



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FLAVİN REDOKS TEPKİMESİNE SÜBSTİTÜENT ETKİSİNİN MODELLENMESİ

ARZU TOPAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2017



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FLAVİN REDOKS TEPKİMESİNE SÜBSTİTÜENT ETKİSİNİN MODELLENMESİ

ARZU TOPAL
(520813024)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Safiye ERDEM

İSTANBUL, 2017



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



MODELLING THE EFFECT OF SUBSTITUENTS ON THE FLAVIN REDOX REACTION

ARZU TOPAL
(520813024)

MASTER THESIS
Department of Chemistry

Thesis Supervisor
Prof.Dr.Safiye ERDEM

ISTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

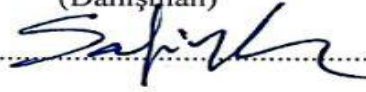
Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Arzu TOPAL'ın "Flavin Redoks Tepkimesine Sübstituent Etkisinin Modellenmesi" başlıklı tez çalışması, 11 Nisan 2017 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Safiye ERDEM

Marmara Üniversitesi

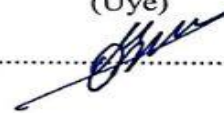
(Danışman)



Doç.Dr. Özkan DANIŞ

Marmara Üniversitesi

(Üye)



Yrd.Doç.Dr. Yrd. Doç. Dr. Vildan Enisoğlu ATALAY

Üsküdar Üniversitesi

(Üye)



ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.04.2017.... tarih ve 2017/10-02... sayılı kararı ile Arzu TOPAL'ın Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr.Uğur YAHSİ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek maddi ve manevi her konuda yanımda olan sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Safiye ERDEM'e,

Görüş ve düşünceleri ile bana yol gösteren zor zamanlarımda yanımda olarak sorunları aşmamda yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Kübra ÇAKIR ve Habibe DÜLGER başta olmak üzere diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yaşadığım her zorlukta varlığıyla beni cesaretlendiren başa çıkamadığım her durumda yanımda olan değerli eşim Yaşar Kemal TOPAL'a,

Tüm hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteğiyle yanımda duran ve umutsuzluğa kapılmadan karşıma çıkan engelleri aşmam için bana güç veren sevgili aileme,

Bu tez çalışmasında kullanılan bilgisayarların alınmasına verdikleri destekler için Marmara Üniversitesi BAPKO birimine çok teşekkür ederim.

Nisan, 2017

Arzu TOPAL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
YENİLİK BEYANI	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	3
1.2.1. Enzimler	3
1.2.2. Flavoproteinler	6
2. MATERYAL VE YÖNTEM	19
2.1. Kullanılan Yöntem	19
2.1.1. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT, Density Functional Theory).....	19
2.2. Kullanılan Materyaller.....	21
2.2.1. Kullanılan Model Yapıların Elde Edilmesi	21
2.2.2. FAD İndirgenme Eğilimlerinin Hesaplanması	22
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
3.1. Optimizasyon Sonucunda Oluşan Yapılar ve Büküklük Dereceleri	27
3.1.1. Model I ile Yapılan Optimizasyon	27
3.1.2. Model II ile Yapılan Optimizasyon	27
3.1.3. Model III ile Yapılan Optimizasyon.....	28
3.1.4. Model IV ile Yapılan Optimizasyon	28
3.1.5. Model V ile Yapılan Optimizasyon.....	29
3.1.6. Model VI ile Yapılan Optimizasyon	30
3.1.7. Model VII ile Yapılan Optimizasyon	30
3.1.8. Model VIII ile Yapılan Optimizasyon.....	31
3.1.9. Model IX ile Yapılan Optimizasyon	32
3.2. ΔH ve ΔG İndirgenme Enerjileri	34
3.3. FAD İçeren Enzimlerle Model Yapıların Karşılaştırılması.....	35
3.3.1. FAD'te 8a-Cys'den Kovalent Bağlanma Motifi İçeren Enzimlerle Model I _{ox} ve I _{red} Karşılaştırılması	36
3.3.2. FAD'te Kovalent Bağlanma Motifi İçermeyen Enzimlerle Model IV _{ox} ve IV _{red} Karşılaştırılması	43
4.GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	77

ÖZET

FLAVİN REDOKS TEPKİMESİNE SÜBSTİTÜENT ETKİSİNİN MODELLENMESİ

Flavin, birçok flavoenzimde bulunmakta ve biyolojik redoks proseslerinde kofaktör olarak davranmaktadır. Son yıllarda bazı flavoenzimlerin kimyasal mekanizma detayları hala tartışıldığı için, monoamin oksidaz (MAO), D-amino asit oksidaz (DAAO) ve lizin spesifik demetilaz (LSD1) gibi birçok flavoenzimin mekanizmaları önemli derecede ilgi görmektedir. Flavoenzimler flavin izoalloksazin halkası ile birçok kovalent olmayan etkileşim yaparlar. Flavoproteinlerin sadece %10'u flavin halkasına kovalent olarak bağlı olmasına rağmen kovalent flavinin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bu yüzden flavinin elektronik yapısına yönelik araştırmalar da ilgi çekmektedir. Bu çalışmada, flavoenzimlerdeki flavinin redoks kimyası üzerine yeni bilgiler sağlamak için flavin indirgenme eğilimine sübstitüent etkisi ve izoalloksazin halkasının konformasyonu incelendi. Araştırmada kullanılan sübstitüentler, monoamin oksidazdaki C8- α kovalent bağı ve flavin adenin dinükleotit (FAD)'de bulunan N10'a kovalent bağlı triol grubunu temsil edecek şekilde seçilmiştir.

İzoalloksazin halkasının C8 (X= -H, CH₃, -Cys-Tyr) ve N10 (Y= -H, -CH₃, -CH₂(CHOH)₃CH₂OCH₃) pozisyonlarına farklı sübstitüentler eklenerek, yükseltgenmiş (Fl_{ox}) ve indirgenmiş (Fl_{red}) durumları M06-2X/6-3+1G(d,p) metoduyla optimize edilmiştir. Sübstitüe flavinin indirgenme eğilimi hidrojenleme reaksiyonu Gibbs serbest enerjisi baz alınarak hesaplanmıştır. İzoalloksazin halkasının yükseltgenmiş ve indirgenmiş durumlarının optimize konformasyonları birçok flavoprotein deneysel kristal yapısı ile karşılaştırılmıştır.

Tez çalışması sonucunda N10'a bağlı büyük sübstitüentlerin izoalloksazin halkasının indirgeme eğilimini azalttığı tespit edilmiştir. İzoalloksazin halkasının N10 pozisyonuna H (Y= -H), C8 alfa pozisyonuna kovalent Cys-Tyr proteini bağlı iken en yüksek indirgenme eğilimine sahip olduğu görülmüştür. Halka konformasyonunun sübstitüentlerin doğal yapısından da etkilendiği ve molekül için hidrojen bağları ve stereoelektronik etkilerin izoalloksazin halkasını eğik konformasyon oluşturmaya yönlendirdiği tespit edilmiştir.

ABSTRACT

MODELLING THE EFFECT OF SUBSTITUENTS ON THE FLAVIN REDOX REACTION

Flavin is found in many flavoenzymes and acts as a cofactor in biological redox processes. The mechanism of flavin reduction in several flavoenzymes such as monoamine oxidases (MAO), N-methyltryptophan oxidase (MTO), D-aminoacid oxidase (DAAO) and lysine-specific demethylase (LSD1) attract great attention in recent years because the details of the chemical mechanism of some flavoenzymes are still debated. Flavoenzymes have many non-covalent interactions with the isoalloxazine ring of flavin. In only 10% of all flavoproteins, flavin ring is covalently bound to the protein and the role of covalent flavin is not completely understood. Therefore, flavin electronic structure attracts interest. In this study, we explore the effect of substituents on the reduction tendency and conformations of the flavin isoalloxazine ring in order to provide new insights into flavin redox chemistry of flavoenzymes. The substituents were chosen so as to represent the flavin C8- α covalent linkage in monoamine oxidase and the N10-covalent bond to triol moiety in FAD.

The oxidized (Fl_{ox}) and reduced states (Fl_{red}) of the isoalloxazine rings having different substituents on C8 ($X = -H, CH_3, -Cys-Tyr$) and N10 ($Y = -H, -CH_3, -CH_2(CHOH)_3CH_2OCH_3$) were optimized with M06-2X/6-3+1G(d,p) method. Reduction tendencies of substituted flavins were calculated based on the Gibbs free energy of hydrogenation reactions. Optimized conformations of the oxidized and reduced states of the isoalloxazine rings were compared with the experimental crystal structures of various flavoproteins.

The results revealed that the large substituents on N10 decrease the reduction tendency of isoalloxazine ring. Isoalloxazine ring ($Y = -H$ on N10) having a C8- α covalent bond to Cys-Tyr aminoacid linkage exhibits the greatest reduction tendency. Ring conformation is also influenced by the nature of the substituent. Intramolecular H-bonds and stereoelectronic effects lead to bent conformation

YENİLİK BEYANI

FAD halkasının düzlemsel yükseltgenmiş formundan, indirgenmiş kelebek ya da bükük formuna dönüşerek redoks proseslerinde şekil değiştirdiği düşünülmektedir. Birçok 10-alkilizoalloksazin yükseltgenmiş formunda kristolografik modele göre düzlemsel olarak gözlenmekle birlikte, çözelti NMR çalışmalarında apolar çözücülerde indirgenmiş flavin biraz bükük ve polar çözücülerde muhtemelen düzlemsel olduğu değerlendirilmektedir. Ayrıca enzimlerin FAD halkası aracılığı ile katalizledikleri tepkimelerin flavin halkasına bağlı olan süstitüentlerin etkisiyle değiştiği düşünülmektedir. Süstitüentlerin FAD halkasının şeklinde yaptığı değişiklikler, yapısal ve enerjetik farklılaşmalar flavoenzim mekanizmalarının anlaşılması ve akılcı ilaç tasarımı açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu kapsamda bu tez çalışması 4 önemli yenilik içermektedir:

- 1) Literatürde flavinin yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları üzerinde çalışmalar bulunmaktadır ancak tez çalışmamızda birçok süstitüe model oluşturulmuş ve indirgenmiş, yükseltgenmiş formlarındaki FAD konformasyonları incelenmiştir. FAD halkasının açısının süstitüent etkisiyle net bir şekilde değiştiği, şaşırtıcı bir şekilde de indirgenmiş bazı modellerde düzlemsel olduğu tespit edilmiştir.
- 2) Model yapıların ΔH ve ΔG indirgenme enerjileri hesaplanmış ve süstitüentlerin ve kovalent flavinasyonun indirgenme eğilimleri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.
- 3) Enzimlerin kristal yapılarında yükseltgenmiş formda mı indirgenmiş formda mı olduğu bilinmemektedir. Ancak bu tez çalışmasında oluşturulan modellerle çeşitli enzimlerdeki FAD yapıları karşılaştırılarak FAD'ın enzimin kristal yapısında hangi formda bulunduğu ve kristalin reaksiyonun hangi aşamasında elde edildiği tespit edilmiştir.
- 4) Enzimlere inhibitör yaklaşma yönlerinin FAD halkasında değişiklik yapabildiği ve bu konunun müteakip projelerde kapsamlı bir şekilde çalışılması gerektiği değerlendirilmiştir.

SEMBOLLER

k	:Reaksiyon hız sabiti
ϵ	: Ekstinksiyon katsayısı
E_m	: Redoks Potansiyeli
E	: Enerji
$E(2)$	: Kararlılık Enerjisi
E_i, E_j	: NBO Fock matrisi diyagonal elemanları
$F(i, j)$	: NBO Fock matrisi diyagonal olmayan elemanları
ΔE	: Reaksiyon enerjisi değişim
ΔG	: Reaksiyon serbest enerjisi değişim
ΔH	: Reaksiyon entalpi değişimi
$\Delta E^\ddagger$	:Reaksiyon aktivasyon enerjisinin değişimi
$\Delta G^\ddagger$	: Reaksiyon serbest aktivasyon enerjisinin değişim
$\text{\AA}$	: Angstrom
αH	: Alfahidrojen
αC	: Alfa karbon
Bc	: Beta Karbon
R	: Bağ mesafesi
θ	: Bağ açısı

KISALTMALAR

ACO	: Asil-CoA Oksidaz
AldO	: Alditol Oksidaz
BBE	: Berberin Bridge Enzyme (Berberin Köprü Enzimi)
Cys	: Sistein
ChitO	: Chito Oligosakkarit Oksidaz
CholO	: Kolesterol Oksidaz
CmlS	: Kloramfenikol içindeki Halojenaz Sentezi
CYP450	: Sitokrom P450
DAAO	: D-Amino Asit Oksidaz
DFT	: Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi
DMGDH	: Dimetilglisin Dehidrojenaz
E	: Enzim
ES	: Enzim Substrat Kompleksi
EI	: Enzim İnhibitör Kompleksi
FAD	: FlavinAdeninDinükleotid
FAOX	: Fructozil Amino Asit Oksidaz, Amadoriase
FCSD	: Flavositokrom C Sülfür Dehidrojenaz
Fl_{ox}	: Okside Flavın
Fl_{red}	: İndirgenmiş Flavın
Fl⁻	: SemikinonFlavın
FlH⁻	: İndirgenmiş Flavın
FMN	: Flavın Mono Nükleotid
GMC	: Glikoz-Metanol-Kolin Oksidaz
GSSG	: Glutasyon Disülfürün
GOOX	: Gluko Oligosakkarit Oksidaz
GULO	: L-Gulonolakton Oksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
HF	: Hartree Fock

6-HDNO	: 6-Hidroksi-D-Nikotin Oksidaz
HOX	: Heksoz Oksidaz
LAAO	: L-Amino Asit Oksidaz
MAO	: Monoamin Oksidaz
MAO-A	: Monoamin Oksidaz-A
MAO-B	: Monoamin Oksidaz-B
MM	: Moleküler Mekanik
M06-2X	: Minnesota Fonksiyoneli 06 ile %54 HF değiş-tokuş hibrit fonksiyoneli
MSOX	: Monomerik Sarkozin Oksidaz
NADPH	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
NADH	: Fumarat Redüktaz
NikD	: Yaygın Olmayan Aminoasit Oksidaz
NO	: Nitrik Oksit
NOD	: Nitrik Oksit Dioksigenaz
NOS	: Nitrik-Oksit Sentaz
GMC	: Glikoz-Metanol-Kolin Oksidaz
LSD1	: Lizin Spesifik Demetilaz 1
I	: İnhibitör
ONIOM	: OurOwn N-layeredIntegrated MO and MM metod
P	: Ürün
PDB	: Protein data bank
PCMH	: P-Krezol metilhidroksilaz
PM3	: ParametricMethod 3
PM6	: ParametricMethod 6
P2Ox	: Piranoz 2- Oksidaz
PIPOX	: Pipekolat Oksidaz
RnfG and RnfD	: Redoks Yürütücü İyon Pompası
S	: Substrat
SDH	: Sarkozin Dehidrojenaz

SET	: SingleElectron Transfer (Tek elektron transfer)
THCa	: Δ -Tetrahidrokannabinolik Asit
QM	: Kuantum Mekanik
YFT	: Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi
Tyr	: Tirozin
TSOX	: Heterotetramerik Sarkozin Oksidaz
Thr	: Treonin
VAO	: Vanilin Alkol Oksidaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Enzim Katalizli Reaksiyon.....	5
Şekil 1.2. (LF) Lumiflavin, (RF) Riboflavin, (FMN) Flavin Mononükleotit, (FAD) Flavin adenindinükleotit	7
Şekil 1.3. FAD veya FMN'nin Yükseltgenme Prosesi (Voet vd., 1990).....	8
Şekil 1.4. Flovoenzimde Bulunan 5 Farklı Aminoasitin Bağlanma Pozisyonu (Mewies, vd., 1998).....	13
Şekil 1.5. Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Kimyasal Reaksiyonu	15
Şekil 1.6. Mao'nun Substratlarının Üç Boyutlu Görüntüleri(Çakır, 2016).....	17
Şekil 1.7. (a) Tek Basamaklı Hidrür Transferi, (b) İki Basamaklı Hidrür Transferi, (c) Polar Nükleofilik A Mekanizma, (d) Eşzamansız Tek Basamaklı Polar Nükleofilik Mekanizma	18
Şekil 2.1. Flavinin İndirgenme Reaksiyonu ($2H^+$ ve $2e^-$ ile İndirgenme Enerjisi).....	22
Şekil 2.2. Flavinin İndirgenme Reaksiyonu (Hidrojenlenme Enerjisi)	23
Şekil 3.1.a. Model I _{ox} (Fl _{ox} , X=Cys-Tyr, Y=Triol)	27
Şekil 3.1.b. Model I _{red} (Fl _{red} H ₂ , X=Cys-Tyr, Y=Triol)	27
Şekil 3.2.a. Model II _{ox} (Fl _{ox} , X=Cys-Tyr, Y= CH ₃).....	28
Şekil 3.2.b. Model II _{red} (Fl _{red} H ₂ , X=Cys-Tyr, Y=CH ₃).....	28
Şekil 3.3.a. Model III _{ox} (Fl _{ox} , X=Cys-Tyr, Y= H)	28
Şekil 3.3.b. Model III _{red} (Fl _{red} H ₂ , X=Cys-Tyr, Y=H)	28
Şekil 3.4.a. Model IV _{ox} (Fl _{ox} , X= CH ₃ , Y=Triol).....	29
Şekil 3.4.b. Model IV _{red} (Fl _{red} H ₂ , X= CH ₃ , Y=Triol).....	29
Şekil 3.5.a. Model V _{ox} (Fl _{ox} , X= CH ₃ , Y= CH ₃)	30
Şekil 3.5.b. Model V _{red} (Fl _{red} H ₂ , X= CH ₃ , Y= CH ₃)	30
Şekil 3.6.a. Model VI _{ox} (Fl _{ox} , X= CH ₃ , Y= H).....	30
Şekil 3.6.b. Model VI _{red} (Fl _{red} H ₂ , X= CH ₃ , Y= H).....	30
Şekil 3.7.a. Model VII _{ox} (Fl _{ox} , X=H, Y=Triol)	31
Şekil 3.7.b. Model VII _{red} (Fl _{red} H ₂ , X=H, Y=Triol)	31
Şekil 3.8.a. Model VIII _{ox} (Fl _{ox} , X=H, Y=CH ₃).....	31
Şekil 3.8.b. Model VIII _{red} (Fl _{red} H ₂ , X=H, Y=CH ₃).....	31
Şekil 3.9.a. Model IX _{ox} (Fl _{ox} , X= H, Y=H)	32
Şekil 3.9.b. Model IX _{red} (Fl _{red} H ₂ , X= H, Y=H).....	32

Şekil 3.10.a. MAOA (2Z5X) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOA Enzimi 165° ; Model I_{ox} 176°).....	37
Şekil 3.10.b. MAOA (2Z5X) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOA Enzimi 165° ; Model I_{red} 156°).....	37
Şekil 3.11.a. MAOB (1S3B) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOB Enzimi 155° ; Model I_{ox} 176°).....	37
Şekil 3.11.b. MAOB (1S3B) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOB Enzimi 155° ; Model I_{red} 156°).....	37
Şekil 3.12.a. NikD (2OLN) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: NikD Enzimi 179° ; Model I_{ox} 176°).....	38
Şekil 3.12.b. NikD (2OLN) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: NikD Enzimi 179° ; Model I_{red} 156°).....	38
Şekil 3.13.a. Flavo Sitokrom C Sülfür Dehidrojenaz (1FCD) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1FCD Enzimi 178° , Model I_{ox} 176°)...	39
Şekil 3.13.b. Flavo Sitokrom C Sülfür Dehidrojenaz (1FCD) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1FCD Enzimi 178° , Model I_{red} 156°)..	39
Şekil 3.14. MSOX Enziminin Katalizasyonu.....	40
Şekil 3.15.a. MSOX (2GF3) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MSOX Enzimi 173° , Model I_{ox} 176°).....	41
Şekil 3.15.b. MSOX (2GF3) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MSOX Enzimi 173° , Model I_{red} 156°).....	41
Şekil 3.16. FAOX C-N bağının oksidasyonu ile fruktozaminin amino kısmındaki azot ve fruktozil parçasının C1'i arasını katalizler. Elde edilen Shift bazı glikozona ve bir aminoasite hidrolizlenir. Katalitik döngüden sonra indirgenmiş FAD hidrojen peroksit salınımı ile eşzamanlı olarak moleküler oksijen ile yükseltgenir.....	42
Şekil 3.17.a. FAOX (3DJE) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: FAOX Enzimi 174° , Model I_{ox} 176°).....	42
Şekil 3.17.b. FAOX (3DJE) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: FAOX Enzimi 174° , Model I_{red} 156°).....	42
Şekil 3.18. Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz Enziminin Katalizasyonu	44
Şekil 3.19.a. Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz (4QOG) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4QOG Enzimi 178° , Model I_{ox} 176°)	45

