çoklu sekans analizi yapıldığında substrat spesifik döngüde 5 amino asitin varlığına ek olarak karşıt döngüde 3 amino asitlik motif (G[STN]G) görülmüştür. Plasmodium ve konak LDH'lerinde bu kısımda delesyon mevcut olduğu için bağlanma bölgesi için önemli olan bu bölgelerin spesifik ilaç tasarımına katkısı olabileceği düşünülmektedir. 3B yapısı bilinmeyen BbigLDH için öncelikle homoloji modelleme yapılmıştır. Ardından model validasyonları ve minimizasyon yapılmıştır. 100 ns NAMD kullanılarak MD simülasyonları ile kapalı ve açık olmak üzere iki yeni BbigLDH yapısı elde edilmiştir. MD öncesi ve sonrası olmak üzere kapalı ve açık dört yapı ile önceden hazırlanan çeşitlilik kütüphaneleriyle moleküler yanaştırma yapılmıştır. Her bir yapı için en düşük XP Gscore sahip 256 bileşik için ADME değerlendirmesi yapılmıştır. İlaç adayı olabilme özelliklerine sahip 133 bileşik QPLD ve indüklenmiş uyum yanaştırması ile yeniden skorlanmıştır (ve 70 bileşik elde edilmiştir). Son olarak konak LDHleri ile iyi bağlanma göstermeyen 20 bileşik MDS için seçilmiştir. MDS için GROMACS (100 ns) ve Desmond (20 ns, 300 ns, 1000 ns) kullanılmıştır. Ayrıca MM/GBSA ile serbest bağlanma enerjisi hesaplanmıştır. Sonuç olarak C9 (Z2373310039, ΔG : -52 kcal/mol), C16 (Z2201943136, ΔG : -62 kcal/mol) ve C18 (Z2063989764, ΔG : -62 kcal/mol) olmak üzere üç bileşiğin ileri çalışmalar için uygun özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Bu bulguların kapsamlı analizi, yapı temelli sanal taramanın, yeni BbigLDH inhibitörlerinin tasarımı için gerekli olan temel yapısal ve bağlanma özellikleri konusunda kritik verileri sağlama konusundaki önemi vurgulanmaktadır. Bu sayede, sığır babesiosisine yönelik tedaviler için alternatif olabilecek potansiyel yeni yollar sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Aguiar, Anna Caroline Campos, Raquel de Meneses Santos, Flávio Júnior Barbosa Figueiredo, Wilian Augusto Cortopassi, André Silva Pimentel, Tanos Celmar Costa França, Mario Roberto Meneghetti, ve Antoniana Ursine Krettli. 2012. "Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of Two Novel 4-Aminoquinolines against Chloroquine-Resistant Parasites". Editör Anne Charlotte Gruner. *PLoS ONE* 7 (5): e37259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037259>.
- Akaddar, Aziza, Cécile Doderer-Lang, Melissa R. Marzahn, François Delalande, Marc Mousli, Karen Helle, Alain Van Dorsselaer, vd. 2010. "Catestatin, an Endogenous Chromogranin A-Derived Peptide, Inhibits in Vitro Growth of Plasmodium Falciparum". *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (6): 1005-15. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0235-8>.
- Akash, Shopnil, Md. Eram Hosen, Sajjat Mahmood, Sumaiya Jahan Supti, Ajoy Kumer, Shamima Sultana, Sultana Jannat, vd. 2023. "Anti-Parasitic Drug Discovery against Babesia Microti by Natural Compounds: An Extensive Computational Drug Design Approach". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13 (Ağustos):1222913. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1222913>.
- Al-Anouti, Fatme, Stanislas Tomavo, Stephen Parmley, ve Sirinart Ananvoranich. 2004. "The Expression of Lactate Dehydrogenase Is Important for the Cell Cycle of Toxoplasma Gondii". *Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 52300-311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409175200>.
- Allen, P. C., ve R. H. Fetterer. 2002. "Recent Advances in Biology and Immunobiology of Eimeria Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry". *Clinical Microbiology Reviews* 15 (1): 58-65. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.58-65.2002>.
- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, ve David J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool". *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Babes, V. 1888. "Sur l'hémoglobininurie bacterienne du boeuf." *CR Acad. Sci*, sy 107, 692-94.
- Bailey, Timothy L., James Johnson, Charles E. Grant, ve William S. Noble. 2015. "The MEME Suite". *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W39-49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
- Batista-Viera, Francisco, Jan-Christer Janson, ve Jan Carlsson. 2011. "Affinity Chromatography". İçinde *Methods of Biochemical Analysis*, editör Jan-Christer Janson, 1. bs, 221-58. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470939932.ch9>.
- Benkert, Pascal, Silvio C. E. Tosatto, ve Dietmar Schomburg. 2008. "QMEAN: A Comprehensive Scoring Function for Model Quality Assessment". *Proteins* 71 (1): 261-77. <https://doi.org/10.1002/prot.21715>.
- Bertrand, Quentin, Sandrine Coquille, Antonio Iorio, Fabio Sterpone, ve Dominique Madern. 2023. "Biochemical, Structural and Dynamical Characterizations of the Lactate Dehydrogenase from Selenomonas Ruminantium Provide Information about an Intermediate Evolutionary Step Prior to Complete Allosteric Regulation Acquisition in the Super Family of Lactate and Malate Dehydrogenases". *Journal of Structural Biology* 215 (4): 108039. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2023.108039>.
- Bishop, R., A. Musoke, S. Morzaria, M. Gardner, ve V. Nene. 2004. "Theileria : Intracellular Protozoan Parasites of Wild and Domestic Ruminants Transmitted by Ixodid Ticks". *Parasitology* 129 (S1): S271-83. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004748>.
- Bock, R., L. Jackson, A. De Vos, ve W. Jorgensen. 2004. "Babesiosis of Cattle". *Parasitology* 129 (S1): S247-69. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>.

- Bork, Sabine, Masashi Okamura, Suthisak Boonchit, Haruyuki Hirata, Naoaki Yokoyama, ve Ikuo Igarashi. 2004. "Identification of Babesia Bovis L-Lactate Dehydrogenase as a Potential Chemotherapeutical Target against Bovine Babesiosis". *Molecular and Biochemical Parasitology* 136 (2): 165-72. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.03.009>.
- Boucher, Jeffrey I, Joseph R Jacobowitz, Brian C Beckett, Scott Classen, ve Douglas L Theobald. 2014. "An Atomic-Resolution View of Neofunctionalization in the Evolution of Apicomplexan Lactate Dehydrogenases". *eLife* 3 (Haziran):e02304. <https://doi.org/10.7554/eLife.02304>.
- Bowie, J. U., R. Lüthy, ve D. Eisenberg. 1991. "A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure". *Science (New York, N.Y.)* 253 (5016): 164-70. <https://doi.org/10.1126/science.1853201>.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding".
- Brown, W. Michael, Charles A. Yowell, Anna Hoard, Thomas A. Vander Jagt, Lucy A. Hunsaker, Lorraine M. Deck, Robert E. Royer, vd. 2004. "Comparative Structural Analysis and Kinetic Properties of Lactate Dehydrogenases from the Four Species of Human Malarial Parasites". *Biochemistry* 43 (20): 6219-29. <https://doi.org/10.1021/bi049892w>.
- Buchan, Daniel W. A., Federico Minneci, Tim C. O. Nugent, Kevin Bryson, ve David T. Jones. 2013. "Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench". *Nucleic Acids Research* 41 (Web Server issue): W349-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt381>.
- Calvopiña, Manuel, María Montesdeoca-Andrade, Carlos Bastidas-Caldes, Sandra Enriquez, Richar Rodríguez-Hidalgo, Dayana Aguilar-Rodríguez, ve Philip Cooper. 2023. "Case Report: First Report on Human Infection by Tick-Borne Babesia Bigemina in the Amazon Region of Ecuador". *Frontiers in Public Health* 11 (Ağustos):1079042. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1079042>.
- Cameron, Angus, Jon Read, Rebecca Tranter, Victoria J. Winter, Richard B. Sessions, R. Leo Brady, Livia Vivas, vd. 2004. "Identification and Activity of a Series of Azole-Based Compounds with Lactate Dehydrogenase-Directed Anti-Malarial Activity". *Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 31429-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402433200>.
- Cavalli, Andrea, Elisabetta Poluzzi, Fabrizio De Ponti, ve Maurizio Recanatini. 2002. "Toward a Pharmacophore for Drugs Inducing the Long QT Syndrome: Insights from a CoMFA Study of HERG K⁺ Channel Blockers". *Journal of Medicinal Chemistry* 45 (18): 3844-53. <https://doi.org/10.1021/jm0208875>.
- Chaikuad, Apirat, Victoria Fairweather, Rebecca Connors, Tim Joseph-Horne, Dilek Turgut-Balik, ve R. Leo Brady. 2005. "Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium Vivax*: Complexes with NADH and APADH". *Biochemistry* 44 (49): 16221-28. <https://doi.org/10.1021/bi051416y>.
- Chang, Antje, Lisa Jeske, Sandra Ulbrich, Julia Hofmann, Julia Koblitz, Ida Schomburg, Meina Neumann-Schaal, Dieter Jahn, ve Dietmar Schomburg. 2021. "BRENDA, the ELIXIR Core Data Resource in 2021: New Developments and Updates". *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D498-508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025>.
- Choi, Seoung-ryoung, Anupam Pradhan, Nicholas L. Hammond, Amar G. Chittiboyina, Babu L. Tekwani, ve Mitchell A. Avery. 2007. "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of *Plasmodium Falciparum* Lactate Dehydrogenase Inhibitors". *Journal of Medicinal Chemistry* 50 (16): 3841-50. <https://doi.org/10.1021/jm070336k>.
- Cleland, W. W. 1964. "Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups *". *Biochemistry* 3 (4): 480-82. <https://doi.org/10.1021/bi00892a002>.