Şekil 3.19.b. Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz (4QOG) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4QOG Enzimi 178°, Model IV _{red} 155°)	45
Şekil 3.20.a. Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz (4U7H) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4U7H Enzimi 175°, Model IV _{ox} 176°)	45
Şekil 3.20.b. Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz (4FGL) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} 'nin Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4FGL Enzimi 178°, Model IV _{red} 155°)	45
Şekil 3.21.a. LSD1 (2DW4) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LSD1 Enzimi 170°, Model IV _{ox} 176°)	46
Şekil 3.21.b. LSD1 (2DW4) Enzimi Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LSD1 Enzimi 170°, Model IV _{red} 155°)	46
Şekil 3.22. Glutasyon Oksidaz Enzim Katalizasyonu	47
Şekil 3.23.a. Glutasyon Redüktaz (3DK9) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 3DK9 Enzimi 175°, Model IV _{ox} 176°)	48
Şekil 3.23.b. Glutasyon Redüktaz (3DK9) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 3DK9 Enzimi 175°, Model IV _{red} 155°)	48
Şekil 3.24.a. Glutasyon Oksidaz (2F6C) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2F6C Enzimi 174°, Model IV _{ox} 176°)	48
Şekil 3.24.b. Glutasyon Oksidaz (2F6C) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2F6C Enzimi 174°, Model IV _{red} 155°)	48
Şekil 3.25. LAAO Enziminin Katalizasyonu	49
Şekil 3.26. L-Alanin'in Piruvik Asit (2-Oksopropanoik Asit)'e Dönüşüm Reaksiyonu	49
Şekil 3.27. LAAO Enzim Katalizasyonu	50
Şekil 3.28.a. DAAO (3ZNN) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: DAAO Enzimi 174°, Model IV _{ox} 176°)	51
Şekil 3.28.b. DAAO (3ZNN) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: DAAO Enzimi 174°, Model IV _{red} 155°)	51
Şekil 3.29.a. LAAO (4FEG) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LAAO Enzimi 165°, Model IV _{ox} 176°)	51
Şekil 3.29.b. LAAO (4FEG) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LAAO Enzimi 165°, Model IV _{red} 155°)	51
Şekil 3.30. NAD(P)H Katalizasyonu	52

Şekil 3.31.a. NAD(P)H Dehidrojenaz (1D4A) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1D4A Enzimi 179°, Model IV _{ox} 176°)	53
Şekil 3.31.b. NAD(P)H Dehidrojenaz (1D4A) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1D4A Enzimi 179°, Model IV _{red} 155°)	53
Şekil 3.32.a. Sülfhidril Oksidaz (4LDK) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4LDK Enzimi 177°, Model IV _{ox} 176°)	54
Şekil 3.32.b. Sülfhidril Oksidaz (4LDK) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4LDK Enzimi 177°, Model IV _{red} 155°)	54
Şekil 3.33. Aldehit Oksidaz Katalizasyonu AO birçok organizmada dokuların sitozolik kompartımanında yer alan metabolizan bir enzimdir.	54
Şekil 3.34.a. Aldehit Oksidaz (2E1Q) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2E1Q Enzimi 179,5°, Model IV _{ox} 176°)	55
Şekil 3.34.b. Aldehit Oksidaz (2E1Q) Enzimi (sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması(FAD Halkası Bükülme Açısı: 2E1Q Enzimi 179,5°, Model IV _{red} 155°)	55
Şekil 3.35. Nitrit ve Nitrat Oluşum Reaksiyonları	56
Şekil 3.36.a. Nitrik Oksit Sentaz (1F2O) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1F2O Enzimi 173°, Model IV _{ox} 176°)	56
Şekil 3.36.b. Nitrik Oksit Sentaz (1F2O) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1F2O Enzimi 173°, Model IV _{red} 155°)	56
Şekil 3.37. NOD Katalizasyonu	57
Şekil 3.38.a. Nitrik Oksit Dioksigenaz (4EH1) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4EH1 Enzimi 178°, Model IV _{ox} 176°).....	57
Şekil 3.38.b. Nitrik Oksit Dioksigenaz (4EH1) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4EH1 Enzimi 178°,Model IV _{red} 155°).....	57
Şekil 3.39.a. Katekolamin Oksidaz (2ZCD) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{ox} Karşılaştırılması, (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2ZCD Enzimi 173°, Model IV _{ox} 176°).....	58
Şekil 3.39.b. Katekolamin Oksidaz (2ZCD) Enzimi (Sarı) ile Model IV _{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2ZCD Enzimi 173°, Model IV _{red} 155°)	58

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Kovalent Bağlı FMN ve FAD İçeren Enzimler.....	11
Tablo 2.1. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisini Diğer Teorilerden Ayıran Temel Özellikler.....	19
Tablo 2.2. Karşılaştırmada Kullanılan Kovalent Bağlı Enzimler (8a-Cys).....	24
Tablo 2.3. Karşılaştırmada Kullanılan Kovalent Bağlı Olmayan Enzimler	25
Tablo 3.1. Optimizasyonu Yapılmış Modellerin FAD Halkası Bükülme Açıları	32
Tablo 3.2. ΔH , ΔG Hidrojenlenme Enerjileri	34
Tablo 3.3. ΔH , ΔG $2e^- + 2H^+$ İndirgenme Enerjileri	34

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Flavin, birçok enzim için elektron kofaktör aracı olarak davranan, flavoprotein olarak sınıflandırılan enzimlerde oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında görev alan, Riboflavin (vitamin B2)'den türeyen üç halkalı 7,8,10-süstitüentli izoalloksazin [7,8-dimethyl-10-(1-D-ribityl)isoalloxazine] halka sistemidir (Mack ve Grill, 2006). Flavin mono nükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) riboflavinin biyolojik aktif formlarıdır.

Yükseltgenmiş flavin koenzimine ait izoalloksazin halka sisteminin tercih edilen yapısının düzlemsel olduğu kabul edilmektedir (Hemmerich,1976). Bununla birlikte, tamamen indirgenmiş flavin konformasyonu ise tartışmalıdır. Yapılan hesapsal çalışmalarda radikal ve yükseltgenmiş flavinin düzlemsel veya düzlemsele yakın (Zheng ve Ornstein, 1996) indirgenmiş flavinin ise bükülmüş geometriyi tercih ettiği vurgulanmaktadır (Rizzo,2001; Zheng ve Ornstein, 1996).

Kofaktörler enzime genellikle kovalent olmayan şekilde bağlanır ve kataliz sırasında enzimden ayrılarak koenzimler gibi davranırlar. Spesifik bir kofaktör olan flavin enzime kovalent olarak bağlanabilmektedir. Ayrıca birçok flavoproteinde flavin enzime sıkıca tutunmasına rağmen kovalent olmayan şekilde bağlanmıştır (Heuts vd., 2009). Farklı tipte kovalent flavin bağlantıları vardır. Bunlar 6-(Cys)-FMN, 8 α -(Asp)-FAD, 8 α -(Cys)-FAD, 8 α -(N1-His)-FAD, 8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD, 8 α -(N1-His, 6-Cys)-FMN, 8 α -(N3-His)-FAD, 8 α -(N3- His)-FMN, 8 α -(O-Tyr)-FAD, Ribitilfosfat-(O-Thr)-FMN şeklindedir (Macheroux vd., 2011). 2009'lu yıllarda Acremonium Strictum mantarındaki gliko oligosakkarit oksidazın (GOOX) kristal yapısının incelenmesiyle yeni bir tür kovalent FAD bağı keşfedilmiştir. Her bir enzim molekülü için, iki bağ yoluyla kovalent bağlı olan bir FAD molekülü olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlar 8 α -N1-histidin-FAD bağlantısı ve 6-sistein-FAD bağlantısıdır. Bu keşif bikovalent flavoenzimin ilk raporu olmasına rağmen kısa sürede başka kovalent flavoenzimlerin de aynı şekilde bağlanmış flavin içerdiği tespit edilmiştir. Kovalent flavinasyon protein kararlılığını artırabilmekte, kofaktör bağlanmasını sağlamakta ve kofaktörün nispeten yüksek bir redoks potansiyelini indükleyebilmektedir (Heuts vd., 2009).

İşlevlerini flavin kofaktörü ile gerçekleştiren enzimler aerobik ve anaerobik metabolizma, ışık emisyonu, fotosentez, DNA tamiri, bitki fototropizması, biyolojik saat düzeni,

hidroksilleme ve oksidasyon reaksiyonları gibi birçok biyokimyasal reaksiyonu katalizlemektedirler (Öztürk vd., 2014; Akyüz vd., 2013). Birçok enzimin kimyasal reaksiyon mekanizmalarının anlaşılabilmesi için yüksek redoks potansiyeline sahip ve harika bir elektron alıcısı olan izoalloksazin halkasının redoks reaksiyonlarındaki şekillerinin, yapısal ve enerjetik farklılaşmalarının araştırılması bir gereklilik olmuştur.

Bu tezin amacı, bugüne kadar yapılan teorik ve deneysel çalışmaların ışığında sübstitüentlerin FAD halkasının şeklinde yaptığı yapısal ve enerjetik farklılaşmalara açıklık getirerek flavoenzim mekanizmalarına ışık tutacak yeni bulgular elde etmektir. Bu bağlamda, şu soruların cevapları araştırılmıştır:

- 1) FAD halkasının bükülme açısı yükseltgenmiş ve indirgenmiş formlarda değişiklik göstermekte midir? FAD halkasının bükülme açısı takılan sübstitüentlerin etkisiyle indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarda nasıl değişmektedir? Sübstitüentler flavin redoks tepkimesini nasıl etkilemektedir? ΔH ve ΔG indirgenme enerjileri sübstitüent etkisiyle nasıl değişmektedir?
- 2) Flavın konformasyonu 8a-Cys'den kovalent bağlı olup olmaması ile ilişkili midir? 8a-Cys'den kovalent bağ içeren ve kovalent bağ içermeyen enzimlerdeki model yapıların FAD halkaları arasında benzerlik veya farklılık var mıdır? Benzerlik ya da farklılık ne ifade etmektedir?
- 3) İnhibitör yaklaşma yönünün veya sübstratın, enzimin FAD halkasının bükülme açısı üzerinde etkisi var mıdır?

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Enzimler

Biyolojik sistemlerde katalizör görevi gören sentetik veya inorganik katalizörlere göre daha önemli katalizleme yeteneğine sahip olan genellikle protein yapısında bulunan maddelere enzim denir. Kimyasal reaksiyonları hızlandırır ve sulu çözeltilerde belirli sıcaklık ve pH şartları altında faaliyet gösterirler (Nelson ve Cox, 2012). Enzimler canlıların içinde çok çeşitli işlevlere sahiptir. Bütün biyokimyasal proseslerin merkezinde yer alırlar.

Canlı sistemler için reaksiyonların enzimatik katalizi esastır. Biyomoleküllerin çoğu, hücre içinde bulunan nötr pH, ılımlı sıcaklık ve sulu ortamda oldukça kararlıdır. Yiyeceklerin sindirilmesi, sinir sinyallerinin gönderilmesi veya kasların kasılması için gerekli reaksiyonlar, kataliz olmadan uygun hızda meydana gelmez. Bir enzim, belli bir reaksiyon için enerjetik olarak özel bir ortam sağlayarak reaksiyonların daha hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar.

Bazı enzimler aktivite gösterebilmek için protein yapısında bulunmayan metal iyonlarından (Ca, Mg, K, Zn) veya çeşitli organik bileşiklerden oluşan kofaktör adı verilen yan gruplara ihtiyaç duyarlar. Enzimin faaliyet gösterebilmesi için gerekli olan organik veya organometalik, çoğunlukla fosfat içeren ve enzimin protein kısmına göre çok daha küçük moleküllü kısmına “koenzim” denir. Enzimde faaliyet gösteren ve esas işi yapan bu kısımdır.

Enzim Sınıflandırılması

Enzimler IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) reaksiyon tiplerine göre altı ana sınıfa ayrılır (McDonald vd., 2009).

Oksidoredüktaz

Oksidoredüksiyon reaksiyonlarını katalize eden bir enzim sınıfıdır. Oksidoredüktazlar, bir molekülden (oksidant) diğer moleküle (reaktant) elektron transferini katalize etmektedirler. Oksidoredüktazlar $A^- + B \rightarrow A + B^-$ gibi A'nın yükseltgen, B'nin indirgen olduğu reaksiyonları katalize eder. Altı tip oksidoredüktaz mevcuttur. Bunlar; dehidrogenazlar, peroksidazlar, hidroksilazlar, oksijenazlar, redüktazlar ve oksidazlar'dır.

Transferaz

Belirli bir fonksiyonel grubun (örneğin, metil veya glikosil grubu) verici olarak adlandırılan bir molekülden alıcı olarak adlandırılan diğer moleküle aktarılmasını sağlayan enzim çeşitleridir. Transferazlar, biyolojide yüzlerce farklı biyokimyasal reaksiyon ile ilgilidir ve hayatımızdaki bazı önemli süreçlerin de ayrılmaz parçasıdır.

Hidrolaz

Biyokimyada kimyasal bağın hidrolizini katalize eden enzimlerdir. $A-B + H_2O \rightarrow A-OH + B-H$ reaksiyonunu katalize eden enzim bir hidrolazdır.

Liyaz

Biyokimyada hidroliz ve oksidasyon dışındaki yollarla genellikle yeni bir çift bağ veya yeni bir halka yapısı oluşturularak çeşitli kimyasal bağların parçalanmasını katalize eden enzimlerdir. Ayrıca tersinir reaksiyonları da mümkündür ("Michael ilavesi" olarak adlandırılır).

İzomeraz

Bir molekülü bir izomerden diğerine dönüştüren enzim sınıfıdır. İzomerazlar bağların kırıldığı ve olduğu intramoleküler (molekül içi) düzenlenmeleri kolaylaştırır. Genel reaksiyon formu $A-B \rightarrow B-A$ şeklindedir.

Ligaz

Biyokimyada yeni bir kimyasal bağ oluşturarak iki büyük molekülün birleşmesini katalize edebilen enzimlerdir. Genellikle büyük moleküllerden birindeki küçük asılı bir kimyasal grubun hidrolizi veya iki bileşiğin birbirine bağlanmasını katalize eder. Bağlanmayı katalize eden enzimler örnek verilebilir. Genelde ligazlar;



(küçük harfler, küçük bağımlı grupları simgelemektedir) gibi reaksiyonları katalize ederler. Ligaz nükleik asidin iki tamamlayıcı parçasına katılabilir ve replikasyon sırasında çift sarmallı DNA'da ortaya çıkan tek sicimli kopmaları onarabilir.

Enzim Kataliz Reaksiyonları

Canlı vucudunda termodinamik olarak tercih edilen birçok reaksiyon kinetik olarak yavaştır. Bu reaksiyonların katalizlenmesi için reaksiyona özgü katalizörler ve enzimler ortaya çıkmıştır. Substratlar (S) enzimlerin (E) aktif bölgelerine bağlanır ve enzim-substratkompleksi (ES) oluştururlar daha sonra bağlanmış substratlar ürünlere (P) dönüşerek ayrılırlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Enzim Katalizli Reaksiyon

Yakınlık etkisi, nükleofilik (kovalent) kataliz, genel asit-baz katalizi, elektrostatik kataliz, çözünürleştirme ve germe-çekme enzim kataliz mekanizmalarının en önemlileridir ve geçiş konumunun kararlılık kazanmasına ya da girenlerin kararsızlaşmasına yardımcı olarak reaksiyonun aktivasyon bariyerini düşmesini sağlarlar (Silverman ve Holladay, 2014).

Enzim İnhibisyonu

Enzime bağlanan ve enzimin etkinliğini azaltan veya durduran maddelere inhibitör, bu olaya da inhibisyon denir. Birçok hastalık veya hastalığın belirtileri enzim inhibisyonu sonucunda enzimin az ya da çok çalışmasından kaynaklanmaktadır.

Yeni bir ilaç geliştirme sürecinin ilk aşaması enzim inhibitörünün keşfidir. Geçmişte yeni inhibitörlerin geliştirilmesinin tek yolu deneme yanılma yöntemi idi. Bu yöntem kombinatoriyal kimya yaklaşımı ile genişletilerek kısa sürede çok sayıda yeni bileşiklerin üretimini sağlamak ve kimyasal "koleksiyonlar" içinden, yüksek hacimli tarama teknolojileri kullanılarak kısa sürede faydalı inhibitörler tespit edilebilmektedir (Koppitz ve Eis, 2006). Bunlara ek olarak son zamanlarda ilaç tasarımında alternatif bir yaklaşım yaygınlaşmıştır. Yeni yaklaşımda enzimin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı kullanılarak hangi moleküllerin inhibitör olabileceği öngörülür. Öngörülen bu moleküller deneysel olarak sınanır ve test edilen bileşiklerden birinin yeni bir inhibitör olduğu bulunabilir. Ayrıca bilgisayara dayalı yöntemler ile enzim ve inhibitör ilişkisi ile daha az malzeme harcanarak bilgisayar ortamında test edilebilir. Daha akılcı ilaçlar tasarlanabilir.

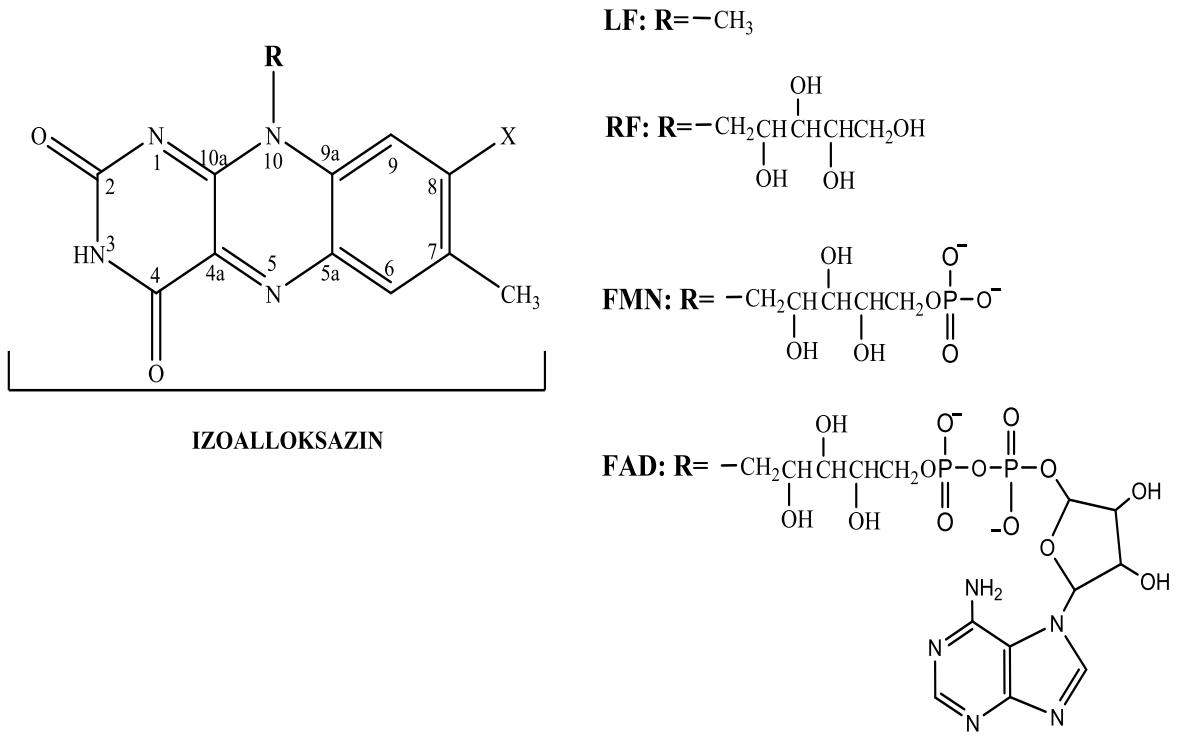
1.2.2. Flavoproteinler

Flavoproteinlerin bahsedildiği ilk bilimsel literatür 1879'lara kadar gitmektedir. İnek sütü içeriğinde yapılan çalışmalardan parlak sarı pigmentler izole edildiğinde, izole edilen parlak sarı pigmentlerin günümüzde flavin olduğunu biliyoruz fakat o zamanlarda laktokrom olarak bilinmekteydi. 1930'lu yılların başlarında aynı pigment kaynağından izole edilmiş ve B vitamini kompleksinin içeriğinde olduğu onaylanmıştır. 1934 yılında iki grup neredeyse aynı zamanda flavinin yapısını tanımlamışlar ve ribitil yan zincir ve sarı renkli konjuge sistemde dolayı riboflavin ismi verilmiştir. Mikrobiyal ve ökaryot proteinlerin % 4'ünün flavoprotein olduğu tahmin edilmektedir ve "Protein Data Bank"ta 1200 den fazla flavoprotein mevcuttur. İşlevlerini flavin kofaktörü ile gerçekleştiren enzimler aerobik ve anaerobik metabolizma, ışık emisyonu, fotosentez, DNA tamiri, bitki fototropizması, biyolojik saat düzeni, hidroksillemeve oksidasyon reaksiyonları gibi birçok biyokimyasal reaksiyonu katalizlemektedirler (Öztürk vd., 2014; Akyüz vd.,2013).

1.2.2.1. Flavın Koenzim

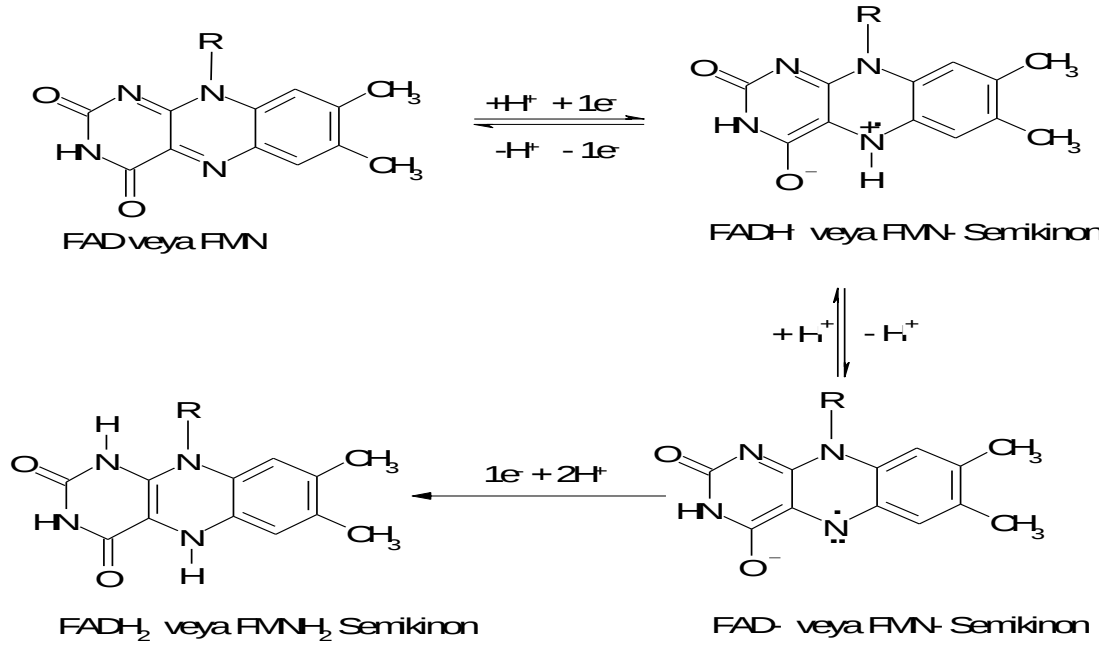
Flavin birçok enzim için elektron kofaktör aracı olarak davranan, birçok oksidoredüktaz enzimde bulunan, vitamin B2'den türeyen üç halkalı 7,8,10-sübstitüentli izoalloksazin [7,8-dimetil-10-(1-D-ribitil) isoalloksazin] halka sistemi içeren bir koenzimdir (Sucharitol vd.; 2010, Mack ve Grill, 2006). Flavoenzimler, belli biyolojik matrislerin etkisi altında proton ve elektron transfer reaksiyonlarında ışıkla harekete geçirildiğinde ışık ürünü (light harvester) gibi davranmaktadır (Li ve Glusac 2008; Suzuki vd., 2008).

Flavin kofaktör olarak genellikle iki formda görülmektedir. Birincisi adenzindifosfat ile konjuge edilmiş olan (FAD) flavinadenindinükleotittir. FAD bir redoks kofaktörüdür ve özellikle prostetik grubu metabolizmada birçok önemli reaksiyonda faaliyet göstermektedir. İkincisi ise riboflavinin fosforlanmış bir türevi olan flavin mononükleotittir (FMN) (Şekil 1.2). FMN (riboflavin-5-fosfat) riboflavin kinaz enzimi tarafından riboflavinden (vitamin B2) üretilen ve çeşitli oksidoredüktazların prostetik grubu olarak işlev gören bir biyomoleküldür.



Şekil 1.2. (LF) Lumiflavin, (RF) Riboflavin, (FMN) Flavin Mononükleotit, (FAD) Flavin adenindinükleotit

İzoalloksazin halkası flavin koenziminin biyolojik aktivite gösteren kısmıdır. İzoalloksazin halkası yüksek konjugasyona sahip olmakla birlikte muhteşem bir elektron akseptörüdür. Bu sayede kuvvetli redoks özellik göstermektedir. Flavinin radikal özellikleri, ilk kez 1936 yılında Michaelis ve arkadaşları tarafından gözlenmeye başlanılmasına rağmen, enzimolojistler tarafından hala dikkatle çalışılmaktadır (Michaelis vd.,1936; Edmondson, 1983). Kararlı radikal formlarının bir elektron ve iki elektron yükseltgenme prosesleri vardır. Böylece NADH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit) gibi etkili bir elektron çifti vericisi olabildiği gibi sitokromlar gibi elektron alıcısı olabilir (Zhang vd., 2013). FAD, 2H^+ ve 2e^- eklenerek FADH_2 ’ye indirgenebilir. FADH elde etmek için, FADH_2 ’den 1H^+ ve 1e^- eksiltilecek yükseltgenebilir. FAD yapısı, 1H^+ ve 1e^- eksiltilecek tekrar oluşturulabilir (Şekil 1.3). FAD yapısı ayrıca flavin-N(5) oksitin indirgenmesi ve dehidrasyonu ile de oluşabilir (Devlin, 2011).



Şekil 1.3. FAD veya FMN'nin Yükseltgenme Prosesi (Voet vd., 1990).

Flavinler, sulu solüsyondayken oksidasyon durumuna bağlı olarak özel renkler alırlar. FAD (tamamen oksitlenmiş) sarıdır, FADH (yarı indirgenmiş) pH'a göre mavi veya kırmızıdır ve tamamen indirgenmiş form ise renksizdir (Barile vd., 2013). FAD formunun değiştirilmesi, diğer kimyasal özellikleri üzerinde önemli etkiler oluşturabilir. Örneğin, tamamen yükseltgenmiş FAD formu, nükleofilik saldırıya uğrayabilir, tamamen indirgenmiş form FADH₂ ise yüksek polarizasyon kabiliyetine sahiptir, ancak yarı indirgenmiş form sulu solüsyonda kararsız halde bulunmaktadır (Kim ve Winge, 2013). FAD bir aromatik halka sistemidir, ancak FADH₂ değildir. FADH₂ aromatik yapının sağladığı rezonansa göre kararlı olmadığından, FAD'a göre enerjisi önemli ölçüde yüksektir. FADH₂ enerji taşıyan bir moleküldür yükseltgendiği zaman yeniden aromatiklik kazanır ve bu stabilizasyonla enerjiyi serbest bırakır.

Yükseltgenmiş flavin koenzimine ait izoalloksazin halka sisteminin tercih edilen yapısının düzlemsel olduğu kabul edilmektedir (Hemmerich, 1976). Bununla birlikte, tamamen indirgenmiş flavin konformasyonu ise tartışmalıdır. Daha önceki ışık emme çalışmalarında (light absorption method), tamamen indirgenmiş serbest flavinin düzlemsel olmadığı sonucuna varılmıştır (Dudley, 1964). İndirgenmiş durumdaki flavinin X-ışını kristalografik analizinde, 1,5-dihidroflavinin merkezi pirazin halkası 8π elektron içerdiğinden, bir Hückel antiaromatik sistemi olduğu ileri sürülmüştür ve flavin hidrokinon bu antiaromatik bozulmayı azaltmak için N5-N10 eksenini boyunca katlanarak "bükülmüş" veya "kelebek" konformasyona dönüştüğü vurgulanmıştır (Rizzo, 2001). Kristalografik analizlerin aksine,

indirgenmiş serbest flavinler üzerinde yapılan NMR çalışmalarında, flavinlerin düzlemsel veya hafif bükük bir geometri gösterdiği değerlendirilmiştir (Moonen vd., 1984). Yapılan hesapsal çalışmalarda radikal ve yükseltgenmiş flavinin düzlemsel veya düzlemsele yakın (Zheng ve Ornstein, 1996) indirgenmiş flavinin ise bükülmüş geometriyi tercih ettiği vurgulanmaktadır (Rizzo, 2001; Zheng ve Ornstein, 1996).

Kofaktörler enzime genellikle kovalent olmayan şekilde bağlanır ve kataliz sırasında enzimden ayrılarak koenzimler gibi davranırlar. Hem (Hem bir kofaktördür ve hemoglobin, miyogloblin ve sitokromların prostetik grubudur) ve flavin kofaktörleri gibi spesifik kofaktörler enzime kovalent olarak bağlanırlar. Ayrıca birçok flavoproteinde flavin enzime sıkıca tutunmasına rağmen kovalent olmayan şekilde bağlanmıştır (Heuts vd., 2009). Literatürde 374 tane flavin içeren protein fonksiyonlarına, yapılarına ve archaeal, eubacterial, protozoan ve ökaryotik genomlarının dağılımlarına göre analiz edilmiştir. Flavın içeren enzimlerden %90'dan fazlası oksidoredüktazdır ve kalan enzimler transferaz (%4,3), liyaz (%2,9), izomeraz (%1,4) ve ligaz (%0,4) olarak sınıflandırılır. FAD (289 tane, %75) kofaktör olarak FMN (98 tane, %25)'den daha yaygındır. Ayrıca flavoprotein içeren enzimlerin 276 tanesi tamamen sınıflandırılmıştır. Sınıflandırması tam olamayan 98 enzim vardır. Bunların enzimatik aktivitesi, elektron transferi ya da depolaması kanıtlanmamıştır ve 17 tanesinin ise hiçbir bağlantısı yoktur. Birçok enzimde kofaktör aktif bölgeye kovalent olmayan şekilde bağlanmasına rağmen 40 tane enzim flavin kofaktörüne kovalent olarak bağlanmıştır bu da flavoproteinlerin yaklaşık %10,8'dir (Macheroux vd., 2011). Kovalent flavoproteinlerin varlığını gösteren ilk deneysel veriler 1950'lerde yayınlanmasına (Fitzpatrick, 2010) rağmen bu konuda çalışmalar hala devam etmektedir. 2009'lu yıllarda *Acremonium Strictum* mantarındaki Gliko Oligosakkarit Oksidazın (GOOX) kristal yapısının incelenmesiyle yeni bir tür kovalent FAD bağı keşfedilmiştir. Her bir enzim molekülü için, iki bağ yoluyla kovalent bağlı olan bir FAD molekülü olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlar 8a-N1-histidin-FAD bağlantısı ve 6-sistein-FAD bağlantısıdır. Bu keşif bikovalent flavoenzimin ilk raporu olmasına rağmen kısa sürede başka kovalent flavoenzimlerin de aynı şekilde bağlanmış flavin içerdiği tespit edilmiştir. Aclasinomisin Oksidoredüktaz, Berberin Köprü Enzimi (BBE), Heksoz Oksidaz, Heksoz Glikopeptid Oksidaz, D-tetrahidrokanabinolik Asit Sintaz, Kanabidiolik Asit Sintazı ve Chito Oligosakkarit Oksidaz (ChitO) bikovalent bağlı flavin örnekleridir (Heuts vd., 2009).

Enzimlerin Kovalent Bağlı Flavin İçermesinin Etkileri Nelerdir?

1. Kovalent flavinasyon redoks potansiyelini önemli ölçüde arttırdığından çoğu kovalent flavoproteinler oksidazdır ve kovalent flavoprotein içeren sadece bir kaç redüktaz ve dehidrojenaz bilinmekle birlikte kovalent flavinasyonun protein stabilitesini arttırdığı ve bazı durumlarda Michaelis kompleks oluşumunu ve protein oligomerleşmesini etkilediği görülmektedir (Heuts vd., 2009).
2. Flavinlerin redoks potansiyelinin, kimyasal modifikasyonlar ya da değişen ortamlar (örneğin, bir protein içinde) tarafından etkilenebileceği bilinmektedir. Kovalent olmayan, kovalent ve bikovalent flavoproteinlerin redox potansiyelleri karşılaştırıldığında, flavinin kovalent bağlanmasının orta nokta potansiyelini önemli ölçüde arttırdığı net bir şekilde görülmüştür. Redoks potansiyeli diğer flavin-protein etkileşimleri ile modüle edilebilse de, elektron çeken süstituentlerin C8 pozisyonunda flavin redoks potansiyelini önemli ölçüde arttırdığı literatürde savunulmaktadır (Edmonson ve Ghisla, 1999). Birçok kovalent ve kovalent olmayan mutant formların redoks potansiyeli üzerine yapılan çalışmalarda, flavinin kovalent bağı kaldırıldığında redoks potansiyelinde azalma gözlenmiştir. Histidin-FAD içeren enzimler için kovalent flavoprotein bağı bulunması redoks potansiyelini ve bununla birlikte enzimin oksidatif gücünü arttırdığı görülmüştür. İlk sistematik kovalent flavinasyon VAO ile redoks potansiyeli, kinetik davranış ve protein yapısal bütünlüğü üzerine yapılmıştır. FAD VOA'ya kovalent olarak 8a-N3-His 422'den bağlanmıştır ve VAO kovalent bağı kaybolması durumunda redoks potansiyel ölçümleri redoks potansiyelinde önemli ölçüde azalma olduğunu göstermiştir. Redoks potansiyeli ile enzimin oksidasyon gücü arasındaki ilişki enzimin indirgenme hızını yansıtmaktadır (Fraaije vd., 1999). 2010 yılında Sucharitakul ve arkadaşlarının kovalent bağlı flavoenzim (piranoz 2-oksidad) ile yaptığı deneysel çalışmada doğal enzim ile mutasyona uğratılan kovalent bağısız mutant enzimin indirgenme hızı yaklaşık olarak 22 kat azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca grubumuzda hesapsal olarak çalışılan yüksek lisans tezinde de kovalent bağısız FAD içeren mutant tipleri oluşturularak karşılaştırılmış ve kovalent bağısız mutant tipinde aktivasyon enerjisi yaklaşık 1,9 kkal/mol artmış olup hızın 22 kat azalacağı belirlenmiştir (Çakır, 2016).
3. Kovalent flavinasyon protein kararlılığını artırabilir, kofaktör bağlanmasını sağlar ve kofaktörün nispeten yüksek bir redoks potansiyelini indükleyebilir (Heuts vd., 2009).

Tablo 1.1. Kovalent Bağlı FMN ve FAD İçeren Enzimler

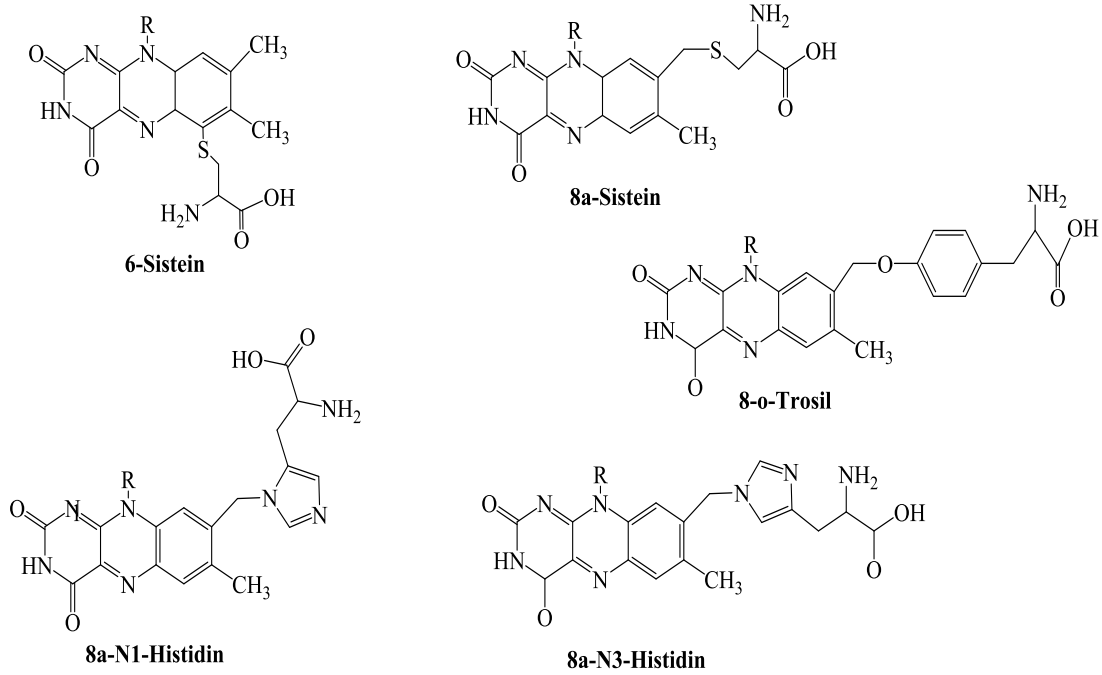
ENZİM	KOFAKTÖR	AÇIKLAMA
Dimetilamin Dehidrojenaz	6-(Cys)-FMN	1,3
Trimetilamin Dehidrojenaz	6-(Cys)-FMN	1,3
Kloramfenikol içindeki Halojenaz Sentezi (CmlS)	8 α -(Asp)-FAD	3
Monoamin Oksidaz A (MAO A)	8 α -(Cys)-FAD	1,3
Monoamin Oksidaz B (MAO B)	8 α -(Cys)-FAD	1,3
Yaygın Olmayan Amino Acid Oksidaz, NikD	8 α -(Cys)-FAD	2,3
Flavositokrom C Sülfür Dehidrojenaz (FCSD)	8 α -(Cys)-FAD	1,2
Monomerik Sarkozin Oksidaz (MSOX)	8 α -(Cys)-FAD	2,3
Amadoriase, Fructosyl Amino Acid Oxidases (FAOX)	8 α -(Cys)-FAD	2
Sorbitol Oksidaz	8 α -(His)-FAD	2
γ -N- Metilaminobütirat Oksidaz	8 α -(His)-FAD	2,3
(R)-6-Hidroksi Nikotin Oksidaz	8 α -(N1-His)-FAD	3
6-Hidroksi-D-NikotinOksidaz (6-HDNO)	8 α -(N1-His)-FAD	2
Alditol Oksidaz (AldO)	8 α -(N1-His)-FAD	2,3
Kolesterol Oksidaz (CholO)	8 α -(N1-His)-FAD	1,2,3
Siklopiazonat Oksidosiklaz	8 α -(N1-His)-FAD	1
Sitokinin Dehidrojenaz (CKX)	8 α -(N1-His)-FAD	2,3
D-Arabino-1,4-Laktone Oksidaz	8 α -(N1-His)-FAD	2,3
L-Galaktonolakton Oksidaz	8 α -(N1-His)-FAD	1,2
L-Gulonolakton Oksidaz (GULO)	8 α -(N1-His)-FAD	1,2,3
Thiamin Oksidaz	8 α -(N1-His)-FAD	1,2,3
β - Siklopiazonat Dehidrojenaz	8 α -(N1-His)-FAD	3
Heksoz Oksidaz (HOX)	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	1,2,3
(S)- Tetra hidroprotoberberin Oksidaz, (S)-THB Oksidaz	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	3
Aklasinomisin Oksidoredüktaz	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	2,3
Chito Oligosakkarit Oksidaz (ChitO)	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	2,3
Gluko Oligosakkarit Oksidaz (GOOX)	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	2,3
Polen Alerjenleri (BBE proteinleri vb.)	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	3

ENZİM	KOFAKTÖR	AÇIKLAMA
Retikülün Oksidaz, Berberin Bridge Enzyme (BBE, Berberin Köprü Enzimi)	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	1,2,3
Δ -Tetra hidrokannabinolik Asit (THCa)Sintaz	8 α -(N1-His,6-Cys)-FAD	2,3
Glikopeptit Hekzos Oksidaz Dbv29	8 α -(N1-His,6-Cys)-FMN	3
2-Keto-o-Ghconat Dehidrojenaz	8 α -(N3-His)-FAD	1
Kolin Oksidaz	8 α -(N3-His)-FAD	1,2,3
Dehidroglukonat Dehidrojenaz	8 α -(N3-His)-FAD	3
D-Glukonat Dehidrojenaz	8 α -(N3-His)-FAD	1
D- Glukonolakton Oksidaz	8 α -(N3-His)-FAD	1,3
Dimetilglisin Dehidrojenaz (DMGDH)	8 α -(N3-His)-FAD	2,3
Dimetilglisin Oksidaz (DMGO)	8 α -(N3-His)-FAD	1,2,3
Eugenol Oksidaz	8 α -(N3-His)-FAD	2,3
Fumarat Redüktaz (NADH)	8 α -(N3-His)-FAD	1,2,3
Glukonat 2-Dehidrojenaz (acceptor)	8 α -(N3-His)-FAD	3
Piranoz 2- Oksidaz (P2Ox)	8 α -(N3-His)-FAD	2,3
Sarkozin Dehidrojenaz	8 α -(N3-His)-FAD	1,2
Süksinat Dehidrojenaz (ubiquinone)	8 α -(N3-His)-FAD	1,2,3
Vanilin Alkol Oksidaz (VAO)	8 α -(N3-His)-FAD	1,2,3
L-Glukonolakton Oksidaz	8 α -(N3-His)-FAD	2
Heterotetramerik Sarkozin Oksidaz (TSOX)	8 α -(N3-His)-FMN	1,3
4-Kresol Dehidrojenaz (Hidroksilleme)	8 α -(O-Tyr)-FAD	3
4-Etilfenol Metilhidroksilaz	8 α -(O-Tyr)-FAD	1
P-Krezol Metilhidroksilaz (PCMH)	8 α -(O-Tyr)-FAD	1,2
Redoks Yürütücü İyon Pompası (RnfG and RnfD)	Ribitilfosfat-(O-Thr)- FMN	3

AÇIKLAMALAR:

1. Mewies, vd.1998, s.9.
2. Heuts vd., 2009, s.3408-3409.
3. Macheroux vd., 2011, Tablo Ekleri, s. 2-30.

Literatür taraması kapsamında 1998, 2009 ve 2011 yıllarında flovoenzimlerle ilgili kapsamlı çalışmalar yapıldığı fark edilmiştir. Bu çalışmalarda kovalent flavin içeren enzimlerden yeni bir tablo oluşturulmuştur (Bkz.:Tablo 1.1). Tabloda kovalent bağlı FMN ve FAD içeren 51 tane flovoenzim bulunmaktadır. Bunlardan 5 tanesi kovalent bağlı FMN iken 46 tanesi FAD'tir. Kovalent flavin bağlantıları (motifleri) farklı tipte ve sayıdadırlar. Bunlar; 6-(Cys)-FMN (2 tane), 8 α -(Asp)-FAD (1tane), 8 α -(Cys)-FAD (6 tane), 8 α -(N1-His)-FAD (13 tane), 8 α -(N1-His, 6-Cys)-FAD (9 tane), 8 α -(N1-His, 6-Cys)-FMN (1 tane), 8 α -(N3-His)-FAD (15 tane), 8 α -(N3-His)-FMN (1 tane), 8 α -(O-Tyr)-FAD (3 tane), Ribitilfosfat-(O-Thr)-FMN (1 tane) şeklindedir. FAD çoğunlukla N1 ve N3 histine 8 α -pozisyonundan bağlanmıştır. İzallaksazin halka sistemine 8 α -(N1-His, 6-Cys) pozisyonundan bikovalent olarak bağlanan 10 enzim bulunmaktadır. Ayrıca tabloda dikkat çeken bir diğer önemli durum ise Tyr, His ve Cys 8 α -metil grubundan FMN veya FAD'a bağlanırken, flavinin C6 pozisyonu Cys ve FMN için kısıtlanmıştır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Flovoenzimde Bulunan 5 Farklı Aminoasitin Bağlanma Pozisyonu (Mewies, vd., 1998)

Literatürde kovalent flavoproteinlerin tanımlanması için birçok yöntem vardır. Bunlar; asit çökeltme ile polipeptitin proteolitik parçalanması sonucu Ph ile tanımla, elektroforezleme işlemi ve ardından flavin tipi floresan gözlemi, basit kimyasal analiz/sentez ve UV-görünür/floresan spektroskopik yöntemlerden NMR tekniklerine kadar çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır (Mewies vd., 1998).