- Coldham, N. G., A. S. Moore, M. Dave, P. J. Graham, S. Sivapathasundaram, B. G. Lake, ve M. J. Sauer. 1995. "Imidocarb Residues in Edible Bovine Tissues and in Vitro Assessment of Imidocarb Metabolism and Cytotoxicity". *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 23 (4): 501-5.
- Colmenarejo, Gonzalo, Ana Alvarez-Pedraglio, ve José-Luis Lavandera. 2001. "Cheminformatic Models To Predict Binding Affinities to Human Serum Albumin". *Journal of Medicinal Chemistry* 44 (25): 4370-78. <https://doi.org/10.1021/jm010960b>.
- Colovos, C., ve T. O. Yeates. 1993. "Verification of Protein Structures: Patterns of Nonbonded Atomic Interactions". *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 2 (9): 1511-19. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>.
- Connors, Rebecca, Felix Schambach, Jon Read, Angus Cameron, Richard B. Sessions, Livia Vivas, Anna Easton, Simon L. Croft, ve R. Leo Brady. 2005. "Mapping the Binding Site for Gossypol-like Inhibitors of Plasmodium Falciparum Lactate Dehydrogenase". *Molecular and Biochemical Parasitology* 142 (2): 137-48. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.03.015>.
- Cortopassi, Wilian A., Aline A. Oliveira, Ana P. Guimarães, Magdalena N. Rennó, Antoniana U. Krettli, ve Tanos C.C. França. 2011. "Docking Studies on the Binding of Quinoline Derivatives and Hematin to Plasmodium Falciparum Lactate Dehydrogenase". *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 29 (1): 207-18. <https://doi.org/10.1080/07391102.2011.10507383>.
- Criado-Fornelio, A, A Martinez-Marcos, A Buling-Saraña, ve J.C Barba-Carretero. 2003. "Molecular Studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in Southern Europe". *Veterinary Parasitology* 114 (3): 173-94. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00141-9).
- Cristobal, Susana, Adam Zemla, Daniel Fischer, Leszek Rychlewski, ve Arne Elofsson. 2001. "A Study of Quality Measures for Protein Threading Models". *BMC Bioinformatics*, 15.
- Dando, Caroline, Eric R Schroeder, Lucy A Hunsaker, Lorraine M Deck, Robert E Royer, Xiulan Zhou, Stephen F Parmley, ve David L Vander Jagt. 2001. "The Kinetic Properties and Sensitivities to Inhibitors of Lactate Dehydrogenases (LDH1 and LDH2) from Toxoplasma Gondii: Comparisons with pLDH from Plasmodium Falciparum". *Molecular and Biochemical Parasitology* 118 (1): 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00360-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00360-7).
- Deck, Lorraine M., Robert E. Royer, Brian B. Chamblee, Valerie M. Hernandez, Richard R. Malone, Jose E. Torres, Lucy A. Hunsaker, Robert C. Piper, Michael T. Makler, ve David L. Vander Jagt. 1998. "Selective Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenases and Lactate Dehydrogenase from the Malarial Parasite Plasmodium falciparum". *Journal of Medicinal Chemistry* 41 (20): 3879-87. <https://doi.org/10.1021/jm980334n>.
- Dhal, Ajit Kumar, Alok Pani, Rajani Kanta Mahapatra, ve Soon-IL Yun. 2018. "In-Silico Screening of Small Molecule Inhibitors against Lactate Dehydrogenase (LDH) of Cryptosporidium Parvum". *Computational Biology and Chemistry* 77 (Aralık):44-51. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.09.002>.
- Dunn, Cameron R., Mark J. Banfield, John J. Barker, Christopher W. Higham, Kathleen M. Moreton, Dilek Turgut-Balik, R. Leo Brady, ve J. John Holbrook. 1996. "The structure of lactate dehydrogenase from Plasmodium falciparum reveals a new target for anti-malarial design". *Nature Structural Biology* 3 (11): 912-15. <https://doi.org/10.1038/nsb1196-912>.
- Edgar, R. C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput". *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792-97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

- Erdemir, Aysegul, ve Ozal Mutlu. 2017. "Functional and Structural Characterization of the Pentapeptide Insertion of Theileria Annulata Lactate Dehydrogenase by Site-Directed Mutagenesis, Comparative Modeling and Molecular Dynamics Simulations". *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 74 (Haziran):344-51. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.04.010>.
- Eventoff, W, M G Rossmann, S S Taylor, H J Torff, H Meyer, W Keil, ve H H Kiltz. 1977. "Structural Adaptations of Lactate Dehydrogenase Isozymes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (7): 2677-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.2677>.
- Friesner, Richard A., Jay L. Banks, Robert B. Murphy, Thomas A. Halgren, Jasna J. Klicic, Daniel T. Mainz, Matthew P. Repasky, vd. 2004. "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy". *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (7): 1739-49. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>.
- Gething, Peter W, Anand P Patil, David L Smith, Carlos A Guerra, Iqbal Rf Elyazar, Geoffrey L Johnston, Andrew J Tatem, ve Simon I Hay. 2011. "A New World Malaria Map: Plasmodium Falciparum Endemicity in 2010". *Malaria Journal* 10 (1): 378. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-378>.
- Gomez, Manuel S, Robert C Piper, Lucy A Hunsaker, Robert E Royer, Lorraine M Deck, Michael T Makler, ve David L Vander Jagt. 1997. "Substrate and Cofactor Specificity and Selective Inhibition of Lactate Dehydrogenase from the Malarial Parasite P. Falciparum". *Molecular and Biochemical Parasitology* 90 (1): 235-46. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00140-0).
- Gouet, P. 2003. "ESPrpt/ENDscript: Extracting and Rendering Sequence and 3D Information from Atomic Structures of Proteins". *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3320-23. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg556>.
- Gray, Jeremy S., Agustín Estrada-Peña, ve Annetta Zintl. 2019. "Vectors of Babesiosis". *Annual Review of Entomology* 64 (1): 149-65. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111932>.
- Halgren, Thomas A., Robert B. Murphy, Richard A. Friesner, Hege S. Beard, Leah L. Frye, W. Thomas Pollard, ve Jay L. Banks. 2004. "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening". *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (7): 1750-59. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>.
- He, Lan, Reginaldo G. Bastos, Long Yu, Jacob M. Laughery, ve Carlos E. Suarez. 2022. "Lactate Dehydrogenase as a Potential Therapeutic Drug Target to Control Babesia Bigemina". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (Nisan):870852. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.870852>.
- Hinrichs, David J., ve Michael T. Makler. 1993. "Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of Plasmodium Falciparum as an Assessment of Parasitemia". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48 (2): 205-10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.205>.
- Homewood, C. A., ve K. D. Neame. 1983. "Conversion of Glucose to Lactate by Intraerythrocytic Plasmodium Berghei". *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 77 (2): 127-29. <https://doi.org/10.1080/00034983.1983.11811686>.
- Hoover, William G. 1985. "Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions". *Physical Review A* 31 (3): 1695-97. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695>.
- Humphrey, William, Andrew Dalke, ve Klaus Schulten. 1996. "VMD: Visual Molecular Dynamics". *Journal of Molecular Graphics* 14 (1): 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- J. Mosqueda, A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, ve G. J. Canto. 2012. "Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis". *Current Medicinal Chemistry* 19 (10): 1504-18. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>.