1.2.2.1.1. Flavin Oksidazlar ve Redüktazlar

Oksidazlar yapısal flavoprotein aileleri arasında çok yaygındır. Bu durum doğanın indirgenmiş flavin kofaktörünün, moleküler oksijeni yükseltgen madde olarak kullanmanın birçok yolunu bulduğunu göstermektedir. Farklı ailelerden gelen oksidazların benzer aktiviteleri olabilir. Sekans verileri, yapı verileri ve genom çalışmaları ile yeni oksidazları keşfetmek mümkün hale gelmiştir. Son on yılda bir dizi yeni flavoprotein oksidaz elde etmede başarılı olunmuştur.

Flavin redüktaz ise bir substratın indirgenmesini katalize eden bir enzim çeşididir. Serbest flavinlere hidrojen bağı yoluyla bağlanan ve onların indirgenmiş forma dönüşmelerini katalize eden çeşitli flavin redüktazlar (FRE (NAD(P)H: flavin oxidoreductase) mevcuttur. Flavin redüktazlar flavinleri substrat olarak kullanırlar (Niviere vd., 1999). Flavin redüktaz iki alt birimden oluşan dimer yapıdadırlar. Herbir alt birim benzer yapıdadır. Flavin redüktaz P ve FRP Tanner ve arkadaşları tarafından incelenmiş ve her birinin bir sandviç (sandwich) ve gezinme (excursion) alanı içeren iki alt birimden oluştuğunu tespit etmişlerdir. Her bir alt birimin gezinme alanı diğer alt birimin sandviç alanını birbirine bağlamak için uzanır ve flavin redüktazda büyük bir hidrofobik çekirdek oluşturur (Tanner vd., 1996). Bu nedenle NADP^+ salınır ve flavin substratı enzime bağlanır. Bu aşamada hidrür flavin üzerindeki azota yönelir ve başka bir protonasyonun oluşmasına izin verir. Daha sonra indirgenmiş flavin ikinci ürün olarak flavin redüktazdan salınır. Bu şekilde, flavinin azaltılması önce NADPH'ye veya bazı durumlarda NADH'ye bağlanan flavin redüktaza bağlıdır (Imagawa vd., 2011). Flavin redüktazlar, hayvanlar ve bakteriler de dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Işık organizmalarında ise flavin redüktaz lusiferaz işleminde önemlidir. Burada bakteri indirgenmiş flavin mononükleotidini oksitlenmiş FMN'ye okside eder ve ışığı üretmek için serbest füzyon yoluyla aktarır (Imagawa vd., 2011). İnsanlarda ise flavin redüktazlar genellikle eritrositler ve karaciğer methemoglobinde oluşan NADPH'ya bağlı flavin mononükleotitin indirgenmesini katalize ederler (Shalloe vd., 1996). Bunların haricinde flavin redüktazların hidrojen peroksit üretiminde rol oynadığı da ileri sürülmüştür. Bu üretim, H_2O_2 vücuda homeostatik mikrobiyota sahip olmaya yardımcı olduğundan biyolojik olarak yararlıdır.

Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)

Hücrelerde anabolik tepkimelerde (yağ asidi ve nükleik asit sentezi gibi) indirgeyici olarak kullanılır. Flavin redüktazlar genellikle benzer katalitik mekanizmaları ve yapıları

nedeniyle ferrik redüktazlar ile karıştırılırlar. Enzimolojide ise flavin redüktaz (EC 1.5.1.30) Şekil 3.5'deki kimyasal reaksiyonunu katalizler.



Şekil 1.5. Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Kimyasal Reaksiyonu

Bu enzimin iki ürünü indirgenmiş riboflavin ve NADP^+ iken substratı riboflavin, NADPH ve H^+ 'dir. Bu enzim oksidoredüktaz ailesine (özellikle de alıcı olarak NAD^+ veya NADP^+ ile CH-NH grubu donörlerine etki eden) aittir. Kloroplastlarda NADP fotosentezin ilk tepkimelerinde bir indirgeyici (elektron verici) olarak rol oynar. Fotosentezde ortaya çıkan NADPH'nin indirgeyici gücü, fotosentezin kalvin döngüsündeki biyosentetik tepkimelerde kullanılır. Pentoz fosfat döngüsünün yükseltgenme evresi, hücrelerde NADPH'nin başlıca kaynağıdır. NADPH biyosentetik tepkimelerde ve reaktif oksijen türlerine karşı korunmada gereken indirgeme potansiyelini sağlar. NADPH ayrıca anabolik yollarda, örneğin yağ asidi sentezi, kolesterol sentezi ve yağ asidi uzamasında kullanılır. Aromatik bileşikler, steroidler, alkoller ve bazı ilaçların Sitokrom P450 tarafından hidroksile edilmesi için gereken indirgeme potansiyeli de NADPH tarafından sağlanır.

Glikoz-Metanol-Kolin Oksidaz (GMC)

GMC flavoprotein sınıfının birkaç iyi bilinen oksidazlarını içerir. Bu sınıfın her üyesinin protein sırası, GMC_oxred_N (Pfam00732) olarak adlandırılan korunmuş bir N-terminal FAD bağlanma alanını içerir (Finn vd., 2010). Bu alan, tipik GxGxxG/A sıralı motifini içerir ve FAD'ın ADP kısmının bağı içeren Rossmann kıvrımını göstermektedir. Substrat bağ alanını oluşturan C-terminal bölgesi, daha az korunaklıdır (Kiess vd., 1998). Genelde korunan kalıntı, substrat yükseltgenmesi ve moleküler oksijen ile FAD yeniden yükseltgenmesine yardımcı olan aktif bölge histidinidir. Glikoz Oksidaz üzerindeki mutajenez çalışmaları, histidin protonasyonunun (GO'da His516) dioksijen indirgemesi katalizörü için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Roth ve Klinman, 2003). Yine de bu kuralın istisnaları bulunmuştur. Örneğin, Kolin Oksidazda, histidin fonksiyonu, kolin substrat molekülünün pozitif yüklü amin kısmı tarafından devralınmıştır (Gadda, 2012). Bilinen GMC tipi oksidazlar, birincil ve ikincil alkoller üzerine etki ederek aldehitler veya ketonları oluştururlar. Örneğin, Glikoz Oksidaz (EC 1.1.3.4), Kolesterol Oksidaz (EC 1.1.3.6), Piranoz Oksidaz (EC 1.1.3.10), Metanol Oksidaz (EC 1.1.3.13) ve Aril Alkol Oksidaz (EC 1.1.3.7)'dir (Fan vd., 2004).

Vanilin Alkol Oksidaz (VAO)

Flavoprotein ailesinde ilk başlarda mantar oksidaz olarak isimlendirilse de daha sonra Vanilin Alkol Oksidaz (VAO) (EC 1.1.3.38) adı verilmiştir (Dijkman vd., 2013). GMC-tipi flavoproteinlere benzer şekilde tüm VAO tipi flavoproteinler, proteinin N-terminal yarısında belirgin bir FAD bağ alanı (FAD-binding-4 bölgesi, Pfam01565) içerir. Vanilin Alkol Oksidaz kristali yapısı FAD kofaktörünün histidin yoluyla proteine nasıl kovalent bağlı olduğunu ilk kez ortaya koymuştur. Kovalent flavoproteinlerden yaklaşık % 25'i VAO histidin-FAD içermektedir. FAD kofaktörünün histidine kovalent bağlanması ile kofaktörün redoks potansiyelinin büyük oranda arttığı tespit edilmiştir (Fraaije vd., 1999). Son zamanlarda, birkaç VAO tipi oksidazın bikovalent FAD kofaktörü içerdiği keşfedilmiştir. VAO tipi Kolesterol Oksidaz ve Alditol Oksidaz (EC 1.1.3.41) için FAD'tin dioksijeni yönlendiren spesifik oksijen kanalları tanımlanmıştır (Dijkman vd., 2013).

Sülfhidril Oksidaz

Son on yılda tiyoller üzerinde etkili olan FAD içeren oksidazlar keşfedilmiştir. Sülfhidril Oksidazların en önemli rolü sistein kalıntıları yükeltgenmesiyle proteinlerde disülfid bağları oluşturmalarıdır. İnsan, viral ve maya türlerinde birkaç Sülfhidril Oksidazın kristal yapıları çözülmüştür (Guo vd., 2012). Buna dayanarak Erv-benzeri (Pfam04777) ve Ero-benzeri (Pfam04137) Sülfhidril Oksidazlarolarak iki alt familya tanımlanmıştır. Genel olarak, Sülfhidril Oksidazlar proteinlerin sistein oksidasyonunu doğrudan katalize etmemektedirler ve bu yüzden endüstriyel uygulanabilirlikleri sınırlıdır (Pollard vd., 1998).

Asil-CoA Oksidaz(ACO)

Asil-CoA Oksidaz farklı bir flavoprotein oksidaz ailesinin prototip oksidazını temsil eder. ACO tipi oksidazlar sadece α -heliks N-terminal alanını içerirler (Pfam02771). Bu oksidazlar orta ve C terminal α -alanı arasında bulunan FAD'ti sadece kofaktör olarak kullanırlar. ACO'lar (EC 1.3.3.6) yağ asitlerinin α C- β C oksidasyonunu katalize ederler. Oksidazlar ağırlıklı olarak peroksizomlarda bulunurken mitokondrideki yağ asidi degradasyonu asil-CoA dehidrojenazlar tarafından gerçekleştirilir (Tokuoka vd., 2006).

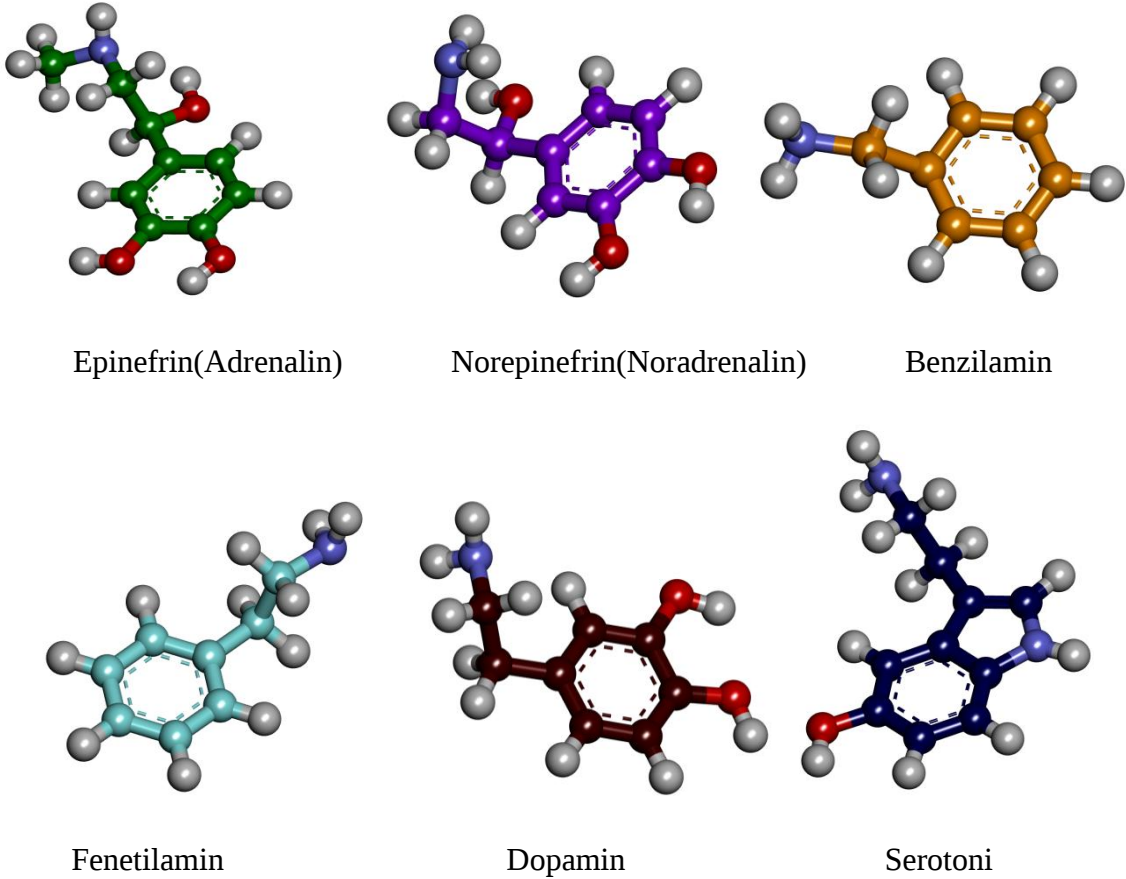
2-Hidroksiasit Oksidaz

Bazı flavoprotein oksidazlar FMN'ti prostetik grubu olarak kullanmaktadır. Bu oksidazların büyük bir kısmı farklı bir yapısal flavoprotein ailesine aittir. Bu oksidaz ailesinin bir çok üyesi aromatik veya alifatik 2-hidroksi asitlerini (EC 1.1.3.5) 2-oksoasidine dönüştürerek yükseltgemektedir (Cunane vd., 2005). Bu oksidaz ailesinin

bilinen örnekleri Glikolat Oksidaz ve L-Laktat Oksidazdır. Bu ailenin birkaç üyesinin yapısı çözülmüştür ve bu yapılar kıvrım ve katalitik olarak önemli bilgiler vermektedir.

Monoamin Oksidaz (MAO)

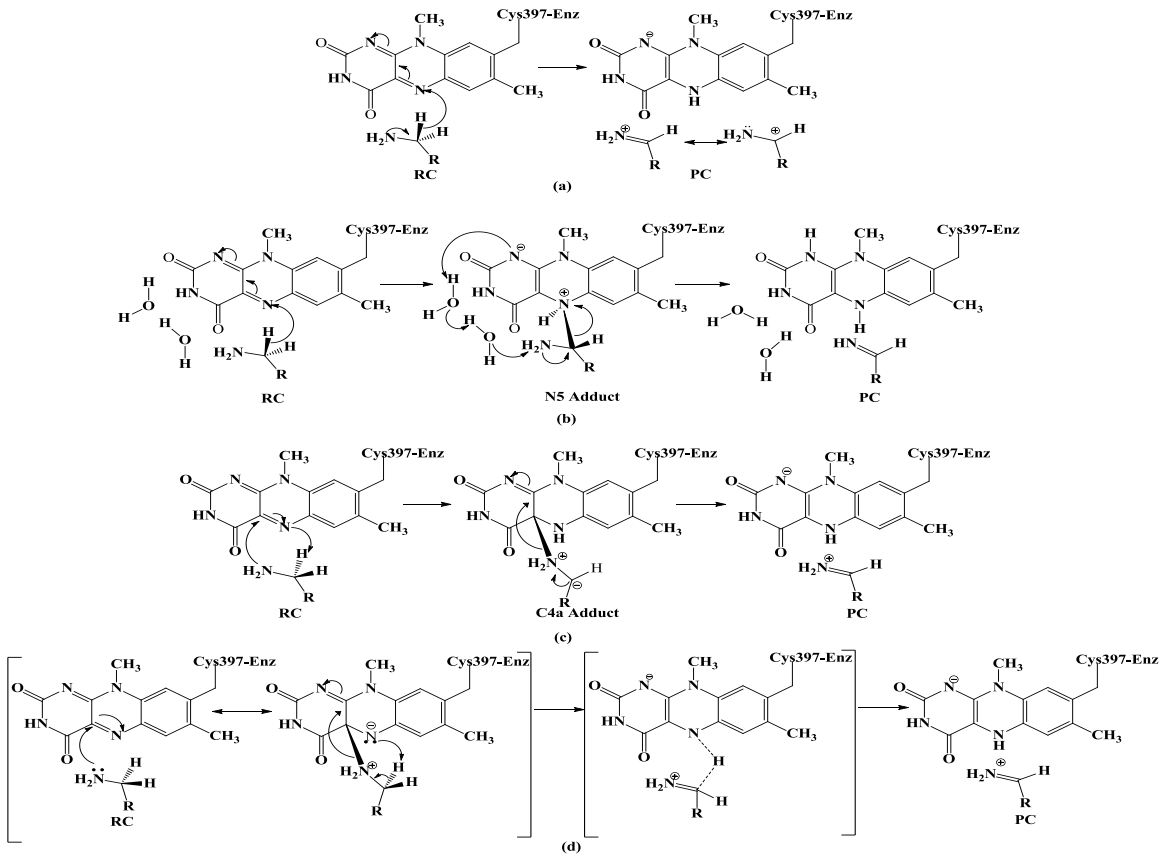
Monoamin Oksidaz (EC-1.4.3.4, MAO) biyolojik aminleri oksitleyen, flavin içeren, mitokondri zarının dışında bulunan enzimdir (Colibus vd., 2005). MAO A ve MAO B olmak üzere iki izoenzimi bulunmaktadır. MAO A karaciğer ve bağırsak çeperlerine yerleşmiştir. İnsan beynindeki MAO'nun %80'i MAO B olmakla birlikte trombositlerde bu oran %98'dir. İki enzim farklı genlerden sentezlenmesine rağmen %72 oranında gen dizilimleri benzerdir (Bach vd., 1998; Edmondson vd., 2004; Binda vd., 2001). MAO A ve MAO B substrat tercihleri, inhibitör özgünlükleri, doku dağılımları, immünolojik özellikleri ve aminoasit dizimleri bakımından farklılık göstermektedirler (Silverman, 1992).



Şekil 1.6. Mao'nun Substratlarının Üç Boyutlu Görüntüleri(Çakır, 2016)

MAO A'nın inhibe edilmesi beyindeki noradrenalin ve serotonin miktarını arttırırken depresyon durumunda bu aminlerin miktarı önemli ölçüde azalmaktadır. MAO B'nin inhibisyonu ise dopamin deaminasyonunu azaltırken Parkinson hastalığında beyindeki dopamin miktarı önemli ölçüde azalmaktadır (Gaál ve Hermech, 1993). Bu iki enzimin

oksidasyon mekanizmalarının aynı olduğu düşünülmektedir. MAO'nun aktif bölgesinde oksidasyon reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlayan FAD koenzimi bulunmaktadır. FAD her iki enzimde 8a pozisyonundan MAO A için Cys406, MAO B için ise Cys397'nin yan grubuna kovalent olarak bağlıdır (Edmondson vd., 2004). MAO mekanizması üzerine ilk hesaplamalı çalışma Erdem ve arkadaşları tarafından 2006 yılında, FAD ve bir seri *p*-süstitüe benzilamin türevleri arasındaki reaksiyon için PM3 ve B3LYP/6-31G(d) metotlarını kullanılarak yapılmıştır. MAO mekanizmalarıyla ilgili literatürde Tek Elektron Transferi (Single Electron Transfer-SET) Mekanizması (Silverman, 1992; Silverman, 1995; Lu vd., 2002) Hidrür Transferi Mekanizması (Ralph vd., 2007; Fitzpatrick, 2004; Fitzpatrick, 2010) ve Polar Nükleofilik Mekanizma (Miller ve Edmondson, 1999; Edmondson vd., 2004) gibi çeşitli oksidasyon mekanizmaları önerilmiştir (Şekil 1.7). Ayrıca MAO mekanizmasının proton transferi ile mi yoksa hidrür transferi ile mi olduğu grubumuzun yüksek lisans çalışması kapsamında araştırılmıştır. Elektron çifti ve protonun aynı yönde hareket etmesiyle birlikte iki mekanizmanın birlikte olabileceği hibrit bir mekanizma işaret edilmiştir (Çakır, 2016).



Şekil 1.7. (a) Tek Basamaklı Hidrür Transferi, (b) İki Basamaklı Hidrür Transferi, (c) Polar Nükleofilik A Mekanizma, (d) Eşzamansız Tek Basamaklı Polar Nükleofilik Mekanizma

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Yöntem

Tez çalışmasında geometri optimizasyonu ve enerji hesaplamaları için DFT (Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi), M06-2X/6-31 + G(d,p) (Truhlar ve Zhao, 2006) hesapsal yöntemi kullanılmıştır.

2.1.1. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT, Density Functional Theory)

DFT, toplam elektronik enerji ile toplam elektronik yoğunluk arasında ilişkinin bulunduğu düşüncesinden ortaya çıkmış yöntemdir. N sayıda elektron içeren bir sistemi komplike bir dalga fonksiyonu $\Psi(r_1, r_2 \dots r_N)$ ile ifade etmek yerine çok daha basit bir biçimde elektron yoğunluğu ile $\rho(r)$ ile ifade edilmesini önermektedir (Parr ve Yang, 1989). Bu teorinin temeli Thomas ve Fermi'nin 1920'lerde yaptıkları çalışmalara dayanır. 1980'lerin sonlarına doğru ve 1990'larda ilgi görmeye başlamış ve önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu yöntem HF yönteminin eksiklerini gidermeye çalışır ve ab initio yönteminde kullanılan enerji ifadesinin hesaplamaları zorlaştırmayacak şekilde biraz değiştirir. HF yaklaşımında çok elektronlu dalga fonksiyonunda Slater determinantı tek elektronlu N tane dalga fonksiyonunu kapsayacak şekilde kurulur (N=moleküldeki elektron sayısı) ve N elektronlu dalga fonksiyonu hesaplanır. DFT yaklaşımında ise tek elektronlu dalga fonksiyonları kullanılır ve toplam elektronik enerji ve elektronik yoğunluk dağılımı hesaplanmaya çalışılır. DFT parçacıklar ve elektronlar arasındaki etkileşme ve korelasyon etkilerini de içeren pratik ve kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemin etkinliğini gösteren temel özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir (Parr ve Yang, 1989).

Tablo 2.1. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisini Diğer Teorilerden Ayıran Temel Özellikler

Özellik	Açıklama
Hesaplamalarına elektron korelasyonunu dahil etmiş olması	Elektron korelasyonu, bir moleküler sistemde, elektronların birbirlerinin hareketinden etkilenecek birbirlerinden uzak durma eğiliminde olmaları gerçeğidir.

Özellik	Açıklama
HF yöntemleri ile hemen hemen aynı sürede ve elektron korelasyonunu da hesaba katan sonuçlar vermesi	Bu özelliği ile geleneksel ab initio yöntemlerinden daha üstündür.
Üç boyutlu elektronik yoğunluk dağılımının, 3N-boyutlu dalga fonksiyonuna göre daha kolay ele alınabilir olması	Böylece MP2 (Moller Plesset 2) gibi ileri HF (post HF) yöntemlerinden çok daha hızlı ancak benzer sonuçlar alınabilmektedir.
Çok sayıda atom içeren ve periyodik olmayan sistemler için de ele alınabilir olması	Diğer teorilerde sadece sonsuz boyutlu periyodik sistemler ele alınabilmektedir.
Sistemin temel halinin özelliklerini belirleyen en önemli karakteristikler, temel halin elektron yoğunluğu ve E toplam enerjisi olması	Böylece, yaklaşımda sistemin diğer bütün temel durum özellikleri, Hartree-Fock teorisinde kullanılan tek elektron dalga fonksiyonunun yerine temel durum elektron yoğunluğunun fonksiyoneli olarak ifade edilir. Diğer bir deyişle, Hamiltonyen'i $\rho(r)$ belirlediğine göre Hamiltonyen'den türetilen her özelliği de $\rho(r)$ belirlemiş olur.

DFT metotları elektronik enerjiyi birkaç terimin toplamı olarak tanımlayan denklemler içermektedir.

$$\text{Denklem 1: } E = E_T + E_V + E_J + E_{XC}$$

$$\text{Denklem 2: } E_{DFT} = \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} H_{\mu\nu} + \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} P_{\lambda\sigma} J_{\mu\nu\lambda\sigma} + E_X(\rho) + E_C(\rho) + V$$

$$\text{Denklem 3: } E_{XC}(\rho) = E_X(\rho) + E_C(\rho)$$

E_T : Elektronların hareketinden ortaya çıkan kinetik enerjiye ait terim

EV : Çekirdek-elektron çekimlerine ve çekirdek çiftlerinin itmesine ait potansiyel enerjiyi tanımlayan terimleri içerir.

EJ : Elektron-elektron itmesine ait terim

EXC : Değiş-tokuş korelasyon enerjisi, geriye kalan diğer elektron-elektron etkileşimlerini kapsar. EXC terimi genellikle “değiş-tokuş” ve “korelasyon” olarak iki kısma ayrılır. Bu fonksiyonlara “density functionals” yoğunluk fonksiyonelleri denir.

EX(ρ): Değiş-tokuş terimi “Exchange term”

EC(ρ): Korelasyon terimi “Correlation term”

Denklem 3’deki her terim yine birer fonksiyoneldir. $E_X(\rho)$ değiş-tokuş fonksiyoneli, $E_C(\rho)$ ise korelasyon fonksiyonelidir. Bu fonksiyoneller lokal ve gradient-düzeltilmiş olarak iki çeşittir. Lokal fonksiyoneller, yalnızca elektron yoğunluğuna, ρ , bağlıdırlar. Gradient-düzeltilmiş fonksiyoneller ise hem ρ , hem de onun gradientine, $\nabla\rho$, bağımlıdırlar. Non-lokal fonksiyoneller olarak da adlandırılırlar.

Belirtildiği üzere bir değişim fonksiyoneli korelasyon fonksiyoneli ile çiftleştiren yaklaşımlar saf DFT yöntemleridir. Örneğin, çok yaygın bilinen BLYP fonksiyoneli, Becke’nin gradient-düzeltilmiş değişim fonksiyoneli, Lee, Yang ve Parr’ın gradient-düzeltilmiş korelasyon fonksiyoneli ile çiftleştirmiştir (Erkişi, 2007; Gürünlü, 2008).

2.2. Kullanılan Materyaller

Bu tez çalışmasındaki model yapıların oluşturulması ve optimizasyonları için Gaussian 09 (Frisch vd., 2009), görüntülenmesi yapılarak yapı benzerliklerinin karşılaştırılmasında ise GaussView 05 (Dennington vd., 2009) ve Pymol programından yararlanılmıştır. Enzim etkileşimlerin daha net anlaşılması ve güvenilir sonuçlar elde etmek için Discover Studio 2016 programından ve kimyasal reaksiyonların çizimlerinde Chem Draw Professional 16 programından yararlanılmıştır. Ayrıca enzim karşılaştırmalarında kullanılmak üzere PDB’de kristal yapısı bulunan flavoenzimler kullanılmıştır.

2.2.1. Kullanılan Model Yapıların Elde Edilmesi

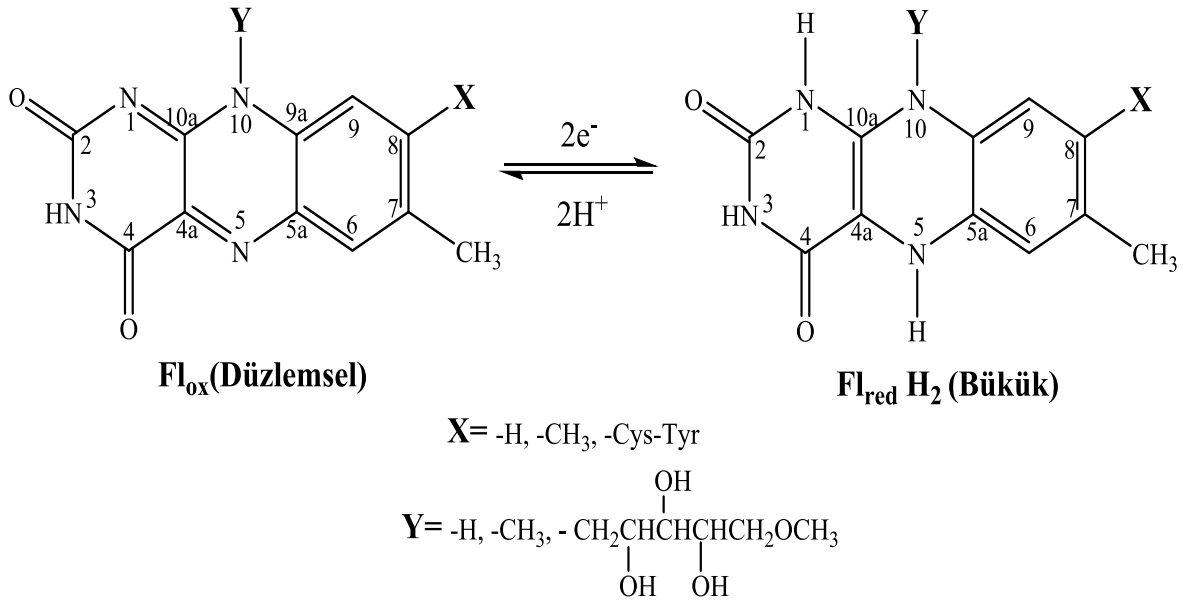
Bu tez çalışmasında kovalent bağlı FAD yapısı 2XFN (Bonivento vd., 2010) pdb kodlu 1.6 Å çözünürlüğe sahip MAO B X-ışını kristalografik verileri kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılacak gerekli kısım kristal yapıdan Pymol programı yardımıyla alınmıştır. Daha sonra FAD halkasının Y (N10) ve X (C8) (Şekil 2.1.) pozisyonunlarına farklı süstitüentler eklenerek yükseltgenmiş formda dokuz ayrı model oluşturulmuştur. Her bir yapı DFT

(Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi), M06-2X/6-31+G (d,p) (Truhlar ve Zhao, 2006) hesapsal yöntemi ile optimize edilmiştir. Optimize edilmiş yükseltgenmiş formlarda N1 ve N5 pozisyonlarına hidrojen eklenerek indirgenmiş formda dokuz ayrı model daha oluşturulmuş ve oluşturulan yapılar optimize edilmiştir. Optimize olan yapıların FAD halkası bükülme açısı ölçülmüştür. H atomu ve H₂'nin optimizasyonları yapılmıştır.

2.2.2. FAD İndirgenme Eğilimlerinin Hesaplanması

Her süstituent için FAD indirgenme eğilimleri 2 farklı yaklaşım kullanılarak hesaplanmıştır.

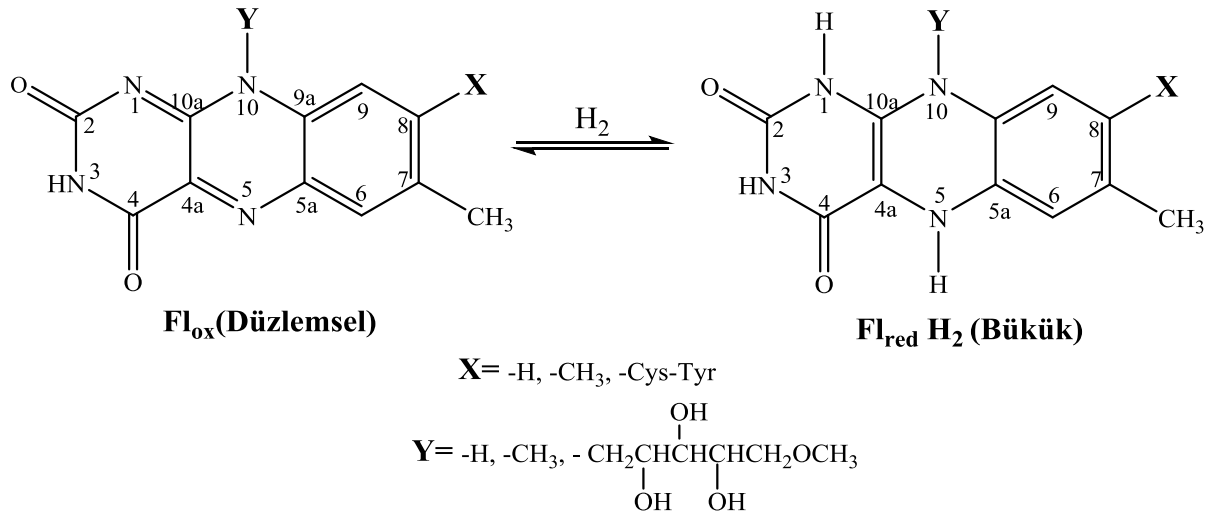
1) 2H⁺ ve 2e⁻ ile indirgenme enerjisi: Şekil 2.1'de gösterilen indirgenme tepkimesi düşünülerek ve elektronun enerjisi hesaplanarak ΔH, ΔG indirgenme enerjileri hesaplanmıştır. İndirgenmiş flavinin enerjisinden yükseltgenmiş flavinin enerjisi ve 2 atomik hidrojen atomunun enerjileri toplamları çıkartılarak hartree birimi kcal/mol'e çevrilmiştir. Bulunan değerden 2 mol elektronun enerjisi çıkartılarak ΔH, ΔG indirgenme enerjileri hesaplanmıştır [Fl_{red} -(Fl_{ox}+2e⁻+2H⁺)(kcal/mol)] (Bkz.: Tablo 3.3). Literatürde hidrojenin 1s elektronun enerjisi -13,6 ev'tur (Hayward, 2002) ve -13,6 ev= -313,623 kcal/mol'dur. Hesaplamalarda 1 elektronun enerjisi -313,623 olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Flavinin İndirgenme Reaksiyonu (2H⁺ ve 2e⁻ ile İndirgenme Enerjisi)

2) Hidrojenlenme enerjisi: FAD + H₂ → FADH₂ tepkimesi düşünülerek, indirgenmiş flavinin enerjisinden yükseltgenmiş flavin ve hidrojen gazının enerji toplamları çıkartılıp ΔH ve ΔG hidrojenlenme enerjileri hesaplanmıştır (Tablo 3.2). Hesaplamalarda

birimlerden kaynaklanabilecek hata paylarının en aza indirilebilmesi için hesaplamalar öncelikle hartree birimiyle yapılmış ve son aşamada kcal/mol'e çevrilmiştir.



Şekil 2.2. Flavinin İndirgenme Reaksiyonu (Hidrojenlenme Enerjisi)

Bu bağlamda kullanılan model yapılar aşağıda listelenmiştir.

- ~ MODEL I_{ox} = Fl_{ox} + Y(Triol) + X(Cys397-Tyr398)
- ~ MODEL I_{red} = Fl_{red} + Y(Triol) + X(Cys397-Tyr398)
- ~ MODEL II_{ox} = Fl_{ox} + Y(CH₃) + X(Cys397-Tyr398)
- ~ MODEL II_{red} = Fl_{red} + Y(CH₃) + X(Cys397-Tyr398)
- ~ MODEL III_{ox} = Fl_{ox} + Y(H) + X(Cys397-Tyr398)
- ~ MODEL III_{red} = Fl_{red} + Y(H) + X(Cys397-Tyr398)
- ~ MODEL IV_{ox} = Fl_{ox} + Y(Triol) + X(CH₃)
- ~ MODEL IV_{red} = Fl_{red} + Y(Triol) + X(CH₃)
- ~ MODEL V_{ox} = Fl_{ox} + Y(CH₃) + X(CH₃)
- ~ MODEL V_{red} = Fl_{red} + Y(CH₃) + X(CH₃)
- ~ MODEL VI_{ox} = Fl_{ox} + Y(H) + X(CH₃)
- ~ MODEL VI_{red} = Fl_{red} + Y(H) + X(CH₃)
- ~ MODEL VII_{ox} = Fl_{ox} + Y(Triol) + X(H)
- ~ MODEL VII_{red} = Fl_{red} + Y(Triol) + X(H)
- ~ MODEL VIII_{ox} = Fl_{ox} + Y(CH₃) + X(H)
- ~ MODEL VIII_{red} = Fl_{red} + Y(CH₃) + X(H)
- ~ MODEL IX_{ox} = Fl_{ox} + Y(H) + X(H)
- ~ MODEL IX_{red} = Fl_{red} + Y(H) + X(H)

Ayrıca literatür taraması kapsamında genel bilgiler bölümünde kovalent bağlı flavin içeren enzimler listelenmiştir (Bkz.: Tablo 1.1). Bu enzimlerden Model I (X ve Y pozisyonuna bağlanan sübstituentleri 8a-Cys'den kovalent bağlı enzimlere benzer olan model) ile karşılaştırmak üzere C8a-Cys'den kovalent bağlı olan enzimler seçilmiştir. Seçilen enzimler PDB kristal kodu ve en iyi çözünürlük değerlerine göre listelenmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Karşılaştırmada Kullanılan Kovalent Bağlı Enzimler (8a-Cys)

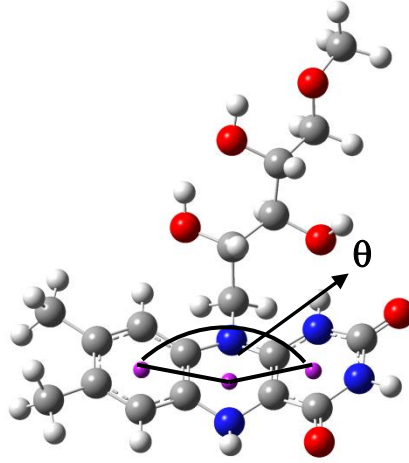
ENZİM	KRİSTAL	ÇÖZÜNÜRLÜK	KAYNAKÇA
Monoamin Oksidaz A (MAO A)	2Z5X	2.20	(Son vd., 2008), DOI: 10.1073/pnas.0710626105
Monoamin Oksidaz B (MAO B)	2V5Z	1.60	(Binda vd., 2007) DOI: 10.1021/jm070677y
Yaygın Olmayan Amino Asit Oksidaz (NikD)	20LN	1.15	(Carrell vd., 2007), DOI: 10.1016/j.str.2007.06.010
Flavo Sitokrom C Sülfür Dehidrojenaz	1FCD	2.53	(Chen vd., 1994) PubMed: 7939681
Monomerik SarkozinOksidaz (MSOX)	2GF3	1.30	(Chen vd., Released: 2007-02-06) Yayınlanacak
Amadoriase, Fruktozil Amino Asit Oksidaz (FAOX)	3DJE	1.60	(Collard vd., Released: 2008-07-22) Yayınlanacak

Bunlara ek olarak kovalent bağlı olmayan Model IV (X ve Y pozisyonuna bağlanan sübstituentleri kovalent bağlı olmayan enzimlerle benzer model) ile karşılaştırma yapmak üzere 2011 yılında Macheroux ve arkadaşlarının flavoproteinlerle ilgili yaptıkları kapsamlı çalışmada oluşturdukları S1 tablosundan yararlanılmıştır. Bu tablodan yaygın kullanılan, flavin içeren ancak kovalent bağlı olmayan enzimler ve PDB'tan yaygın kullanılan flavin içeren ancak kovalent bağlı olmayan enzimler seçilmiştir. Bu enzimler PDB kristal kodu ve en iyi çözünürlük değerine göre listelenmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Karşılaştırmada Kullanılan Kovalent Bağlı Olmayan Enzimler

ENZİM	KRİSTAL	ÇÖZÜNÜRLÜK	KAYNAKÇA
Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz	4QOG	1.40	(Serriere vd., 2015) DOI: Yayınlanmadı
	4U7H	1.48	(Leung ve Shilton, 2015) DOI: 10.1021/bi500959t
	4FGL	1.20	(Leung ve Shilton, 2013) DOI:10.1074/jbc.M113.457002
Lizin Spesifik Demetilaz 1 (LSD1)	2DW4	2.30	(Mimasu vd., 2008) DOI:10.1016/j.bbrc.2007.11.066
Glutasyon Redüktaz (GR)	3DK9	0.95	(Berkholz vd., 2008) DOI: 10.1016/j.jmb.2008.06.083
Glutasyon Oksidaz	2F6C	1.84	(Bannvart vd.,2006) DOI:10.1021/bi052465d
D-Amino-Asit Oksidaz (DAAO)	3ZNN	1.90	(Hopkins vd.,2013) DOI:10.1021/jm4002583
L-Amino AsitOksidaz (LAAO)	4FEG	1.09	(Meyer vd.,2012) DOI:10.1073/pnas.1201280109
Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat NAD(P)H Dehidrojenaz	1D4A	1.70	(Faig vd., 2000) DOI:10.1073/pnas.050585797
Sülfhidril Oksidaz	4LDK	2.04	(Dong vd.; 2014) DOI: Yayınlanmadı
Aldehid Oksidaz	2E1Q	2.60	(Yamaguchi vd.; 2007) DOI: 10.1093/jb/mvm053
Nitrik-OksitSintaz (NOS)	1F20	1.90	(Zhang vd.; 2001) DOI: 10.1074/jbc.M105503200
Nitrik OksitDioksigenaz (NOD)	4EH1	2.2	(Kim vd.; 2012) DOI: Yayınlanmadı
Katekolamin Oksidaz (Renalaz)	2ZCD	1.66	(Hoag vd.; 2015)DOI:10.1021/acs.biochem.5b0451

Model yapıların ve enzimlerin FAD halka bükülme açısı Gaussview 05 programı yardımıyla dummy atom kullanılarak belirlenmiş (Şekil 2.2) ve aktif bölgeleri model yapılarımızla karşılaştırılmıştır.