- Jacobson, Matthew P., Richard A. Friesner, Zhixin Xiang, ve Barry Honig. 2002. "On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-Chain Conformations". *Journal of Molecular Biology* 320 (3): 597-608. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00470-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00470-9).
- Jalovecka, Marie, David Hartmann, Yukiko Miyamoto, Lars Eckmann, Ondrej Hajdusek, Anthony J. O'Donoghue, ve Daniel Sojka. 2018. "Validation of Babesia Proteasome as a Drug Target". *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 8 (3): 394-402. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.08.001>.
- Jalovecka, Marie, Daniel Sojka, Mariano Ascencio, ve Leonhard Schnittger. 2019. "Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology". *Trends in Parasitology* 35 (5): 356-68. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>.
- Jorgensen, William L., ve Erin M. Duffy. 2000. "Prediction of Drug Solubility from Monte Carlo Simulations". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10 (11): 1155-58. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00172-4](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00172-4).
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, vd. 2021. "Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold". *Nature* 596 (7873): 583-89. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kavanagh, Kathryn L., Robert A. Elling, ve David K. Wilson. 2004. "Structure of *Toxoplasma Gondii* LDH1: Active-Site Differences from Human Lactate Dehydrogenases and the Structural Basis for Efficient APAD⁺ Use". *Biochemistry* 43 (4): 879-89. <https://doi.org/10.1021/bi035108g>.
- Kuang, Liangde, Yucai Zheng, Yaqiu Lin, Yaou Xu, Suyu Jin, Yuping Li, Feng Dong, ve Zhongyong Jiang. 2010. "High-Altitude Adaptation of Yak Based on Genetic Variants and Activity of Lactate Dehydrogenase-1". *Biochemical Genetics* 48 (5-6): 418-27. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9322-7>.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss, ve J. M. Thornton. 1993. "PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures". *Journal of Applied Crystallography* 26 (2): 283-91. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>.
- Lee, Jumin, Xi Cheng, Jason M. Swails, Min Sun Yeom, Peter K. Eastman, Justin A. Lemkul, Shuai Wei, vd. 2016. "CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field". *Journal of Chemical Theory and Computation* 12 (1): 405-13. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- Li, Kun, Sara M. Nader, Xuejin Zhang, Benjamin C. Ray, Chi Yong Kim, Aditi Das, ve William H. Witola. 2019. "Novel Lactate Dehydrogenase Inhibitors with in Vivo Efficacy against *Cryptosporidium Parvum*". Editör Laura J. Knoll. *PLOS Pathogens* 15 (7): e1007953. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007953>.
- Lipinski, Christopher A. 2000. "Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability". *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44 (1): 235-49. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00107-6).
- Luco, Juan M. 1999. "Prediction of the Brain–Blood Distribution of a Large Set of Drugs from Structurally Derived Descriptors Using Partial Least-Squares (PLS) Modeling". *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 39 (2): 396-404. <https://doi.org/10.1021/ci980411n>.
- Lüthy, R., J. U. Bowie, ve D. Eisenberg. 1992. "Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles". *Nature* 356 (6364): 83-85. <https://doi.org/10.1038/356083a0>.
- Madern, D. 2003. "Evolution of *Cryptosporidium Parvum* Lactate Dehydrogenase from Malate Dehydrogenase by a Very Recent Event of Gene Duplication". *Molecular Biology and Evolution* 21 (3): 489-97. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh042>.

- Madhavi Sastry, G., Matvey Adzhigirey, Tyler Day, Ramakrishna Annabhimoju, ve Woody Sherman. 2013. "Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments". *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 27 (3): 221-34. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>.
- Martyna, Glenn J., Douglas J. Tobias, ve Michael L. Klein. 1994. "Constant Pressure Molecular Dynamics Algorithms". *The Journal of Chemical Physics* 101 (5): 4177-89. <https://doi.org/10.1063/1.467468>.
- McHARDY, N., R.M. Woollon, R.B. Clampitt, J.A. James, ve R.J. Crawley. 1986. "Efficacy, Toxicity and Metabolism of Imidocarb Dipropionate in the Treatment of Babesia Ovis Infection in Sheep". *Research in Veterinary Science* 41 (1): 14-20. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30565-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30565-4).
- Mphahlele, Malose, Mmakwena Mmonwa, ve Yee Choong. 2017. "Synthesis and Evaluation of N-(3-Trifluoroacetyl-Indol-7-Yl) Acetamides for Potential In Vitro Antiplasmodial Properties". *Molecules* 22 (7): 1099. <https://doi.org/10.3390/molecules22071099>.
- Mutlu, Ozal, ve Dilek Turgut Balik. 2012. "Kinetic Analysis of the Amino Terminal End of Active Site Loop of Lactate Deyhydrogenase from Plasmodium Vivax". *Balkan Medical Journal* 29 (4): 364-69. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2012.047>.
- Nelson, D.L., ve M.M. Cox. 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Üçüncü baskı. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Nural, Belma, Aysegul Erdemir, Ozal Mutlu, Sinem Yakarsonmez, Ozkan Danis, Murat Topuzogullari, ve Dilek Turgut-Balik. 2016. "Biochemical and in Silico Characterization of Recombinant L-Lactate Dehydrogenase of Theileria Annulata". *Molecular Biotechnology* 58 (4): 256-67. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9924-3>.
- Ozubek, Sezayi, Reginaldo G. Bastos, Heba F. Alzan, Abdullah Inci, Munir Aktas, ve Carlos E. Suarez. 2020. "Bovine Babesiosis in Turkey: Impact, Current Gaps, and Opportunities for Intervention". *Pathogens* 9 (12): 1041. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121041>.
- Paysan-Lafosse, Typhaine, Matthias Blum, Sara Chuguransky, Tiago Grego, Beatriz Lázaro Pinto, Gustavo A Salazar, Maxwell L Bileschi, vd. 2023. "InterPro in 2022". *Nucleic Acids Research* 51 (D1): D418-27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>.
- Penna-Coutinho, Julia, Wilian Augusto Cortopassi, Aline Alves Oliveira, Tanos Celmar Costa França, ve Antoniana Ursine Krettl. 2011. "Antimalarial Activity of Potential Inhibitors of Plasmodium Falciparum Lactate Dehydrogenase Enzyme Selected by Docking Studies". Editör Mauricio Martins Rodrigues. *PLoS ONE* 6 (7): e21237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021237>.
- Pettit, S M, D A Nealon, ve A R Henderson. 1981. "Purification of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme-5 from Human Liver." *Clinical Chemistry* 27 (1): 88-93. <https://doi.org/10.1093/clinchem/27.1.88>.
- Phillips, James C., David J. Hardy, Julio D. C. Maia, John E. Stone, João V. Ribeiro, Rafael C. Bernardi, Ronak Buch, vd. 2020. "Scalable Molecular Dynamics on CPU and GPU Architectures with NAMD". *The Journal of Chemical Physics* 153 (4): 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>.
- Pineda, J. R. Exequiel T., Robert Callender, ve Steven D. Schwartz. 2007. "Ligand Binding and Protein Dynamics in Lactate Dehydrogenase". *Biophysical Journal* 93 (5): 1474-83. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.106146>.
- Read, Jon A., Kay W. Wilkinson, Rebecca Tranter, Richard B. Sessions, ve R. Leo Brady. 1999. "Chloroquine Binds in the Cofactor Binding Site of Plasmodium Falciparum Lactate Dehydrogenase". *Journal of Biological Chemistry* 274 (15): 10213-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10213>.

- Royer, Robert E., Lorraine M. Deck, Naomi M. Campos, Lucy A. Hunsaker, ve David L. Vander Jagt. 1986. "Biologically Active Derivatives of Gossypol: Synthesis and Antimalarial Activities of Peri-Acylated Gossylic Nitriles". *Journal of Medicinal Chemistry* 29 (9): 1799-1801. <https://doi.org/10.1021/jm00159a043>.
- Sanger, F., S. Nicklen, ve A. R. Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5463-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- Sayers, Eric W, Evan E Bolton, J Rodney Brister, Kathi Canese, Jessica Chan, Donald C Comeau, Ryan Connor, vd. 2022. "Database Resources of the National Center for Biotechnology Information". *Nucleic Acids Research* 50 (D1): D20-26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.
- Schnittger, Leonhard, Anabel E. Rodriguez, Monica Florin-Christensen, ve David A. Morrison. 2012. "Babesia: A World Emerging". *Infection, Genetics and Evolution* 12 (8): 1788-1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>.
- "Schrödinger Release 2022-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2022". t.y.
- "Schrödinger Release 2022-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022". t.y.
- "Schrödinger Release 2022-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022". t.y.
- "Schrödinger Release 2022-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022". t.y.
- "Schrödinger Release 2022-4: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022-4". t.y.
- Shah, N D, A U Bhikane, R K Jadhav, S G Chavhan, ve Anand Mohan. 2019. "Therapeutic Management of Babesiosis Alone and Its Mixed Infection with Theileriosis in Cattle".
- Shelley, John C., Anuradha Cholleti, Leah L. Frye, Jeremy R. Greenwood, Mathew R. Timlin, ve Makoto Uchimaya. 2007. "Epik: A Software Program for pK_a Prediction and Protonation State Generation for Drug-like Molecules". *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 21 (12): 681-91. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9133-z>.
- Sherman, Woody, Tyler Day, Matthew P. Jacobson, Richard A. Friesner, ve Ramy Farid. 2006. "Novel Procedure for Modeling Ligand/Receptor Induced Fit Effects". *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (2): 534-53. <https://doi.org/10.1021/jm050540c>.
- Shoemark, Deborah K., Matthew J. Cliff, Richard B. Sessions, ve Anthony R. Clarke. 2007. "Enzymatic Properties of the Lactate Dehydrogenase Enzyme from *Plasmodium Falciparum*". *The FEBS Journal* 274 (11): 2738-48. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05808.x>.
- Silva, Jerbeson Hoffmann Da, Renata Rebesquini, Diorges Henrique Setim, Cláudia Almeida Scariot, Maria Isabel Botelho Vieira, Ricardo Zanella, Adriana Costa Da Motta, Leonardo Porto Alves, ve Carlos Bondan. 2020. "Chemoprophylaxis for babesiosis and anaplasmosis in cattle: case report". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 29 (4): e010520. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020096>.
- Sippl, M. J. 1993. "Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins". *Proteins* 17 (4): 355-62. <https://doi.org/10.1002/prot.340170404>.
- Smith, Theobald, ve F. L. Kilborne. 1893. *Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever* /. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Animal Industry,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.124068>.
- Suarez, Carlos E., ve Susan Noh. 2011. "Emerging Perspectives in the Research of Bovine Babesiosis and Anaplasmosis". *Veterinary Parasitology* 180 (1-2): 109-25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>.

- Tamura, Koichiro, Glen Stecher, ve Sudhir Kumar. 2021. "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11". Editör Fabia Ursula Battistuzzi. *Molecular Biology and Evolution* 38 (7): 3022-27. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tenter, Astrid M, Anja R Heckerroth, ve Louis M Weiss. 2000. "Toxoplasma Gondii: From Animals to Humans". *International Journal for Parasitology* 30 (12-13): 1217-58. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7).
- Thompson, Julie D., Desmond G. Higgins, ve Toby J. Gibson. 1994. "CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice". *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673-80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Tian, Lingzhi, Junping Zhou, Qinglan Lv, Fei Liu, Taowei Yang, Xian Zhang, Meijuan Xu, ve Zhiming Rao. 2021. "Rational Engineering of the Plasmodium Falciparum L-Lactate Dehydrogenase Loop Involved in Catalytic Proton Transfer to Improve Chiral 2-Hydroxybutyric Acid Production". *International Journal of Biological Macromolecules* 179 (Mayıs):71-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.144>.
- Todorovic R. A. 1973. "Chemourophylaxis (Imidocarb. Against Babesia bigemina and Babesia argentina Infections". *Am J Vet Res.* 34(9):1153-61 (Eylül). <https://doi.org/PMID:4747036>.
- Turgut-Balik, Dilek, Ekrem Akbulut, Debbie K. Shoemark, Venhar Celik, Kathleen M. Moreton, Richard B. Sessions, J. John Holbrook, ve R. Leo Brady. 2004. "Cloning, Sequence and Expression of the Lactate Dehydrogenase Gene from the Human Malaria Parasite, Plasmodium Vivax". *Biotechnology Letters* 26 (13): 1051-55. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000032958.78158.10>.
- Tuvshintulga, Bumduuren, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, ve Ikuo Igarashi. 2019. "Development of Unstable Resistance to Diminazene Aceturate in Babesia Bovis". *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 9 (Nisan):87-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.02.001>.
- Ünlü, Ayşe Ezgi, ve Serpil Takaç. 2018. "Gliserol varlığında Rhodotorula glutinis çoğalma kinetiğinin incelenmesi ve katalaz aktivitesinin artırılması". *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi* 2018 (2018). <https://doi.org/10.17341/gazimmfd.416357>.
- Van Der Spoel, David, Erik Lindahl, Berk Hess, Gerrit Groenhof, Alan E. Mark, ve Herman J. C. Berendsen. 2005. "GROMACS: Fast, Flexible, and Free". *Journal of Computational Chemistry* 26 (16): 1701-18. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
- Vanommeslaeghe, K., E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, vd. 2009. "CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields". *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>.
- Vial, Henri J., ve A. Gorenflot. 2006. "Chemotherapy against Babesiosis". *Veterinary Parasitology* 138 (1-2): 147-60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.048>.
- Volkamer, A., D. Kuhn, F. Rippmann, ve M. Rarey. 2012. "DoGSiteScorer: A Web Server for Automatic Binding Site Prediction, Analysis and Druggability Assessment". *Bioinformatics* 28 (15): 2074-75. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts310>.
- Volkamer, Andrea, Axel Griewel, Thomas Grombacher, ve Matthias Rarey. 2010. "Analyzing the Topology of Active Sites: On the Prediction of Pockets and Subpockets". *Journal of Chemical Information and Modeling* 50 (11): 2041-52. <https://doi.org/10.1021/ci100241y>.
- Votýpka, Jan, David Modrý, Miroslav Oborník, Jan Šlapeta, ve Julius Lukeš. 2017. "Apicomplexa". İçinde *Handbook of the Protists*, editör John M. Archibald, Alastair

- G.B. Simpson, ve Claudio H. Slamovits, 567-624. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_20.
- Vudriko, Patrick, Tatsunori Masatani, Shinuo Cao, Mohamad Alia Terkawi, Ketsarin Kamyngkird, Ahmed A. Mousa, Paul F. Adjou Moumouni, Yoshifumi Nishikawa, ve Xuenan Xuan. 2014. "Molecular and Kinetic Characterization of *Babesia Microti* Gray Strain Lactate Dehydrogenase as a Potential Drug Target". *Drug Target Insights* 8 (Ocak):DTI.S16504. <https://doi.org/10.4137/DTI.S16504>.
- Wallner, Björn, ve Arne Elofsson. 2003. "Can correct protein models be identified?" *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 12 (5): 1073-86.
- Webb, Benjamin, ve Andrej Sali. 2016. "Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER". *Current Protocols in Bioinformatics* 54 (1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- Wiederstein, Markus, ve Manfred J. Sippl. 2007. "ProSA-Web: Interactive Web Service for the Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins". *Nucleic Acids Research* 35 (Web Server issue): W407-410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.
- Winter, V. 2003. "Crystal Structure of Plasmodium Berghei Lactate Dehydrogenase Indicates the Unique Structural Differences of These Enzymes Are Shared across the Plasmodium Genus". *Molecular and Biochemical Parasitology* 131 (1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00170-1).
- Wirth, Jacob D., Jeffrey I. Boucher, Joseph R. Jacobowitz, Scott Classen, ve Douglas L. Theobald. 2018. "Functional and Structural Resilience of the Active Site Loop in the Evolution of *Plasmodium* Lactate Dehydrogenase". *Biochemistry* 57 (45): 6434-42. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00913>.
- Yakarsonmez, Sinem, Ebru Cayir Cengiz, Ozal Mutlu, ve Dilek Turgut-Balik. 2019. "Functional Analyses of Dipeptide and Pentapeptide Insertions on Theileria Annulata Enolase by Site-Directed Mutagenesis and in Silico Approaches". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1867 (7-8): 732-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.05.006>.
- Yazdaniyan, Mehran, Susan L. Glynn, James L. Wright, ve Amale Hawi. 1998. "Correlating Partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds". *Pharmaceutical Research* 15 (9): 1490-94. <https://doi.org/10.1023/A:1011930411574>.
- Yu, Long, Qin Liu, Wanxin Luo, Junlong Zhao, Heba F. Alzan, ve Lan He. 2022. "The Structural Basis of Babesia orientalis Lactate Dehydrogenase". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 (Ocak):790101. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.790101>.
- Yu, Long, Zhou Shen, Qin Liu, Xueyan Zhan, Xiaoyin Luo, Xiaomeng An, Yali Sun, vd. 2019. "Crystal Structures of *Babesia Microti* Lactate Dehydrogenase BmLDH Reveal a Critical Role for Arg99 in Catalysis". *The FASEB Journal* 33 (12): 13669-82. <https://doi.org/10.1096/fj.201901259R>.
- Yu, Long, Xueyan Zhan, Qin Liu, Yali Sun, Muxiao Li, Yangnan Zhao, Xiaomeng An, Yu Tian, Lan He, ve Junlong Zhao. 2020. "Identifying the Naphthalene-Based Compound 3,5-Dihydroxy 2-Napthoic Acid as a Novel Lead Compound for Designing Lactate Dehydrogenase-Specific Antibabesial Drug". *Frontiers in Pharmacology* 10 (Ocak):1663. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01663>.
- Zintl, Annetta, Grace Mulcahy, Helen E. Skerrett, Stuart M. Taylor, ve Jeremy S. Gray. 2003. "*Babesia Divergens* , a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance". *Clinical Microbiology Reviews* 16 (4): 622-36. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.622-636.2003>.

EKLER

Tablo ek 1.1. Açık BbigLDH için, Schrödinger Qikprop ADME analizi sonucu referans değer aralığında yer alan inhibitör adayları.