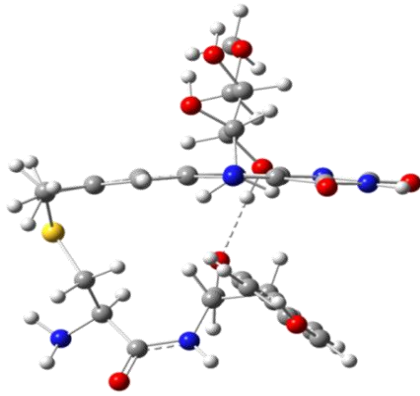
Şekil 2.2. Model Yapıların ve Enzimlerin FAD Halkası Bükülme Açısı(θ)

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Optimizasyon Sonucunda Oluşan Yapılar ve Büküklük Dereceleri

3.1.1. Model I ile Yapılan Optimizasyon

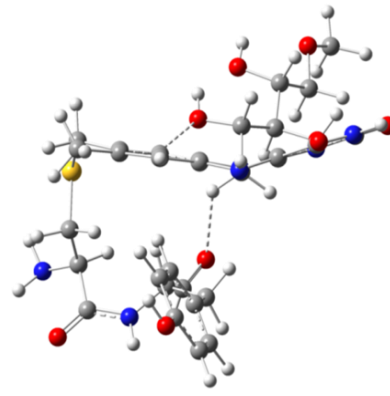
FAD halkasının Y (N10) pozisyonuna triol, X (C8) pozisyonuna ise Cys397-Tyr398 eklenerek Model I_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Optimize edilen yapının halka bükülme açısı 176° bulunmuştur. N1 ile N10'a bağlı triolün hidrojeni arasında ve C9'a bağlı hidrojen ile N10'a bağlı triolün oksijeni arasındaki etkileşimler sonucunda Model I_{ox}'un yükseltgenmiş formu düzlemsellikten 4° sapmıştır (Şekil 3.1.a). Optimize edilmiş Model I_{ox}'a hidrojenler eklenerek indirgenmiş form olan Model I_{red} oluşturulmuştur. N1'in hidrojeninin Y pozisyonuna bağlı triol ile hidrojen bağı yapması ve aynı zamanda triolün Cys-Tyr ile yaptığı etkileşimler sonucunda indirgenmiş formun halka bükülme açısı 156° bulunmuştur (Şekil 3.1.b).



Şekil 3.1.a. Model I_{ox}

(Fl_{ox}, X=Cys-Tyr, Y=Triol)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 176°



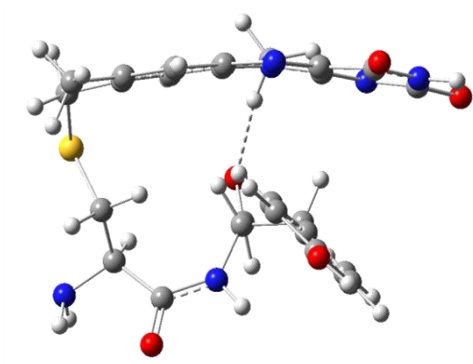
Şekil 3.1.b. Model I_{red}

(Fl_{red} H₂, X=Cys-Tyr, Y=Triol)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 156°

3.1.2. Model II ile Yapılan Optimizasyon

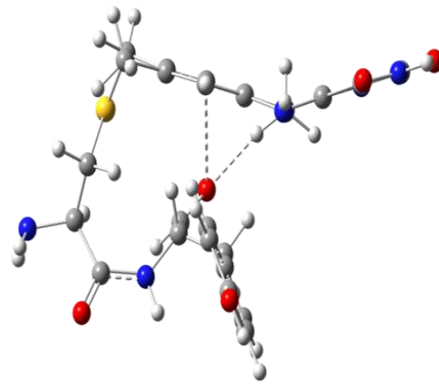
FAD halkasının Y pozisyonuna metil, X pozisyonuna ise Cys397-Tyr398 eklenerek Model II_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. N1 ile X pozisyonuna bağlı Cys-Tyr grubu arasındaki etkileşimler sonucunda halka bükülme açısı 170° bulunmuştur (Şekil 3.2.a). İndirgenmiş formda mevcut etkileşimlerin etkisinin artması sonucu halka bükülme açısı artmış ve halka bükükülme açısı 151° bulunmuştur (Şekil 3.2.b).



Şekil 3.2.a. Model II_{ox}

(Fl_{ox}, X=Cys-Tyr, Y= CH₃)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 170°



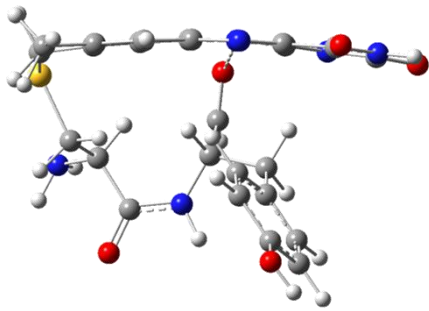
Şekil 3.2.b. Model II_{red}

(Fl_{red} H₂, X=Cys-Tyr, Y=CH₃)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 151°

3.1.3. Model III ile Yapılan Optimizasyon

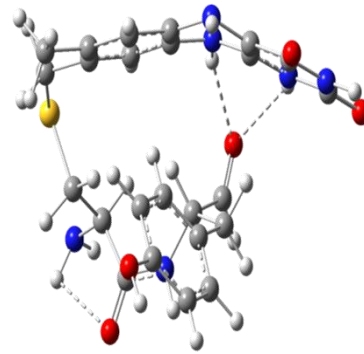
FAD halkasının Y pozisyonuna hidrojen, X pozisyonuna ise Cys397-Tyr398 eklenerek Model III_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Optimize edilen yapının halka bükülme açısı 177° bulunmuştur (Şekil 3.3.a). Model III_{red}'in Y pozisyonuna bağlı hidrojen ve N1 hidrojeninin X pozisyonuna bağlı sübstitüentin oksijeni ile yaptığı güçlü hidrojen bağları sonucunda halka diğer modellerin aksine N5-N10 ekseninin tersi yönde bükülme eğilimi göstermiştir ve halka bükülme açısı 154° bulunmuştur (Şekil 3.3.b).



Şekil 3.3.a. Model III_{ox}

(Fl_{ox}, X=Cys-Tyr, Y= H)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 177°



Şekil 3.3.b. Model III_{red}

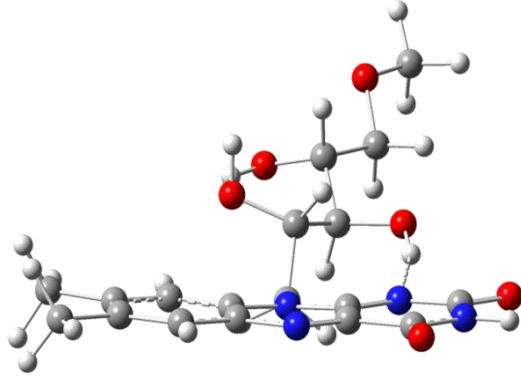
(Fl_{red} H₂, X=Cys-Tyr, Y=H)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 154°

3.1.4. Model IV ile Yapılan Optimizasyon

FAD halkasının Y pozisyonuna triol, X pozisyonuna ise metil eklenerek Model IV_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Yükseltgenmiş formun halka bükülme açısı halka konjugasyonu ve elektronik etkileşimler nedeniyle 176° bulunmuştur (Şekil 3.4.a).

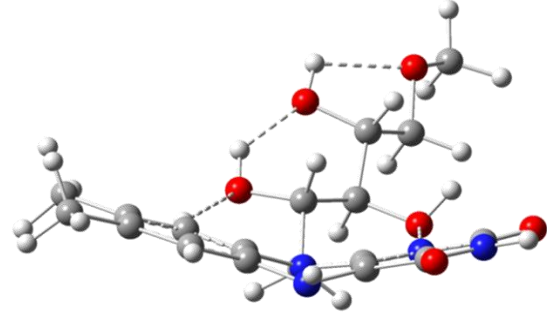
Optimize edilmiş Model IV_{ox}'a hidrojenler eklenerek indirgenmiş form olan Model IV_{red} oluşturulmuştur. Model IV_{red} de N1'e bağlı olan hidrojen ile triol grubu arasındaki hidrojen bağı mesafesinin yükseltgenmiş haline göre daha kısa ve C9'a bağlı hidrojen arasında oluşan etkileşim daha güçlüdür. Bu güçlü hidrojen bağı ve etkileşimler konjugasyona baskın gelmiş ve halkanın N5-N10 ekseninde 155° bükülme olmuştur (Şekil 3.4.b).



Şekil 3.4.a. Model IV_{ox}

(Fl_{ox}, X= CH₃, Y=Triol)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 176°



Şekil 3.4.b. Model IV_{red}

(Fl_{red} H₂, X= CH₃, Y=Triol)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 155°

3.1.5. Model V ile Yapılan Optimizasyon

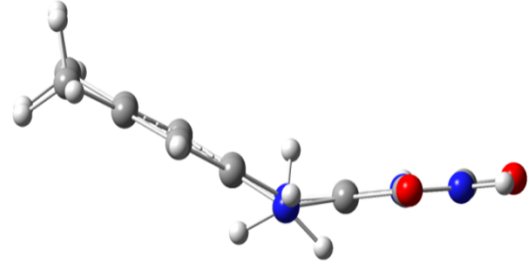
FAD halkasının Y ve X pozisyonuna metil eklenerek Model V_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Bu yapı (X=CH₃, Y=CH₃) hakkında literatürde bazı hesapsal ve deneysel çalışmalar mevcuttur. Yapılan X-ışını çalışmalarında indirgenmiş flavinin kelebek formda olduğu vurgulanmıştır (Norrestam ve Von Glehn, 1972). Flavinde büküklükten düzlemselliğe dönüşme bariyeri düşük olduğundan bu hızlı dengeden dolayı bazı NMR çalışmalarında indirgenmiş flavinin bükük olduğu ayırt edilemediği bu nedenle düzlemsel olduğu savunulmaktadır. Yapılan hesapsal çalışmalarda ise yükseltgenmiş formun düzlemsel, indirgenmiş formun ise bükük olduğu savunulmaktadır (Zheng ve Ornstein, 1996). Çalışmamızda literatürü destekler nitelikte Model V_{ox}'un düzlemsel (Şekil 3.5.a) Model V_{red}'ün ise bükük olduğu bulunmuştur. Model V_{ox}'da halka konjugasyon etkisi ve X, Y konumlarına küçük grupların bağlı olmasından dolayı düzlemsellik gözlenmiştir. Model V_{red}'in halka bükülme açısı 153° bulunmuştur (Şekil 3.5.b) ki bu da literatürde Rizzo'nun yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir.



Şekil 3.5.a. Model V_{ox}

(Fl_{ox}, X= CH₃, Y= CH₃)

FAD Halkası Bükülme Açısı: Düzlemsel



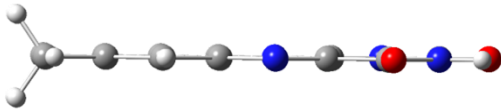
Şekil 3.5.b. Model V_{red}

(Fl_{red} H₂, X= CH₃, Y= CH₃)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 153°

3.1.6. Model VI ile Yapılan Optimizasyon

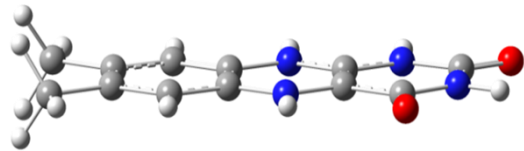
FAD halkasının Y pozisyonuna hidrojen ve X pozisyonuna metil eklenerek Model VI_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir (Şekil 3.6.a). Optimize edilmiş Model VI_{ox}'a hidrojenler eklenerek indirgenmiş form olan Model VI_{red} oluşturulmuştur ve optimize edilmiştir (Şekil 3.6.b). Flavinin indirgenmiş formunun bükük ya da kelebek şeklinde olduğu görüşünün aksine Model VI'nın indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının düzlemsel olduğu gözlenmiştir. İndirgenmiş formun düzlemsel olması süstitüentin halkanın bükülme açısı üzerine etkisini göstermektedir.



Şekil 3.6.a. Model VI_{ox}

(Fl_{ox}, X= CH₃, Y= H)

FAD Halkası Bükülme Açısı: Düzlemsel



Şekil 3.6.b. Model VI_{red}

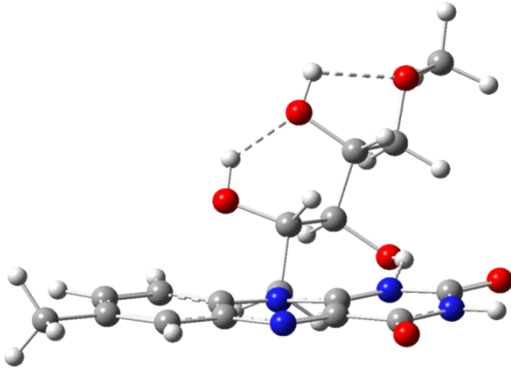
(Fl_{red} H₂, X= CH₃, Y= H)

FAD Halkası Bükülme Açısı: Düzlemsel

3.1.7. Model VII ile Yapılan Optimizasyon

FAD halkasının Y pozisyonuna triol, X pozisyonuna ise hidrojen eklenerek Model VII_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Optimize edilen yapının halka bükülme açısı 174° bulunmuştur (Şekil 3.7.a). Optimize edilmiş Model VII_{ox}'a hidrojenler eklenerek indirgenmiş form olan Model VII_{red} oluşturulmuştur. Model VII_{red}'de triolün kendi oksijen

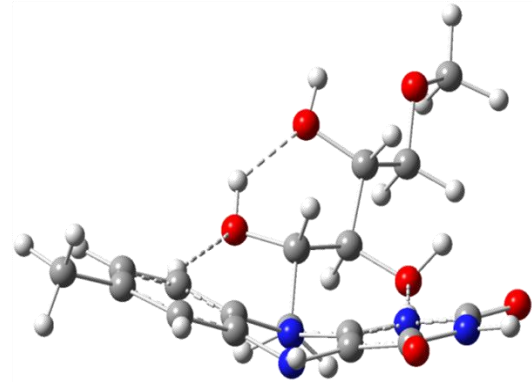
ve hidrojeni arasındaki hidrojen bağı ve triolün C9 ile N1'e bağlı hidrojenlerle yapmış olduğu hidrojen bağları halka bükülme açısı üzerinde etkili olmuştur. Optimizasyon sonucunda halka bükülme açısı 158° bulunmuştur (Şekil 3.7.b).



Şekil 3.7.a. Model VII_{ox}

(Fl_{ox}, X=H, Y=Triol)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 174°



Şekil 3.7.b. Model VII_{red}

(Fl_{red} H₂, X=H, Y=Triol)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 158°

3.1.8. Model VIII ile Yapılan Optimizasyon

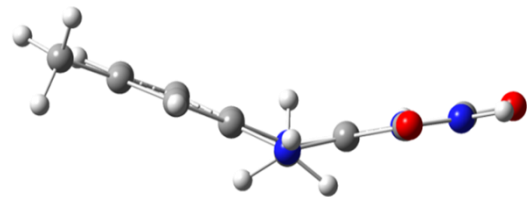
FAD halkasının Y pozisyonuna metil, X pozisyonuna ise hidrojen eklenerek Model VIII_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Yapının düzlemsel olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8.a). Optimize edilmiş Model VIII_{ox}'a hidrojenler eklenerek indirgenmiş form olan Model VIII_{red} oluşturulmuştur. Optimizasyon sonucunda halka bükülme açısı 151° bulunmuştur (Şekil 3.8.b). Model VIII_{red}'de X pozisyonuna bağlı hidrojen, Model V_{red}'de ise X pozisyonuna bağlı metil olması (küçük sübtütient olması) benzer bükülme eğilimi göstermelerini sağlamıştır.



Şekil 3.8.a. Model VIII_{ox}

(Fl_{ox}, X=H, Y=CH₃)

FAD Halkası Bükülme Açısı: Düzlemsel



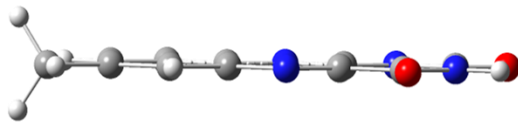
Şekil 3.8.b. Model VIII_{red}

(Fl_{red} H₂, X=H, Y=CH₃)

FAD Halkası Bükülme Açısı: 151°

3.1.9. Model IX ile Yapılan Optimizasyon

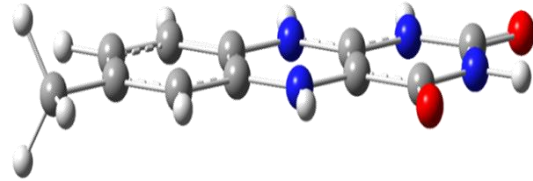
FAD halkasının Y pozisyonuna ve X pozisyonuna hidrojen eklenerek Model IX_{ox} oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Yapının düzlemsel olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9.a). Optimize edilmiş Model IX_{ox}'a hidrojenler eklenerek indirgenmiş form olan Model IX_{red} oluşturulmuştur. Optimizasyon sonucunda yapının düzlemsel olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9.b). Eklenen sübstitüentler küçüldükçe halka konjugasyonunun daha etkili olduğu ve indirgenmiş yapıların düzlemsellik eğiliminin genellikle arttığı gözlenmiştir.



Şekil 3.9.a. Model IX_{ox}

(Fl_{ox}, X= H, Y=H)

FAD Halkası Bükülme Açısı: Düzlemsel



Şekil 3.9.b. Model IX_{red}

(Fl_{red} H₂, X= H, Y=H)

FAD Halkası Bükülme Açısı: Düzlemsel

Tablo 3.1. Optimizasyonu Yapılmış Modellerin FAD Halkası Bükülme Açıları

FAD Halkası Bükülme Açıları				
Model	X (C8)	Y (N10)	Model _{ox}	Model _{red}
I	Cys-Tyr	Triol	176°	156°
II	Cys-Tyr	CH ₃	170°	151°
III	Cys-Tyr	H	177°	154°
IV	CH ₃	Triol	176°	155°
V	CH ₃	CH ₃	Düzlemsel	153°
VI	CH ₃	H	Düzlemsel	Düzlemsel
VII	H	Triol	174°	158°
VIII	H	CH ₃	Düzlemsel	156°
IX	H	H	Düzlemsel	Düzlemsel

Tablo 3.1 incelediğinde yükseltgenmiş formların düzlemsel olduğu (Model V_{ox}, VI_{ox}, VIII_{ox}, IX_{ox}) ya da düzlemsellikten en az 3° (Model III_{ox}) en fazla 10° (Model II_{ox}) arasında sapma gösterdiği gözlenmiştir. Yükseltgenmiş modellerde halka konjugasyonunun diğer etkileşimlere baskın geldiği ve bu sebepten de yükseltgenmiş modellerin düzlemsele yakın ya da düzlemsel bulunduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca

yükseltgenmiş modellerin düzlemselliğini Y ve X pozisyonlarına bağlanan küçük süstitüentlerin (CH_3 , H) etkilediği gözlenmiştir. Yükseltgenmiş modeller arasında Model II_{ox} düzlemsellikten en fazla sapma (10°) göstermiştir. Diğer modellerle karşılaştırdığımızda Model III_{ox} hariç gerek halka ile gerekse süstitüentlerin kendi aralarında yaptıkları hidrojen bağ mesafeleri incelendiğinde Model III_{ox} 'da daha kısa ve hidrojen bağları daha güçlüdür. Buna rağmen Model III_{ox} halka bükülmesi 177° iken Model II_{ox} halka bükülmesi 170° 'dir. Bu iki modelin X pozisyonuna bağlı süstitüentleri aynı olduğundan Y pozisyonuna bağlı süstitüentler bu durumu oluşturmaktadır. Model III_{ox} daha güçlü etkileşimler içermesine karşın Y pozisyonuna bağlı süstitüenti halka konjugasyonuna pozitif etki yapmakta ve halka Model II_{ox} 'a oranla düzlemsel olmaktadır. İndirgenmiş model yapılar incelendiğinde Model VI_{red} , IX_{red} hariç diğer modellerin N5-N10 ekseninde en az 24° (Model I_{red}) en fazla 29° (Model VIII_{red}) arasında halka bükülmeleri gözlenmiştir (Tablo 3.1). Model VI_{red} ve IX_{red} 'in Y ve X pozisyonlarında küçük süstitüentler bulunduğundan Y ve X pozisyonları arasında güçlü etkileşimler oluşmamaktadır ve halka düzlemsel olarak bulunmayı tercih etmektedir. Y pozisyonunda ($\text{Y}=\text{Triol}$) aynı grup bulunan Model I, IV, VII incelendiğinde yükseltgenmiş modellerde halka bükülme açıları (176° , 176° , 174°) ve indirgenmiş modellerdeki halka bükülme açıları (156° , 155° , 158°) arasında çok az fark bulunduğu gözlenmiştir. Y pozisyonunda ($\text{Y}=\text{CH}_3$) aynı grup bulunan Model II, V, VIII'i incelediğimizde Model II_{ox} 'un güçlü etkileşimlerden dolayı 10° sapmasına karşın model V ve VII'in yükseltgenmiş formları düzlemseldir. Bu modellerin indirgenmiş formlarının halka bükülme açıları (151° , 153° , 151°) arasında anlamlı derecede benzerlik vardır. Y pozisyonunda ($\text{Y}=\text{H}$) aynı grup bulunan Model III, VI ve IX'u incelendiğinde, Model III_{ox} halka bükülme açısı 177° diğerlerinin ise düzlemsel olduğu görülmüştür. Model III_{red} ise X pozisyonuna bağlı olan Cys-Tyr oksijeninin Y pozisyonuna bağlı hidrojenle ve N1'in hidrojeniyle yaptığı güçlü hidrojen bağlarından dolayı model yapının FAD halkası N5-N10 ekseninde diğer modellere göre ters bükülme göstermiştir. Bu durum X pozisyonuna bağlanan süstitüentin etkisini net bir şekilde göstermiştir (Şekil 3.3.b). Model VI_{red} ve IX_{red} indirgenmiş olmasına rağmen düzlemsel geometriyi tercih etmesi Y pozisyonunun halka konformasyonundaki etkisini göstermiştir. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş modellerde X pozisyonuna bağlanan süstitüentlere oranla Y pozisyonuna bağlanan süstitüentin halka bükülme açısını önemli oranda etkilediği, $\text{Y}=\text{H}$ içeren modellerde indirgenmiş yapıların bile düzlemsel tercih yapabileceği gözlenmiştir.

3.2. ΔH ve ΔG Enerji Değerleri

Tablo 3.2’de hidrojenlenme enerjisi hesaplamalarında hidrojen gazı (moleküler hidrojen) kullanılmıştır ve bütün veriler hesapsal yöntemlerle elde edilmiştir. Tablo 3.3’te ise atomik hidrojen enerjisi ve bir elektronun enerjisi kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

Tablo 3.2. ΔH , ΔG Hidrojenlenme Enerjileri

$Fl_{red}-(Fl_{ox}+H_2)(kcal/mol)$				
Model	X (C8)	Y (N10)	ΔH	ΔG
I	Cys-Tyr	Triol	-17,232405	-9,536118
II	Cys-Tyr	CH ₃	-18,745935	-13,464268
III	Cys-Tyr	H	-39,830562	-31,054347
IV	CH ₃	Triol	-20,065567	-11,410460
V	CH ₃	CH ₃	-18,688205	-10,168638
VI	CH ₃	H	-20,442695	-12,085022
VII	H	Triol	-16,214600	-8,225897
VIII	H	CH ₃	-20,103845	-11,174520
IX	H	H	-22,312645	-12,728837

Tablo 3.3. ΔH , ΔG $2e^-+2H^+$ İndirgenme Enerjileri

$Fl_{red}-(Fl_{ox}+2e^-+2H^+)(kcal/mol)$				
Model	X (C8)	Y (N10)	ΔH	ΔG
I	Cys-Tyr	Triol	-116,790790	-102,854643
II	Cys-Tyr	CH ₃	-118,304320	-106,782793
III	Cys-Tyr	H	-139,388947	-124,372872
IV	CH ₃	Triol	-119,623952	-104,728985
V	CH ₃	CH ₃	-118,246590	-103,487163
VI	CH ₃	H	-120,001080	-105,403547
VII	H	Triol	-115,772985	-101,544423
VIII	H	CH ₃	-119,662230	-104,493045
IX	H	H	-121,871030	-106,047362

Bu iki tablodaki enerji değerleri arasında elektron enerjisinden kaynaklanan belirgin bir fark olmakla birlikte her iki yaklaşıma göre indirgenme eğilimleri sıralaması aynı $III > II > IX > VI > IV > VIII > I > VII$ bulunmuştur.

İndirgenme eğilimleri incelendiğinde Model III'ün indirgenme eğiliminin en yüksek olduğu görülmektedir. Model yapı C8'den kovalent bağlanma motifi içermektedir. Kovalent flavinasyon yapıları kararlılık katarak, redoks potansiyelini ve indirgenme hızını artırmaktadır. Model III'ün yüksek indirgenme eğilimi göstermesinde kovalent motif içermesinin etkisi büyüktür. Aynı zamanda kovalent motif içeren Model I ve Model II ile karşılaştırdığımızda, Model III_{red}'ün X pozisyonuna bağlı olan süstitüent N10 ve N1'e bağlı hidrojenlerle güçlü etkileşimler yaptığı ve diğerlerine göre halka bükülme yönünün değiştiği görülmektedir. Bu güçlü H- bağları Model III_{red} yapısının kararlılığını olağanüstü artırarak hidrojenlenme enerjisinin en düşük olmasına neden olmuştur. Model I_{red} ve Model II_{red}'de Model III_{red}'e göre Y pozisyonunda bulunan büyük grubun etkisinden dolayı X pozisyonuna bağlı süstitüent N1 hidrojen atomuna yaklaşmamakta ve Model III gibi halka ile güçlü etkileşimler gözlenmemektedir. X süstitüentler aynı Y süstitüentlerin değiştiği yapılar kıyaslandığında, Y=H durumunun her zaman daha düşük indirgenme enerjisine sahip olduğu gözlenmektedir. FAD bükülme açısı değerlerinde gözlenildiği gibi indirgenme eğilimlerinde de X pozisyonuna bağlı olan süstitüent farklı olsa dahi Y pozisyonuna bağlı olan süstitüent aynı olduğunda yakın indirgenme enerji değerlerine sahip oldukları gözlenmektedir. Model I, IV, VII, Model II, V, VIII ve Model IV, IX yakın indirgenme enerji değerlerine sahiptirler. Aynı şekilde Y pozisyonuna bağlı olan süstitüent farklı olsa dahi X'e bağlı olan süstitüentler aynı olduğunda yakın indirgenme enerji değerlerine (En yüksek indirgenme eğilimine sahip Model III hariç) sahip oldukları gözlenmektedir (Bkz.:Tablo 3.3).

3.3. FAD İçeren Enzimlerle Model Yapıların Karşılaştırılması

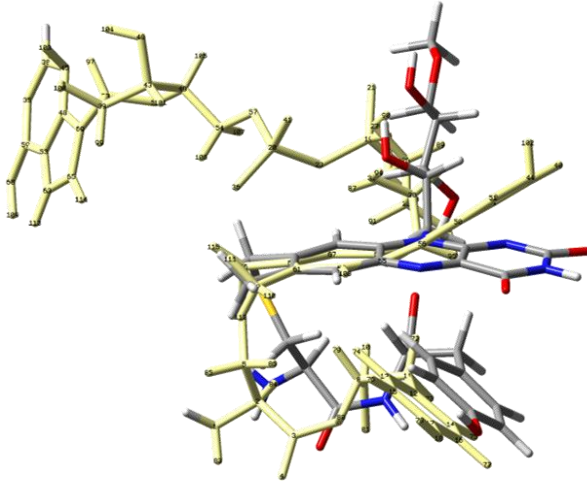
Çalışmamızda modellediğimiz yapılardan Model I izoalloksazin halkasına 8a-Cys'den kovalent bağlanma motifi içermektedir. Çalışmamızın geçerliliğini araştırmak için 8a-Cys kovalent bağlanma motifi içeren enzimlerle (Bkz.: Tablo 2.2) Model I_{red} ve Model I_{ox} yapılarımız karşılaştırılmıştır. Model yapılar incelendiğinde Model IV'ün kovalent motif içermeyen enzimlerle aktif bölgelerinin benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu kapsamda kovalent motif içermeyen enzimlerle (Bkz.: Tablo 2.3) Model IV_{ox} ve Model IV_{red} yapılarımız karşılaştırılmıştır.

3.3.1. FAD'te 8a-Cys'den Kovalent Bağlanma Motifi İçeren Enzimlerle Model I_{ox} ve I_{red} Karşılaştırılması

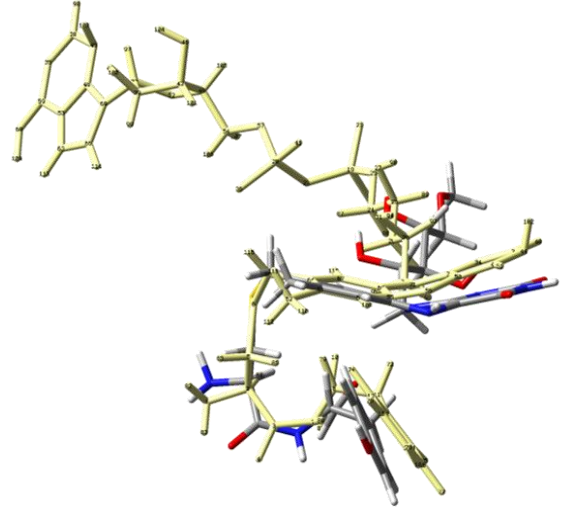
Monoamin Oksidaz (MAO)

Monoamin Oksidaz biyolojik aminleri oksitleyen, flavin içeren, mitokondri zarının dışında bulunan enzimdir (Colibus vd., 2005). MAO A ve MAO B olmak üzere iki izoenzimi bulunmaktadır. MAO A karaciğer ve bağırsak çeperlerine yerleşmiştir. İnsan beynindeki MAO'nun %80'i MAO B olmakla birlikte trombositlerde bu oran %98'dir. İki enzim farklı genlerden sentezlenmesine rağmen %72 oranında gen dizilimleri benzerdir (Bach vd., 1998; Edmondson vd., 2004; Binda vd., 2001). Bu enzimler substrat tercihleri, inhibitör özgünlükleri, doku dağılımları, immünolojik özellikleri ve aminoasit dizimleri bakımından farklılık göstermektedirler (Silverman, 1992). MAO'nun substratları epinefrin (adrenalin), norepinefrin (noradrenalin), benzilamin, fenetilamin, dopamin ve serotoninidir (Bkz.: Şekil 1.5). Bu iki enzimin oksidasyon mekanizmalarının aynı olduğu düşünülmektedir ve MAO mekanizmaları ile ilgili çalışmalar devam etmekle birlikte literatürde bir çok mekanizma önerisi mevcuttur (Bkz.: Şekil 1.6). Ayrıca grubumuz tez çalışmalarında da MAO mekanizmaları detaylı bir şekilde araştırılmaktadır (Çakır, 2016).

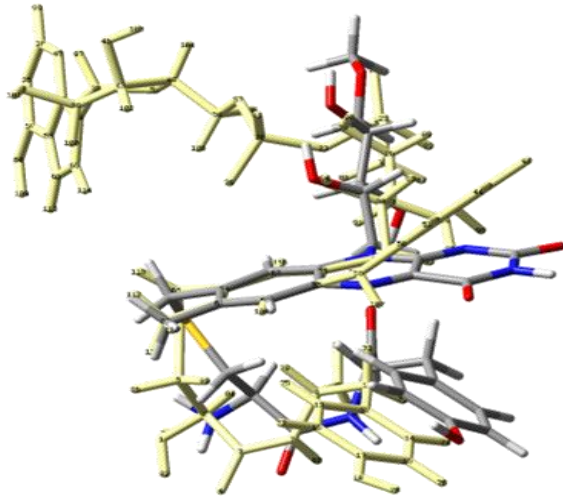
Bu tez çalışmasında 2Z5X PDB kristal kodlu MAO A enzimi ve 1S3B PDB kristal kodlu MAO B enzimi Model I_{ox} ve Model I_{red} ile karşılaştırılmıştır. FAD halkasının enzim kristal yapısında yükseltgenmiş formda mı indirgenmiş formda mı bulunduğu bilinmemektedir ancak yükseltgenmiş ve indirgenmiş model yapılarımızla kristal yapıları karşılaştırdığımızda FAD'ın oksidasyon derecesi hakkında tahminde bulunabilmekteyiz. Model çalışmalarımızda da gözlemlediğimiz üzere, yükseltgenmiş modeller düzlemsele yakınen indirgenmiş yapılarda izoalloksazin halkası N5-N10 ekseninde bükülerek kelebek ya da kırık doğru şeklinde olmaktadır. Model I_{ox} ve Model I_{red} ile 2Z5X PDB kristal kodlu MAO A enzimini karşılaştırdığımızda bu enzimin FAD halkasının bükük olduğu ve model yapımızın indirgenmiş formuyla benzerlik gösterdiği (Şekil 3.10.b) görülmektedir. Bu durumda 2Z5X kristal kodlu MAO A enziminin kristal yapısında indirgenmiş formda olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca 1S3B kristal kodlu MAO B enzimi de yükseltgenmiş modele göre büyük oranda indirgenmiş modele benzemektedir. Ancak model yapılarımızı oluşturduğumuz enzim 2XFN kristal kodlu MAO B enzimi olduğu için MAO B enzimindeki benzerlikler ayırt edici bir durum değildir.



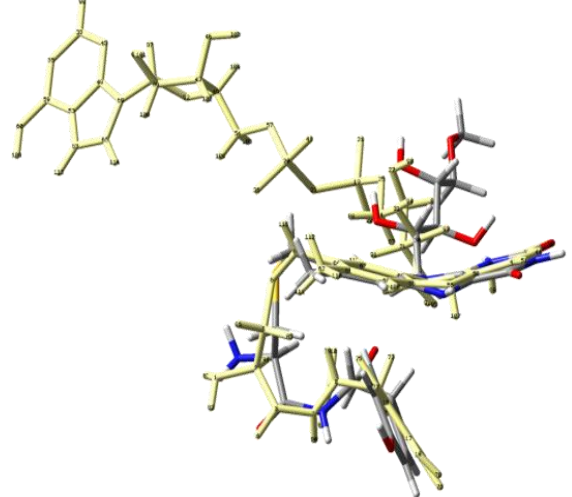
Şekil 3.10.a. MAOA (2Z5X) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOA Enzimi 165° ; Model I_{ox} 176°)



Şekil 3.10.b. MAOA (2Z5X) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOA Enzimi 165° ; Model I_{red} 156°)



Şekil 3.11.a. MAOB (1S3B) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOB Enzimi 155° ; Model I_{ox} 176°)



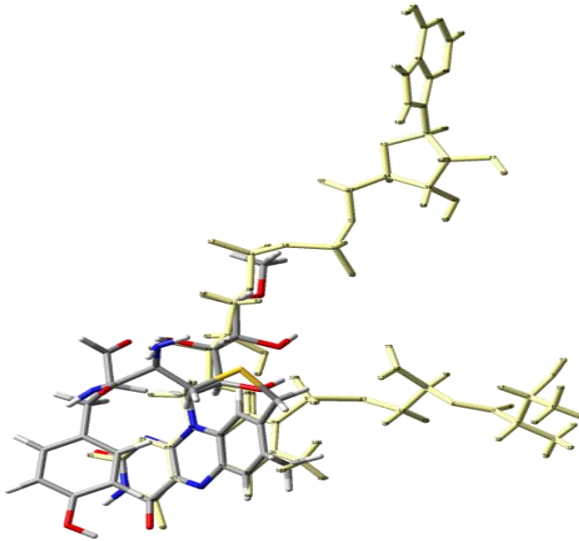
Şekil 3.11.b. MAOB (1S3B) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MAOB Enzimi 155° ; Model I_{red} 156°)

Yaygın Olmayan Amino Asit Oksidaz (NikD)

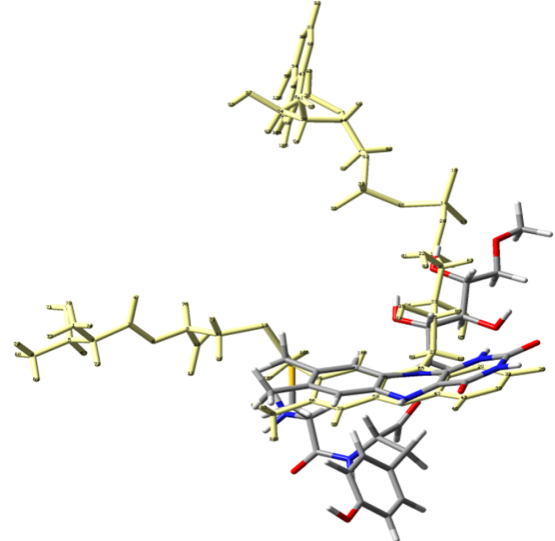
Yaygın olmayan aminoasit NikD kovalent bağlı FAD içeren oksidaz enzimidir. Piperidin-2-karboksilik asidin pikolinata 4-elektron yükseltgenmesini katalize eder ve nikomisin antibiyotiklerinin biyosentezinde kritik rol oynar. NikD, FAD molekülüne Cys 321 den

kovalent olarak bağlanır (Venci vd., 2002) ve çözeltide monomer gibi görünür. NikD flavin prostetik grubunun tamamen indirgenmiş halini üreten proste zorunlu iki elektronlu alıcı olarak davranır. NikD % 25 oranda Monomerik Sarkozin Oksidaz (MSOX) ile dizilim benzerliği (sequence identity) göstermektedir. Bu ailenin diğer üyeleri N-Methyltryptophan Oksidaz (MTOX), Pipekolat Oksidaz (PIPOX) ve Heterotetramerik Sarkozin Oksidaz (TSOX)'dır (Wagner vd., 1999). Diğer aile üyeleriyle karşılaştırıldığında NikD, 4 elektron oksidasyonunu yapabilen tek enzimdir.

Model yapılar ile enzimi karşılaştırıldığında, 2OLN kristal kodlu enzim ile Model I_{ox} FAD halka bükülmesi düzlemsellikten 4° sapma gösterirken 2OLN PDB kristal kodlu NikD enziminin 1° sapma gösterdiği ve aralarında sadece 3° fark olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.12.a). Ayrıca Model I_{ox} ve 2OLN PDB kristal kodlu enziminin izoalloksazin halkalarında büyük oranda çakışma gözlenmiştir. 2OLN PDB kristal kodlu NikD enzimi yükseltgenmiş modele benzediğinden bu enzimin kristal yapısında FAD halkasının yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz. 2OLN oksidaz enzimi olduğundan düzlemsel yapıyla benzerlik göstermesi 2OLN'nin kristal formunun reaksiyon başlamadan önce ya da reaksiyon tamamlandıktan sonra (geriye yükseltgenmede) elde edildiği sonucunu bize vermektedir.