^a Catalog ID	^b mol MW	^c donor HB	^d accptH B	^e QPlogP o/w	^f QPlogS	^g QPlog HERG	^h PPCac o	ⁱ QPlogB B	^j QPlogK hsa	^k %iOA	^l PSA	^m glide gscore
Z1609727960	341.409	1.000	6.500	3.290	-4.631	-3.805	64.104	-1.476	0.003	78.548	93.983	-9.250
Z2636996344	323.320	4.000	8.350	0.947	-3.175	-4.621	289.354	-1.100	-0.441	76.543	106.197	-9.243
Z2752838050	349.213	2.250	6.650	2.220	-3.714	-3.782	324.678	-0.993	-0.466	84.895	109.826	-9.105
Z2063989764	356.421	1.000	8.150	2.749	-4.407	-5.073	1792.233	-0.524	-0.047	100.000	74.398	-9.105
Z2912483577	343.379	3.000	6.000	2.944	-4.545	-3.694	34.137	-1.837	-0.023	71.622	114.489	-9.008
Z1730430828	307.244	2.000	6.400	1.899	-3.326	-3.950	828.535	-0.298	-0.342	90.295	69.200	-9.002
Z2060906809	320.363	1.000	6.400	2.871	-3.596	-4.572	2185.922	-0.320	-0.097	100.000	57.040	-8.998
Z2201943136	342.192	2.000	8.400	1.101	-2.988	-3.999	658.174	-0.632	-0.505	83.833	89.775	-8.992
Z2970017912	325.366	1.000	7.700	1.795	-3.558	-4.843	553.929	-0.746	-0.182	86.558	77.452	-8.958
Z2632931604	339.338	3.000	7.100	1.834	-3.839	-4.911	186.755	-1.385	-0.239	78.337	94.821	-8.930
Z1440429650	328.290	1.000	6.700	2.168	-4.373	-4.516	461.871	-0.692	-0.137	87.327	83.356	-8.867
Z2669706492	321.299	2.000	6.950	1.838	-3.267	-3.760	785.272	-0.539	-0.291	89.521	83.690	-8.848
Z2061543834	320.363	3.000	6.250	0.686	-2.122	-1.309	181.332	-0.735	-0.678	71.387	90.059	-8.845
Z1730431859	275.307	2.000	6.400	1.133	-2.957	-4.303	267.412	-1.157	-0.300	77.023	98.554	-8.824
Z2060912694	294.325	2.000	7.200	0.976	-2.292	-3.295	294.844	-0.917	-0.631	76.860	84.835	-8.774
Z1730413881	314.178	2.000	6.400	1.589	-2.993	-4.040	899.240	-0.485	-0.350	89.119	67.771	-8.699
Z357158808	364.400	2.000	6.750	2.208	-2.561	-4.763	207.426	-1.287	-0.322	81.342	97.417	-8.689
Z284354070	372.850	3.000	5.750	2.829	-3.952	-4.393	273.588	-0.851	-0.011	87.130	90.188	-8.677
Z2357820281	330.324	1.000	6.200	2.827	-4.204	-4.534	1990.979	0.106	-0.149	100.000	57.322	-8.672
Z1748045271	329.355	2.000	8.200	1.077	-3.781	-4.795	113.129	-1.665	-0.245	70.008	120.951	-8.663
Z1870409883	325.363	1.000	5.750	3.267	-4.482	-3.780	95.132	-1.121	0.024	81.482	87.657	-8.631
Z1508730567	358.747	2.000	4.700	3.744	-5.527	-5.076	1378.276	0.058	0.295	100.000	60.644	-8.625
Z962973942	327.382	3.000	6.200	1.041	-2.031	-1.576	467.523	-0.568	-0.650	80.827	86.383	-8.613
Z1730412966	272.303	2.000	7.900	0.766	-2.327	-4.503	458.134	-0.890	-0.551	79.059	79.695	-8.608
Z2055849858	337.726	1.000	6.400	2.890	-4.279	-4.351	1900.158	0.080	-0.178	100.000	55.984	-8.600
Z2061573680	332.331	3.000	6.750	1.140	-2.488	-2.848	259.424	-0.704	-0.445	76.829	98.528	-8.576
Z2228540579	333.383	3.000	8.850	1.090	-3.108	-4.280	310.002	-1.152	-0.340	77.921	97.123	-8.568
Z3268556067	325.363	2.000	5.750	2.804	-3.952	-3.415	47.159	-1.408	-0.067	73.317	95.683	-8.564
Z2640614808	332.297	2.000	5.950	2.412	-4.025	-4.659	628.402	-0.513	-0.203	91.151	81.457	-8.521
Z2640608722	331.291	2.000	4.450	2.535	-3.803	-3.233	620.099	-0.558	-0.220	91.767	73.960	-8.517
Z2060914746	325.690	1.000	4.700	3.272	-4.478	-4.212	2041.729	0.238	0.010	100.000	47.450	-8.512
Z2390800433	353.420	3.000	5.750	2.111	-3.567	-4.360	101.835	-1.581	-0.092	75.243	110.000	-8.497
Z2308097472	319.378	2.000	5.200	2.483	-4.799	-3.754	360.302	-1.148	-0.168	87.242	81.351	-8.497
Z2304219726	329.398	2.000	6.950	2.423	-3.987	-4.896	893.029	-0.779	-0.017	93.947	77.121	-8.490
Z2055833084	321.271	1.000	6.400	2.662	-3.809	-4.149	2104.635	0.087	-0.247	100.000	55.888	-8.482
Z3071641271	306.361	3.000	6.900	1.826	-3.232	-4.721	474.711	-1.130	-0.231	85.543	100.267	-8.477
Z1538316765	317.387	3.000	6.700	1.149	-3.020	-2.918	237.784	-0.875	-0.301	76.201	97.788	-8.443
Z1609497731	317.384	1.000	5.750	3.393	-4.476	-2.574	116.450	-1.011	0.057	83.789	86.533	-8.437
Z2755571099	359.326	1.000	8.200	2.309	-3.364	-2.555	120.271	-0.930	-0.546	77.695	101.798	-8.429
Z1531526443	340.378	2.000	6.000	2.016	-3.421	-4.734	74.968	-1.830	-0.173	72.307	109.971	-8.641

Z2781625968	307.346	3.000	7.600	1.270	-3.227	-4.632	309.586	-1.192	-0.293	78.964	97.423	-8.420
Z2061548795	334.270	3.000	6.250	1.375	-3.198	-2.746	234.160	-0.543	-0.482	77.406	92.227	-8.416
Z1444137855	351.399	1.000	8.200	2.731	-4.057	-3.216	105.772	-1.413	-0.349	79.169	102.991	-8.414
Z2055494859	337.726	1.000	6.400	2.854	-4.155	-4.437	2149.946	0.073	-0.180	100.000	55.855	-8.414
Z2064093654	303.332	1.000	6.400	2.586	-3.560	-4.943	2275.539	-0.197	-0.163	100.000	54.443	-8.407
Z2055500609	341.406	1.000	7.150	2.623	-3.358	-4.515	1661.054	-0.494	-0.359	100.000	61.512	-8.405
Z226189042	408.422	3.000	9.500	1.481	-4.091	-4.302	98.591	-1.349	-0.486	71.304	127.107	-8.401
Z1862633894	344.333	2.000	6.250	1.703	-2.810	-2.315	303.198	-0.573	-0.593	81.335	83.195	-8.401
Z1444165891	351.399	3.000	7.700	2.397	-3.992	-3.206	53.708	-1.786	-0.335	71.944	119.788	-8.387
Z1599321666	321.335	2.000	6.000	2.920	-4.466	-4.456	53.484	-1.419	-0.063	74.973	102.318	-8.381
Z2959426649	332.279	3.000	6.250	1.196	-2.655	-2.975	136.694	-0.868	-0.507	72.177	104.857	-8.374
Z2061571744	342.342	3.000	6.250	1.378	-3.308	-2.709	301.373	-0.848	-0.363	79.388	94.549	-8.361
Z1591490121	329.398	1.000	5.450	3.153	-4.062	-4.728	443.759	-1.035	0.277	92.787	87.483	-8.418

Tablo ek 1.2. Açık BbigLDH MDS sonrası yapı için, Schrödinger Qikprop ADME analizi sonucu referans değer aralığında yer alan inhibitör adayları.

^a Catalog ID	^b mol MW	^c donorHB	^d accptHB	^e QPlogPo/w	^f QPlogS	^g QPlogHERG	^h QPPCaco	ⁱ QPlogBB	^j QPlogKhsa	^k %İOA	^l PSA	^m glide gscore
F711-0410	467.380	3.000	8.200	2.993	-5.112	-4.449	1534.967	-0.583	-0.300	100.000	91.457	-7.990
Z1254387226	342.400	2.000	7.500	1.823	-4.733	-4.136	464.780	-1.078	-0.241	85.355	105.584	-7.732
Z1915512646	334.417	0.000	9.200	0.238	-0.578	-1.700	429.523	-0.590	-1.429	75.467	76.466	-7.456
Z1222429762	273.291	1.000	6.500	1.749	-2.718	-2.526	126.215	-0.728	-0.512	74.793	85.014	-7.270
Z929316440	349.388	2.000	5.500	3.842	-5.633	-4.595	77.027	-1.349	0.281	83.207	100.342	-7.175
Z2053905632	319.365	1.000	7.500	1.362	-3.852	-3.982	188.686	-1.072	-0.429	75.654	86.282	-7.151
Z2390808760	331.294	2.000	6.250	1.102	-1.867	-2.102	177.791	-0.674	-0.535	73.668	101.449	-7.123
Z2456622503	274.294	1.000	6.200	1.736	-2.687	-4.191	947.569	-0.403	-0.335	90.388	61.231	-7.103
Z994840320	284.317	1.000	6.000	2.086	-3.885	-4.860	720.700	-0.767	-0.072	90.310	82.875	-7.090
Z1482272967	330.358	3.000	5.500	2.500	-4.171	-4.774	289.840	-1.100	0.108	85.654	98.082	-7.022
Z2053906513	312.346	1.000	6.000	2.166	-3.112	-3.828	644.221	-0.368	-0.235	89.906	65.819	-6.974

Tablo ek 1.3. Kapalı BbigLDH için, Schrödinger Qikprop ADME analizi sonucu referans değer aralığında yer alan inhibitör adayları.

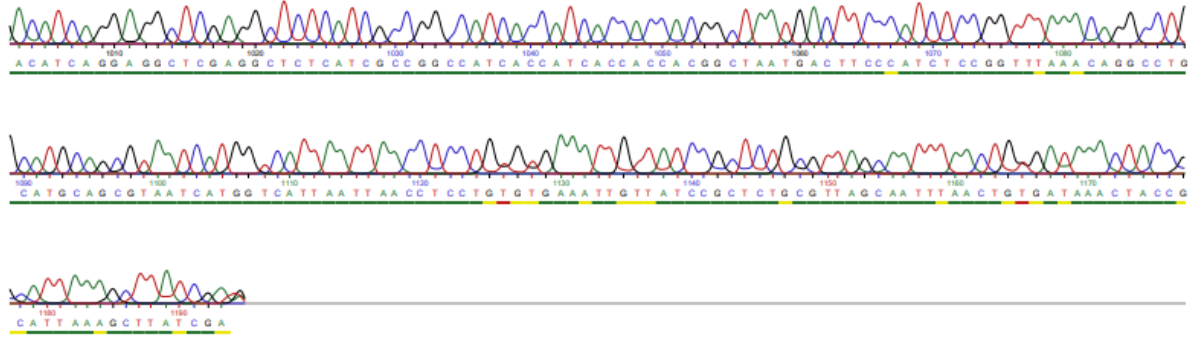
^a Catalog ID	^b mol MW	^c donor HB	^d accptH B	^e QPlogP o/w	^f QPlogS	^g QPlog HERG	^h QPPC aco	ⁱ QPlogB B	^j QPlog Khsa	^k %İOA	^l PSA	^m glide gscore
Z2400537901	343.425	3.000	7.200	1.288	-2.923	-2.842	211.617	-1.158	-0.601	76.112	95.912	-10.464
D2033086	320.344	2.000	6.250	2.365	-3.375	-2.473	75.337	-1.248	-0.266	74.391	116.841	-9.256
Z973658262	378.181	3.000	7.500	1.339	-3.664	-5.023	232.525	-1.102	-0.332	77.138	119.404	-9.176
Z2295945520	332.355	2.000	7.450	2.353	-3.757	-3.127	103.936	-1.131	-0.319	76.817	103.621	-9.165
Z1268162970	312.371	3.000	6.500	1.614	-3.325	-4.607	260.213	-1.275	-0.404	79.628	103.210	-9.018
Z2353577593	328.367	3.000	6.000	2.854	-4.345	-3.983	75.669	-1.327	-0.112	77.284	107.277	-9.003
Z509196536	343.308	3.000	4.000	2.783	-4.414	-4.177	197.169	-1.073	-0.057	84.315	98.490	-8.997
Z1307119241	315.414	4.000	3.700	2.963	-4.184	-4.174	606.124	-1.061	-0.008	94.095	81.924	-8.929
Z1253206711	320.406	2.000	6.700	1.893	-3.712	-3.744	504.701	-0.990	-0.410	86.406	90.713	-8.925
Z147641718	291.244	2.000	5.000	2.050	-3.656	-2.496	56.383	-0.753	-0.414	70.292	89.503	-8.879
Z1424270493	360.455	2.000	6.000	2.433	-4.014	-2.837	168.922	-1.152	-0.070	81.060	99.977	-8.869
Z1445493786	384.434	2.000	8.500	2.888	-5.243	-3.857	49.546	-1.650	-0.048	74.193	126.049	-8.846
Z2504203916	302.332	1.250	6.750	2.603	-4.515	-4.269	40.336	-1.817	-0.226	70.925	109.347	-8.835
Z1956090322	316.356	2.000	6.700	2.493	-3.958	-3.461	109.662	-1.062	-0.247	78.055	93.891	-8.830

Z19650139	278.328	2.000	4.000	1.881	-3.335	-3.854	293.693	-0.848	-0.205	82.130	104.245	-8.701
*D7117850637	230.146	2.000	3.500	1.840	-2.852	-2.153	101.329	-0.429	-0.504	73.616	76.737	-8.693
Z1616793138	298.344	2.000	5.500	2.044	-3.424	-4.171	416.076	-0.947	-0.233	85.792	92.236	-8.648
Z112058834	334.251	1.000	4.250	2.446	-4.412	-3.884	173.420	-1.150	-0.084	81.343	126.943	-8.633
Z928443586	325.161	3.000	4.500	2.385	-3.832	-3.272	45.216	-1.327	-0.303	70.539	100.793	-8.624
Z1445492642	425.458	2.000	9.500	2.752	-5.297	-4.664	33.841	-1.703	-0.158	70.434	133.016	-8.612
Z1609738390	319.357	1.000	6.500	1.928	-2.474	-1.083	93.177	-0.898	-0.621	73.480	94.800	-8.603
Z370733756	285.259	2.000	7.000	0.891	-2.683	-4.902	214.995	-1.144	-0.406	73.906	116.291	-8.592
Z1758303981	316.359	2.000	8.200	0.990	-3.105	-3.773	415.044	-0.936	-0.593	79.602	99.822	-8.568
Z1095747166	349.379	3.000	6.500	2.046	-4.665	-5.008	187.726	-1.311	0.005	79.617	121.136	-8.543
Z929728294	293.319	1.000	5.500	2.326	-3.219	-2.360	65.829	-1.214	-0.263	73.112	103.007	-8.505
Z3681318261	332.399	1.250	6.750	2.256	-3.027	-1.658	51.519	-1.256	-0.470	70.797	107.364	-8.491
Z1436595596	303.289	2.000	5.250	3.208	-4.319	-3.283	105.740	-0.957	-0.157	81.961	92.323	-8.478
Z1609524968	276.267	2.000	5.000	2.225	-3.751	-2.960	72.574	-0.934	-0.255	73.278	91.633	-8.470
Z928031892	325.366	2.000	5.250	2.494	-3.902	-4.145	824.193	-0.805	-0.153	93.742	84.753	-8.446
Z1443624433	306.748	2.000	5.000	2.832	-4.172	-2.739	127.960	-0.610	-0.107	81.238	86.039	-8.427
Z1870103899	292.334	1.000	8.000	1.519	-2.527	-2.253	98.983	-0.965	-0.654	71.554	97.839	-8.406
Z1445492057	382.415	2.000	8.250	3.087	-5.225	-4.492	64.547	-1.531	-0.058	77.414	115.667	-8.403
Z1279173196	357.452	1.000	8.500	1.555	-2.764	-2.604	435.123	-0.727	-0.649	83.275	89.434	-8.390
Z604033838	326.397	3.000	5.500	2.751	-4.707	-4.775	844.907	-0.878	-0.064	95.439	92.048	-8.382
Z1947425568	293.706	2.000	5.000	2.715	-4.148	-3.471	77.932	-1.056	-0.226	76.703	94.140	-8.374
Z1160802236	297.371	2.000	5.500	2.032	-3.425	-1.473	59.380	-1.093	-0.530	70.588	100.206	-8.357

Tablo ek 1.4. Kapalı BbigLDH MDS sonrası yapı için, Schrödinger Qikprop ADME analizi sonucu referans değer aralığında yer alan inhibitör adayları.

*Catalog ID	^b mol MW	^c donor HB	^d accptH B	^e QPlogP o/w	^f QPlogS	^g QPlog HERG	^h QPPC aco	ⁱ QPlogB B	^j QPlog Kh _{sa}	^k %İOA	^l PSA	^m glide gscore
Z278525320	378.350	2.000	5.750	3.070	-4.951	-4.577	409.892	-0.753	0.000	91.685	86.252	-9.497
Z1632697137	356.421	3.000	6.450	2.032	-3.231	-4.300	242.319	-1.558	-0.364	81.522	101.696	-8.972
Z2382289374	358.442	2.000	8.000	1.063	-2.730	-1.702	121.420	-1.147	-0.503	70.477	113.121	-8.953
Z381690232	329.333	3.000	7.500	1.187	-3.443	-4.590	182.378	-1.294	-0.551	74.360	110.562	-8.886
Z385216018	423.529	4.000	6.500	2.671	-3.148	-3.645	195.908	-1.360	-0.036	83.608	109.840	-8.835
Z1382048604	349.432	3.000	4.500	3.167	-4.524	-4.711	361.515	-1.124	0.175	91.275	89.658	-8.722
Z2229179035	311.377	4.000	8.350	0.749	-3.234	-4.207	263.172	-1.299	-0.393	74.648	105.855	-8.715
*K784-2016	439.918	2.000	7.500	2.497	-3.688	-3.739	114.737	-1.157	-0.024	78.432	110.773	-8.632
Z1246322905	372.426	1.000	6.000	3.266	-3.892	-4.103	630.873	-0.690	0.128	96.184	80.697	-8.608
Z733555858	371.438	3.000	5.000	2.533	-2.743	-2.759	359.115	-0.841	-0.017	87.511	86.316	-8.584
Z1640818270	382.434	2.000	6.700	2.305	-2.106	-4.471	153.139	-0.271	-0.134	79.550	70.927	-8.479
Z2608765848	407.354	0.000	9.000	1.033	-2.458	-3.788	114.324	-1.051	-0.892	69.829	120.851	-8.430
Z2294349608	383.378	2.000	5.750	2.571	-4.354	-3.616	494.955	-0.755	-0.011	90.228	117.928	-8.394
Z1840256745	350.414	3.000	8.400	1.439	-2.385	-2.520	1455.918	-0.504	-0.574	91.985	78.182	-8.383
Z225044536	398.433	2.000	6.500	3.188	-5.095	-4.258	582.534	-0.752	0.136	95.105	89.306	-8.369

Z1850128238	405.496	2.000	7.400	3.403	-3.987	-4.346	1099.69 8	-0.713	0.024	100.000	79.659	-8.363
Z1478445725	351.450	2.000	5.500	2.709	-4.080	-3.559	489.216	-0.772	0.103	90.944	89.196	-8.343
Z30900215	360.415	2.000	8.000	1.458	-2.897	-4.104	136.597	-1.138	-0.319	73.702	97.076	-8.337
Z33452522	396.460	3.000	6.750	2.876	-3.903	-4.498	514.432	-0.985	-0.113	92.310	100.493	-8.335
Z1499402569	332.399	1.250	7.650	0.936	-1.407	-1.597	299.919	-0.797	-0.819	76.757	90.445	-8.326
*G857-0450	400.495	1.000	9.200	1.764	-2.247	-2.878	765.309	-0.623	-0.619	88.890	91.478	-8.302
Z2433250026	384.373	3.000	3.700	3.531	-3.608	-2.597	1051.78 7	-0.339	0.017	100.000	64.357	-8.277
Z813075148	374.826	1.000	7.250	1.931	-2.605	-2.324	466.886	-0.403	-0.549	86.028	85.892	-8.258
Z450449194	390.364	1.000	5.750	3.398	-4.009	-4.007	594.744	-0.413	0.045	96.494	72.903	-8.238
Z826473056	395.435	2.000	6.500	3.212	-5.394	-4.270	716.740	-0.814	0.158	96.859	88.365	-8.236
Z4619797811	334.377	1.000	6.000	2.590	-3.395	-4.770	401.045	-0.697	-0.068	88.705	79.493	-8.209
Z2953881032	349.391	1.000	7.500	2.088	-4.525	-4.974	317.331	-0.995	0.073	83.941	97.920	-8.202
Z2373310039	396.491	1.000	9.000	1.604	-2.868	-2.504	387.899	-0.685	-0.587	82.669	89.222	-8.173
Z2634130261	325.404	4.000	8.350	1.095	-3.458	-4.247	262.616	-1.310	-0.302	76.658	106.507	-8.172
Z1875223490	338.408	3.000	5.200	2.602	-3.926	-4.467	321.084	-1.231	-0.063	87.045	84.198	-8.164
Z288331726	349.432	2.000	5.250	3.176	-4.495	-4.886	434.462	-0.845	0.202	92.758	76.669	-8.153
Z2052340459	336.393	1.000	8.500	1.414	-2.740	-3.854	396.569	-0.662	-0.486	81.732	87.563	-8.151
Z595072666	339.393	3.000	6.200	1.709	-3.630	-4.209	142.583	-1.536	-0.253	75.508	99.317	-8.150



B

>BbigLDH_T7 nükleotid sekansı

...GGGAAATCCCCTCTAGAATAATTTGTTTAAATCCAGAAGGAGATATAACTATGGCGCCAGTAGTCAGGA
GGAACAAGATCAGCCTTATCGGTTTCGGGCAACATCGGAGGTGTGATGGCCTACCTCGCCCAGATTGAGGAGCTCGGAGAT
GTTGTGCTTTTCGACATTGCGCCAACCCCTTGGTGCCGCAAGGCCCTTGACATCATGCACGCCAACACCGTGTACGACAC
CTCCCAGAAGGTATCGCAACCAAGTACGAGGACATTGCCGACAGTGATGTTTGCATCATTACCGCCGGTTTGCCCA
GGATGCCCCGCAAGAAGGACGACGAGTGGACCCGTGACGACCTCGTAGGACCCAACAGCAAGATCATGACCACCATCGGT
GAGAACATCAAGAAGTACGCCCCAACCGCTTCGTCAATTTGCATACCAACCCGCTCGACGTCATGGTCAAGATGCTCCT
CAAGTCAACCGGATTCCCCAAGAACAAGGTTGTGCGTATGGGTGGCCTCTTGGACTCCTCCCGCATGCGCCACTACATCG
CCGACAAGTTGAACGTCCACCCCAAGTTCGTGCACGGCTGGTGCAATTGGTGGCCACGGTGATCCATGATCCCGCTGGTC
AACCACGTCAAGGTCAACGGACTCCCCATCCAGTACTTCATCGAGAACGGACAAATACCCAGGCTGACCTCGACGCCAT
TGAGAAGCGCACCATCGGCTCTGGTATGGAGCTCGTACAGTTGTACGGCACCGGATCCGCCTACTTCGCCCGGCCACCG
CCGCCATTGAGATGGCCGCGCATACCTCCAGGACAAGAAGTCCATCATCGTCTGCTCCTGCTACCTCGAGGGCGAGTAC
GGCCACAACGACGTCTACCTGGGCACCCCTGCCATCCTTGGTGCCAACGGTGTGCGAGAAGATCATCACCCCTCAAGCTCTC
GCCCGAGGAGCAGGCCAAGATCGACGCTTCCGTCAAGGACATCAGGAGGCTCGAGGCTCTCATCGCCGGCCATCACCATC
ACCACCACGGCTAATGACTTCCCATCTCCGGTTTAAACAGGCCTGCATGACGCGTAATCATGGTCATTAATTAACCTCCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCTGCGTTAGCAATTAAGTGTGATAAACTACCGCATTAAGCTTATCGA

C

>BbigLDH_T7 amino asit sekansı

MAPVVRNKKISLIGSGNIGGVMAVLAQIQELGDVVLFDIAPTLGAAKALDIMHANTVYDTSQKVIGTTKYEDIADSDVCHITAGLAR
MPGKKDDEWTRDDLVPNSKIMTTIGENIKKYAPNAFVICITNPLDVMVKMLLKSTGFPPKNKVVGMGGLDSSRMRHYIADKLN
HPKFVHGWICGGHGDMSIPLNVHVKVNGLPYFIENGQITQADLDAIEKRTIGSGMELVQLYGTGSAYFAPATAAIEMAAAYLQDK
KSIIVCSCYLEGEYGHNDVYLGTPAILGANGVEKIITLKLSPPEQAKIDASVKDIRRLEALIAHHHHHHHG

D

Score:660 bits(1704), Expect:0.0,
Method:Compositional matrix adjust.,
Identities:322/322(100%), Positives:322/322(100%), Gaps:0/322(0%)

Query	1	MAPVVRNKKISLIGSGNIGGVMAVLAQIQELGDVVLFDIAPTLGAAKALDIMHANTVYDT	60
Sbjct	1	MAPVVRNKKISLIGSGNIGGVMAVLAQIQELGDVVLFDIAPTLGAAKALDIMHANTVYDT	60
Query	61	SQKVIGTTKYEDIADSDVCIITAGLARMPGKKDDEWTRDDLVPNSKIMTTIGENIKKYA	120
Sbjct	61	SQKVIGTTKYEDIADSDVCIITAGLARMPGKKDDEWTRDDLVPNSKIMTTIGENIKKYA	120
Query	121	PNAFVICITNPLDVMVKMLLKSTGFPPKNKVVGMGGLDSSRMRHYIADKLNHPKFVHGW	180
Sbjct	121	PNAFVICITNPLDVMVKMLLKSTGFPPKNKVVGMGGLDSSRMRHYIADKLNHPKFVHGW	180
Query	181	CIGGHGDSMIPLNVHVKVNGLPYFIENGQITQADLDAIEKRTIGSGMELVQLYGTGSA	240
Sbjct	181	CIGGHGDSMIPLNVHVKVNGLPYFIENGQITQADLDAIEKRTIGSGMELVQLYGTGSA	240
Query	241	YFAPATAAIEMAAAYLQDKKSIIVCSCYLEGEYGHNDVYLGTPAILGANGVEKIITLKL	300
Sbjct	241	YFAPATAAIEMAAAYLQDKKSIIVCSCYLEGEYGHNDVYLGTPAILGANGVEKIITLKL	300
Query	301	PEEQAKIDASVKDIRRLEALIA	322
Sbjct	301	PEEQAKIDASVKDIRRLEALIA	322

Şekil ek 1.1. (A) Forward (T7 primeri) Sekanslama sonucu, (B) sekans dizisi ve (C) amino asit dizisine dönüşümü (translate). “<https://web.expasy.org/translate/>” kullanılarak dönüşüm

yapılmıştır. (D) Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile BbigLDH protein dizisi, sekans sonuçlarına ait amino asit dizisiyle alignment yapılmıştır.

A

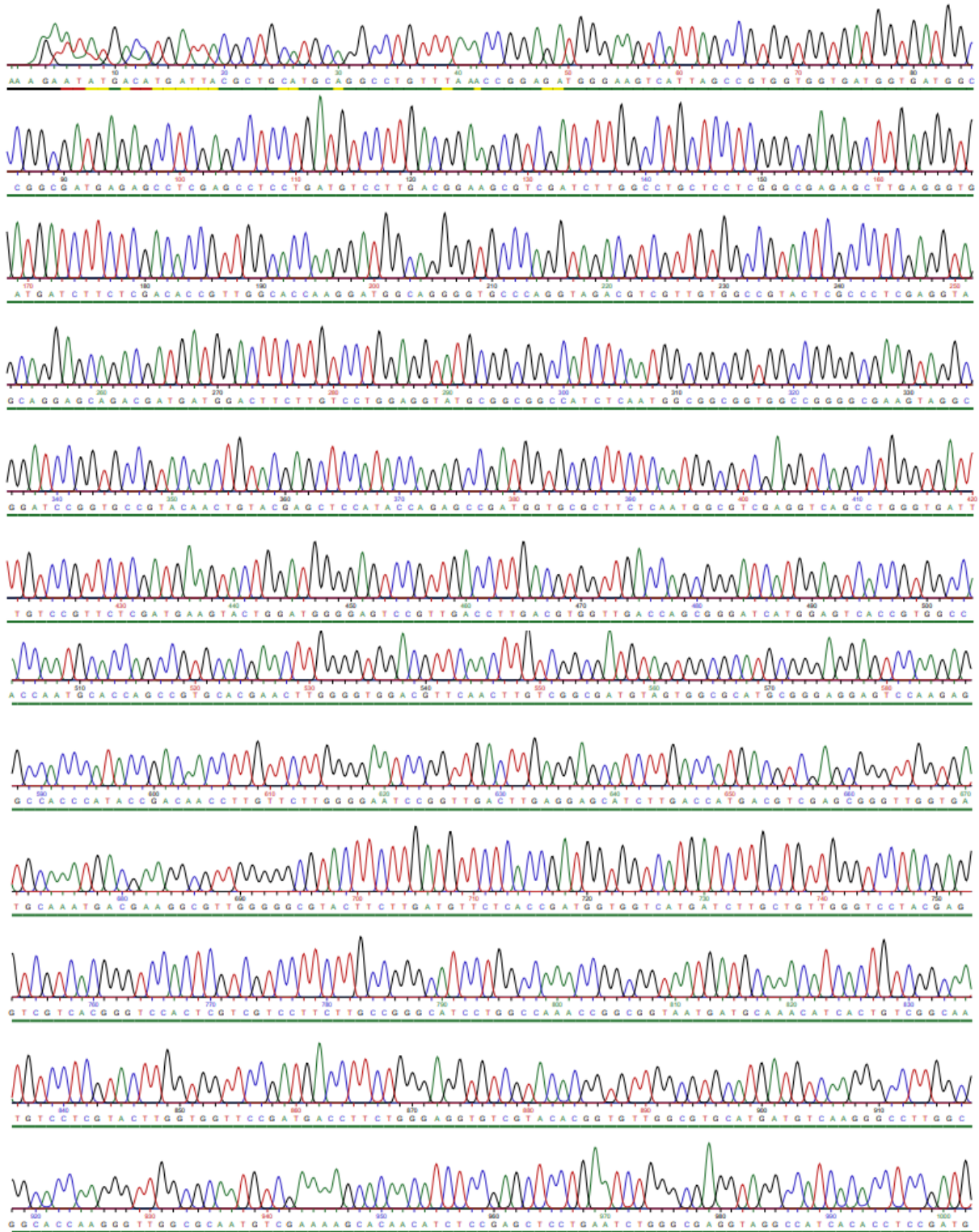
Sequence: SEQ10014844_A18_0

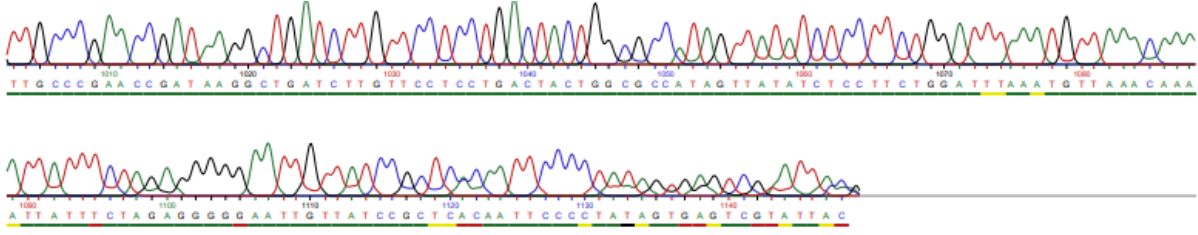
Sample: 13718
Bases: 1149
Average spacing: 12.0
Average quality >= 10: 14, 20, 27, 30, 1102

Quality: 0-9
10-19
20-29
30-39



Page: 1/3
22.11.2022





B

>BbigLDH_M13rev-49 nükleotid dizisi:

AATATGACATGATTACGCTGCATGCAGGCCTGTTTAAACCGGAGATGGGAAGTCATTAGCCGTGGTGGTGATGGTGATGG
CCGGCGATGAGAGCCTCGAGCCTCCTGATGTCCTTGACGGAAGCGTCGATCTTGGCCTGCTCCTCGGGCGAGAGCTTGAG
GGTGATGATCTTCTCGACACCGTTGGCACCAAGCGTGGCAGGGGTGCCAGGTAGACGTCGTTGTGGCCGTACTCGCCCT
CGAGGTAGCAGGAGCAGACGATGATGGACTTCTTGTCTGGAGGTATGCGGCGGCCATCTCAATGGCGCGGTGGCCGGG
GCGAAGTAGGCGGATCCGGTGCCGTACAACGTACGAGCTCCATACCAGAGCCGATGGTGCCTTCTCAATGGCGTCGAG
GTCAGCCTGGGTGATTGTCCGTTCTCGATGAAGTACTGGATGGGGAGTCCGTTGACCTTGACGTGGTTGACCAGCGGGA
TCATGGAGTACCGTGACCAACATGCACCAAGCGTGCACGAACCTGGGGTGGACGTTCACTTGTGGAGGTGATGATGAG
CGCATGCGGGAGGAGTCCAAGAGGCCACCCATACCGACAACCTTGTCTTGGGGAATCCGTTGACTTGAGGAGCATCTT
GACCATGACGTCGAGCGGGTGGTGATGCAAATGACGAAGCGTGGGGGCGTACTTCTTGATGTTCTACCGATGGTGG
TCATGATCTTGTCTGGTCTACGAGGTCGTCACGGGTCCACTCGTCGTCCTTCTTGGCGGCATCTTGCCAAAACCG
GCGGTAATGATGCAACATCACTGTCGGCAATGTCCTGACTTGGTGGTTCGATGACCTTCTGGGAGGTGTCGTACAC
GGTGTGGCGTGCATGATGTCAAGGGCCTTGCGCGCACCAAGGGTGGCGCAATGTCGAAAAGCACAACATCTCCGAGCT
CCTGAATCTGGGCGAGGTAGGCCATCACCTCCGATGTTGCCCGAACCAGATAAGGCTGATCTTGTCTCTCTGACTACT
GGCGCCATAGTTATATCTCTTCTGGATTAAATGTTAAACAAAATTATTCTAGAGGGGGAATTGTTATCCGCTCACAA
TTCCCCATAGTGAGTCGTATTAC

C

>BbigLDH_M13rev-49 amino asit dizisi:

MAPVVRNKISLIGSGNIGGV MAYLAQIQELGDVVLFDIAPTLGAAKALDIMHANTVYDTSQKVIGTTKYEDIADSDVCIITAGLAR
MPGKKDDEWTRDDL VGPN SKIMTTIGENIKKYAPNAFVICITNPLDVMVKMLLKSTGF PKNKVVMGGLDSSRMRHYIADKLN
VHPKFVHGWCI GGHD SMIP LVNHVKVNGLP IQYFIENGQITQADLDAIEKRTIGSGMELVQLYGTGSAYFAPATAAIEMAAAYLQDK
KSIIVCSCYLEGEYGHNDVYLGTPAILGANGVEKIITLKLSP EEQAKIDASVKDIRRLEALIAHHHHHHH

D

Score:660 bits(1704), Expect:0.0,
Method:Compositional matrix adjust.,
Identities:322/322(100%), Positives:322/322(100%), Gaps:0/322(0%)

Query	1	MAPVVRNKISLIGSGNIGGV MAYLAQIQELGDVVLFDIAPTLGAAKALDIMHANTVYDT	60
Sbjct	1	MAPVVRNKISLIGSGNIGGV MAYLAQIQELGDVVLFDIAPTLGAAKALDIMHANTVYDT	60
Query	61	SQKVIGTTKYEDIADSDVCIITAGLARMPGKKDDEWTRDDL VGPN SKIMTTIGENIKKYA	120
Sbjct	61	SQKVIGTTKYEDIADSDVCIITAGLARMPGKKDDEWTRDDL VGPN SKIMTTIGENIKKYA	120
Query	121	PNAFVICITNPLDVMVKMLLKSTGF PKNKVVMGGLDSSRMRHYIADKLN VHPKFVHGW	180
Sbjct	121	PNAFVICITNPLDVMVKMLLKSTGF PKNKVVMGGLDSSRMRHYIADKLN VHPKFVHGW	180
Query	181	CIGGHGDSMIPLVNHVKVNGLP IQYFIENGQITQADLDAIEKRTIGSGMELVQLYGTGSA	240
Sbjct	181	CIGGHGDSMIPLVNHVKVNGLP IQYFIENGQITQADLDAIEKRTIGSGMELVQLYGTGSA	240
Query	241	YFAPATAAIEMAAAYLQDKKSIIVCSCYLEGEYGHNDVYLGTPAILGANGVEKIITLKL	300
Sbjct	241	YFAPATAAIEMAAAYLQDKKSIIVCSCYLEGEYGHNDVYLGTPAILGANGVEKIITLKL	300
Query	301	PEEQAKIDASVKDIRRLEALIA	322
Sbjct	301	PEEQAKIDASVKDIRRLEALIA	322

Şekil ek 1.2. (A) Reverse (M13rev-49 primeri) Sekanslama sonucu, (B) sekans dizisi ve (C) amino asit dizisine dönüşümü (translate). “<https://web.expasy.org/translate/>” kullanılarak dönüşüm yapılmıştır. (D) Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile BbigLDH protein dizisi, sekans sonuçlarına ait amino asit dizisiyle alignment yapılmıştır.