Şekil 3.12.a. NikD (2OLN) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: NikD Enzimi 179°; Model I_{ox} 176°)

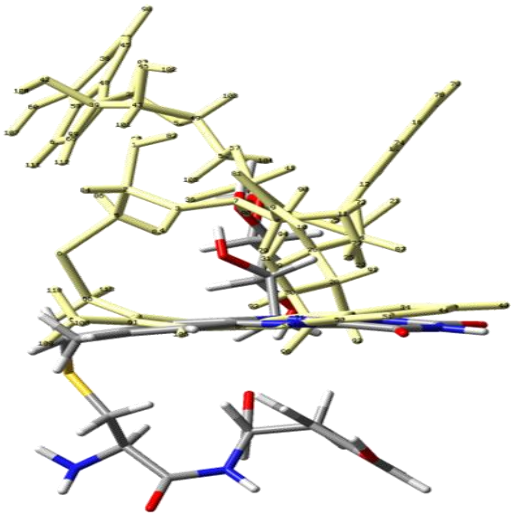


Şekil 3.12.b. NikD (2OLN) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: NikD Enzimi 179°; Model I_{red} 156°)

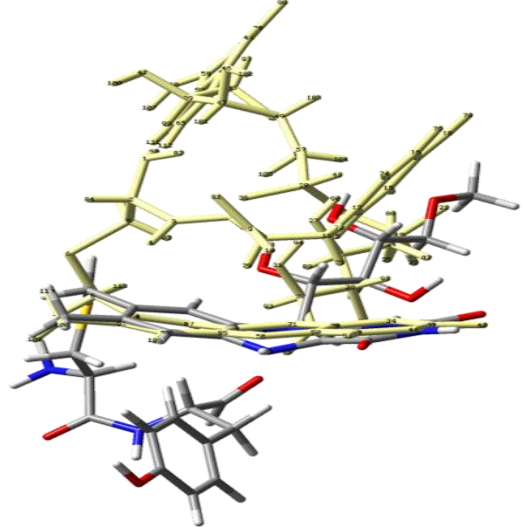
Flavo Sitokrom C Sülfür Dehidrojenaz (FCSD)

Flavo Sitokrom C Sülfür Dehidrojenaz yeşil ve mor fototrofik bakterilerde bulunur ve kükürt metabolizmasında işlev gördüğü düşünülmektedir (Cusanovich vd., 1991). FCSD de FAD Cys 42'den kovalent olarak bağlanır (Kenney ve Singer, 1977; Van Beeumen vd., 1990- 1991). FCSD iyi bilinen flavin redoks potansiyellerine sahiptir (ortalama -26 den +28 mV, iki elektro potansiyel). Normal olmayan yüksek redoks potansiyeli sayesinde FCSD'nin FAD'ı sülfid, tiyosülfat, siyanür ve merkaptanlar ile N-5 adductları oluşturur (Cusanovich vd., 1991; Meyer vd., 1991b). FCSD flavin bağlanma benzeri alt birim içeren glutatyon redüktaz ve dihem sitokrom altbirimi içermektedir. Dihem sitokromu her biri Mitokondriyal Sitokrom C'ye benzeyen iki alan içerir ve alt ünitenin iç kısmındaki iki heme grubunu birleştiren interpropiyonik asit bağına sahiptir. Flavoprotein alt biriminin aktif bölgesi, flavin halkasının pirimidin bölümünün üzerinde bulunan katalitik olarak önemli bir disülfid köprüsü içerir (Chen vd., 1994).

Model yapı ile 1FCD PDB kristal kodlu FCSD enzimi karşılaştırılmıştır (Şekil 3.13.a, Şekil 3.13.b). 1FCD PDB kristal kodlu FCSD'nin yükseltgenmiş model ile FAD halkası bükülme açıları arasında sadece 2° fark vardır ve yapıların izoalloksazin halkaları büyük oranda çakışmıştır (Şekil 3.13.a). Bu veriler ışığında 1FCD PDB kristal kodlu enzimin kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz.



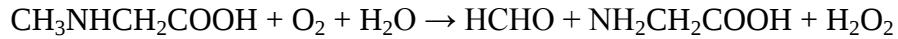
Şekil 3.13.a. Flavo Sitokrom C Sülfür Dehidrojenaz (1FCD) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1FCD Enzimi 178°, Model I_{ox} 176°)



Şekil 3.13.b. Flavo Sitokrom C Sülfür Dehidrojenaz (1FCD) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1FCD Enzimi 178°, Model I_{red} 156°)

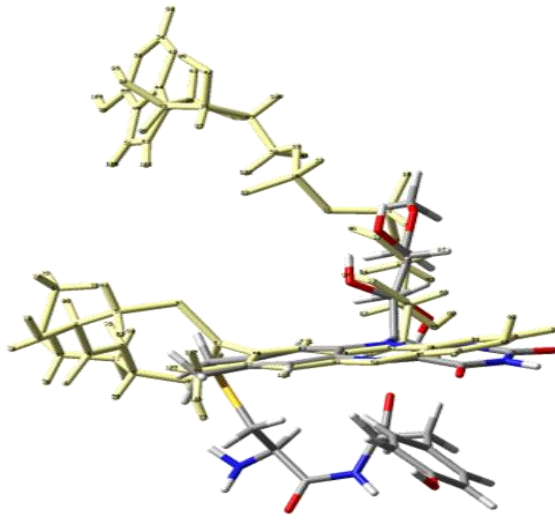
Monomerik Sarkozin Oksidazlar (MSOX)

Monomerik Sarkozin Oksidazlar (MSOX), kovalent bağılı flavin içeren ve çeşitli ikincil veya üçüncül aminoasitlerle benzer oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen son zamanlarda kabul edilmiş prokaryotik ve ökaryotik enzimlerin en basit üyelerindendir (Trickey vd., 1999). Heterotetramerik Sarkozin Oksidazlar (TSOX), N-Metiltriptofan Oksidaz (MTOX) ve Pipekolat Oksidaz (PIPOX) ailenin diğer enzimleridir. Dimetilglisin Dehidrojenaz (DMGDH) ve Sarkozin Dehidrojenaz (SDH) daha uzaktan ilişkili aile üyeleridir. TSOX hariç hepsi monomerik enzimlerdir. MSOX; MTOX ile yaklaşık % 40, PIPOX ile yaklaşık %30 dizilim benzerliği gösterir. MSOX ayrıca TSOX'un β altbirimi, fare karaciğeri DMGDH'nin N-terminal yarısı ve insan SDH'ı ile yaklaşık % 20–25 dizilim benzerliği gösterir (Reuber vd., 1997; Chlumsky vd., 1995; Lmag vd., 1991; Trickey vd., 1999). MSOX glisin, formaldehit ve hidrojen peroksit oluşturmak üzere moleküler oksijen ve su ile sarkozinin (N-metilglisin) oksidasyonunu katalizler (Kvalnes-Krick ve Jorns, 1991) (Şekil 3.14).

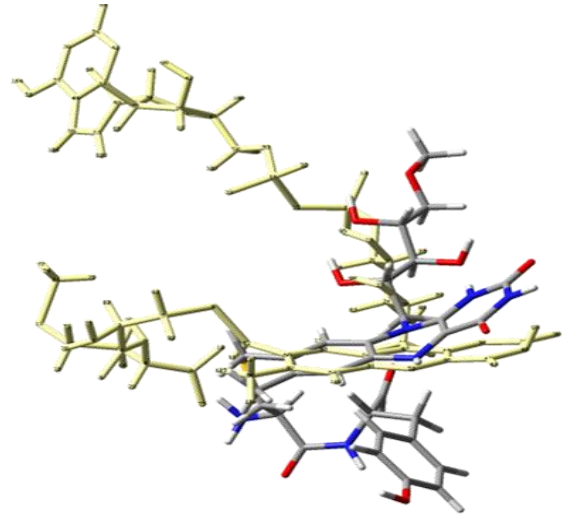


Şekil 3.14. MSOX Enziminin Katalizasyonu

2GF3 PDB kristal kodlu MSOX enzimi de 2OLN kristal kodlu NikD enzimi gibi bir oksidazdır ve FAD halka bükülme açısı ve yükseltgenmiş modelle izoalloksazin halkalarının çakışmasından dolayı büyük oranda yükseltgenmiş modele benzemektedir (Şekil 3.16.a). Bu durumda 2GF3 PDB kristal kodlu MSOX enziminin kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz. 2OLN FAD kristal kodlu enzimi gibi 2GF3 FAD kristal kodlu enziminin kristal yapısı da reaksiyon başlamadan önce ya da reaksiyon tamamlandıktan sonra (geriye yükseltgenmede) elde edilmiştir.



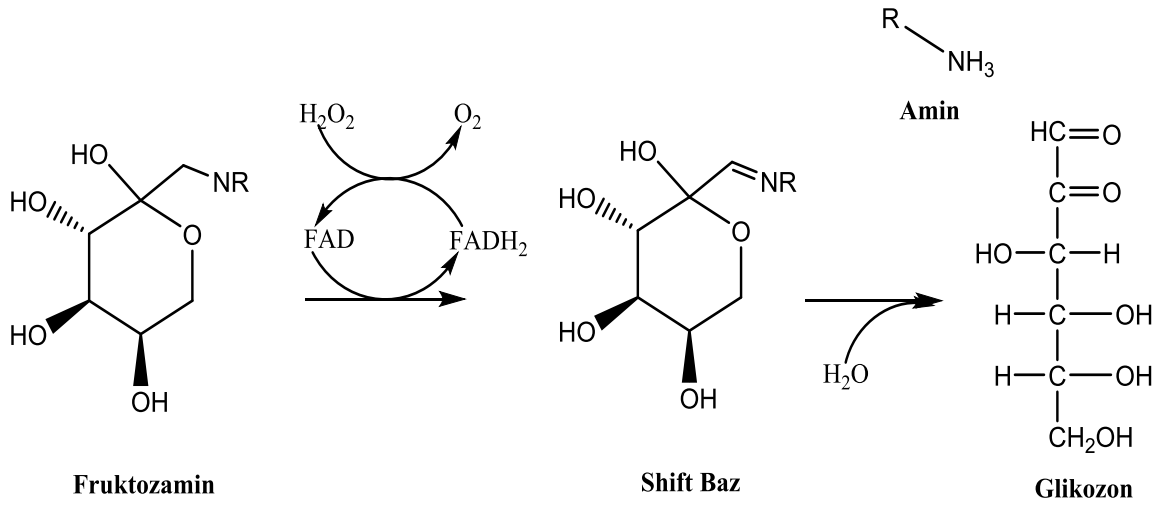
Şekil 3.15.a. MSOX (2GF3) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MSOX Enzimi 173° , Model I_{ox} 176°)



Şekil 3.15.b. MSOX (2GF3) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: MSOX Enzimi 173° , Model I_{red} 156°)

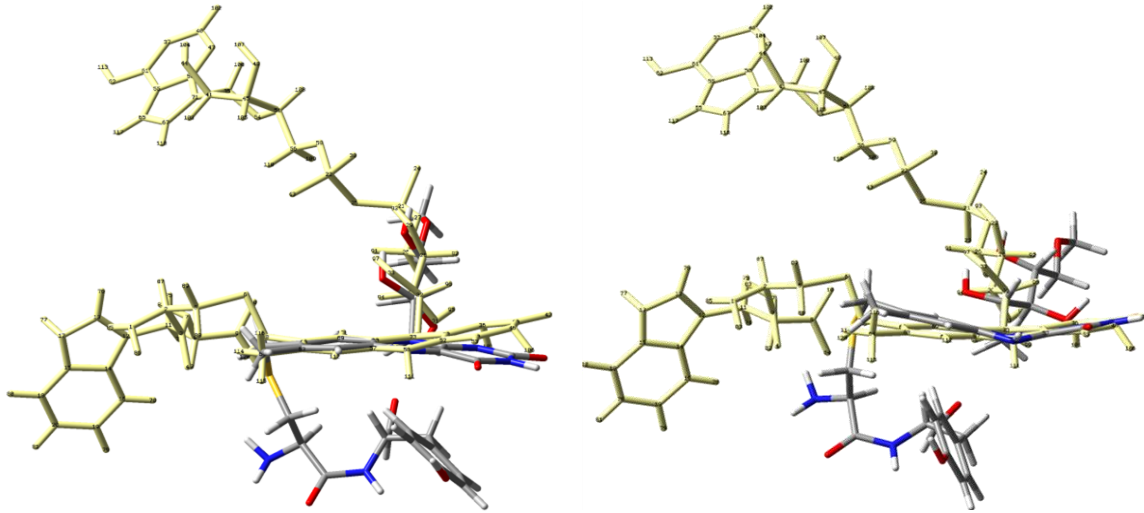
Fruktozamin Oksidazlar (FAOX)

FAOX düşük moleküler ağırlıklı fruktozaminlerin (Amadori ürünlerinin) oksidatif deglikasyonunu katalize eder. Bu proteinler diyabetik komplikasyonlarla ilişkili proteinleri deglike etmek için enzim geliştirme konusunda ilgidir. Fruktozamin glikozun aminoasitlerin amino grubuyla veya proteinlerin yoğunlaştırılmasıyla oluşur. Fruktozamin sıcaklık, şeker izomerizasyon hızı, konsantrasyon ve hedef proteinlerin devir hızına bağlı bir oranda spontan olarak enzimatik olmayan bir şekilde oluşur. Tıpta proteine bağlı fruktozaminler (aynı zamanda, glikatlanmış proteinler olarak da adlandırılırlar) şeker hastalığının oluşumunu arttığı ve diyabetik komplikasyonlardan kısmen sorumlu tutulduğu için dikkat çekmektedir. Fruktozaminler nispeten kararsız bileşiklerdir ve ileri glikasyonun son ürünleri için öncü maddelerdir. FAOX enzimlerine fruktozamin üzerine etki eden iki enzim ailesi tanımlanmıştır. Bunlar insan ve hayvanlarda bulunan Fruktozamin 3-Kinaz ve bakterilerde bulunan Fruktozselisin-6-Fosfat deglikazıdır. Fungal FAOX'lar kovalent bağlı FAD'yi içeren peroksitomal enzimlerdir ve fruktozaminlerin amino kısmının azotu ile fruktozil parçasının C1 arasındaki C-N bağının oksidasyonunu katalizlemektedirler. Elde edilen Shift bazı kolayca glikozona ve bir aminoasite hidroliz edilir. İndirgeme işleminden sonra indirgenmiş FAD hidrojen peroksit salınımı ile eşzamanlı olarak moleküler oksijen ile yükseltgenir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. FAOX C-N bağının oksidasyonu ile fruktozaminin amino kısmındaki azot ve fruktozil parçasının C1'i arasını katalizler. Elde edilen Shift bazı glikozona ve bir aminoasite hidrolizlenir. Katalitik döngüden sonra indirgenmiş FAD hidrojen peroksit salınımı ile eşzamanlı olarak moleküler oksijen ile yükseltgenir.

3DJE PDB kristal kodlu FAOX enziminin FAD halka bükülme açısı 1FCD PDB kristal kodlu FCSD enzimi gibi yükseltgenmiş modelle sadece 2 derecelik fark göstermektedir (Şekil 3.17.a) ve izoalloksazin halkası yükseltgenmiş modelle benzerlik göstermektedir. Bu durumda 3DJE PDB kristal kodlu FAOX enziminin kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunmakta olduğu söylenebilir.



Şekil 3.17.a. FAOX (3DJE) Enzimi (Sarı) ile Model I_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: FAOX Enzimi 174°, Model I_{ox} 176°)

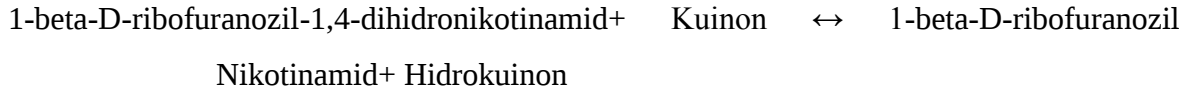
Şekil 3.17.b. FAOX (3DJE) Enzimi (Sarı) ile Model I_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: FAOX Enzimi 174°, Model I_{red} 156°)

Genel olarak özetlenirse, izoalloksazin halkasına C8-Cys'den kovalent bağlanma motifi içeren enzimlerin model yapılarla yapılan karşılaştırmalarında; 2Z5X, 1S3B PDB kristal kodlu MAO enzimleri hariç diğer enzimler kristal yapılarında yükseltgenmiş modelle (Model I_{ox}, FAD halka bükülmesi düzlemsele yakın model) benzerlik göstermektedirler. 2Z5X ve 1S3B PDB kristal kodlu MAO enzimlerinin kristal yapılarındaki formları ise indirgenmiş modelle benzerlik göstermektedir. 2Z5X kristal kodlu MAO A enziminin oksidaz olmasına karşın diğer kovalent motifli oksidaz enzimlerin aksine kristal yapıda indirgenmiş halde bulunması oldukça şaşırtıcıdır. Model yapılarımızda C8 ve N10'a farklı süstitüentler eklenmiş ve model yapıların konformasyonları sadece süstitüentlerden etkilenmiştir. Ancak kristal yapılarıdaki enzimlerde süstitüentler dışında enzimin aktif bölgesinde başka etkileşimler etkili olabilir. Bu durumda MAO enzimlerinin diğer oksidaz enzimlere göre farklı kristal formda bulunması enzimin aktif bölgesine diğer etkileşimlerin etkisini de düşündürmektedir. Çalışmada kullandığımız modeller 2XFN PDB kristal kodlu MAO B enziminin aktif bölgesinden kesildiği için model yapılarımızın 1S3B PDB kristal kodlu MAO B enzimi ile büyük oranda benzerlik göstermesi şaşırtıcı değildir. Ayrıca C8-Cys'den kovalent bağlanma motifi içeren enzimlerden oksidaz olanların (1S3B ve 2Z5X PDB kristal kodlu MAO enzimleri hariç) aktif bölgelerinin yükseltgenmiş modelle benzerlik göstermesi, oksidaz olan enzimlerin kristal yapılarının reaksiyon başlamadan önce veya reaksiyon tamamlandıktan sonra enzim geri yükseltgendiğinde elde edildiğini düşündürmektedir. 1S3B ve 2Z5X PDB kristal kodlu MAO enzimlerinin oksidaz olmalarına karşın indirgenmiş modelle benzerlik göstermeleri enzimin kristal formunun FAD indirgenmesi bitiminde elde edildiğini göstermektedir.

3.3.2. FAD'te Kovalent Bağlanma Motifi İçermeyen Enzimlerle Model IV_{ox} ve IV_{red} Karşılaştırılması

Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz

Özellikle difenoller ve diğer alıcılarla donör olarak ilgili maddeleri etkileyen oksidoredüktaz ailesinden bir enzim çeşididir. Enzimin sistematik ismi 1-Beta-D-Ribofuranozil-1,4-dihidronikotinamid'dir. NRH içeren yaygın kullanılan diğer isimleri NQO2, NQO2, QR2, Kuinon Redüktaz 2 ve N-Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz (kuinon)'dur. Enzimolojide ise Şekil 3.18'deki kimyasal reaksiyonu katalizleyen enzim çeşididir (Liao vd.,1962).



Şekil 3.18. Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz Enziminin Katalizasyonu

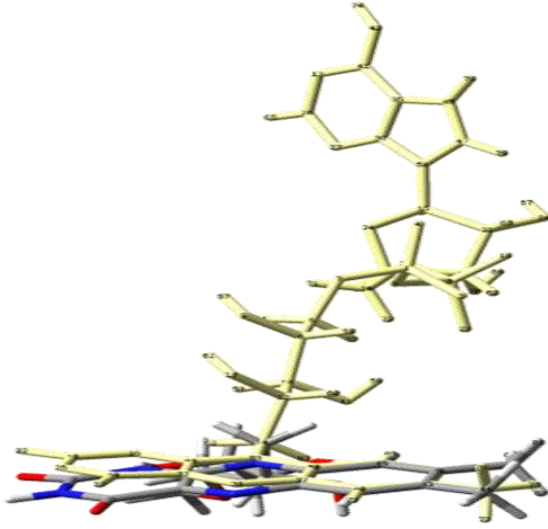
Bu tez çalışmasında kullanılan diğer Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz enzimlerinin (4U7H, 4FGL PBD kristal kodlu Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz enzimleri) aksine 4QOG PBD kristal kodlu Ribosil dihidronikotinamid Dehidrojenaz enziminin kristal yapısındaki formu (yükseltgenmiş yada indirgenmiş) PDB'ta belirtilmediği için 4QOG PBD kristal kodlu Ribosil dihidronikotinamid Dehidrojenaz enziminin Model IV_{ox} ve Model IV_{red} ile ayrı ayrı karşılaştırmaları yapılmıştır. Karşılaştırma sonucunda Model IV_{ox} ile FAD bükülme açıları arasında sadece 2 derecelik fark bulunduğu ve izoalloksazin halkalarının büyük oranda çakıştığı gözlenmiştir (Şekil 3.19.a). Bu durumda 4QOG PBD kristal kodlu enziminin kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca bu enzim redüktaz olduğundan kristal yapısının reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edildiğini de söyleyebiliriz.

4U7H PBD kristal kodlu Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenazenziminin kristal yapısındaki formu PDB'ta yükseltgenmiş olarak belirtildiği için enzimin aktif bölgesi sadece Model IV_{ox} ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda izoalloksazin halkalarının büyük oranda çakıştığı ve FAD halka bükülme açısı değerlerinin yakın olduğu (176°, 178°) gözlenmiştir (Şekil 3.20.a).

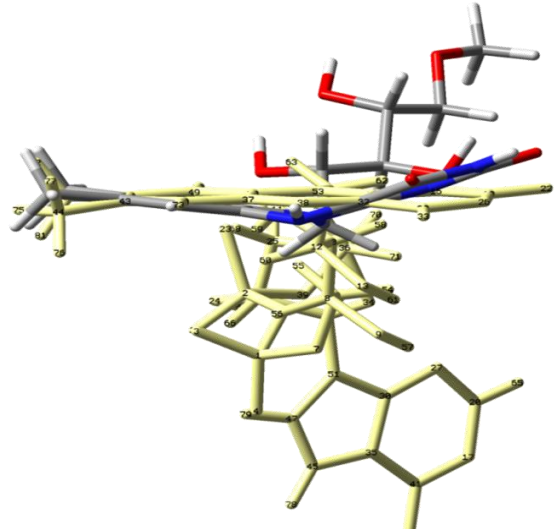
4FGL PBD kristal kodlu Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenazenziminin kristal yapısındaki formu PDB'ta indirgenmiş olarak belirtildiği için enzimin aktif bölgesi sadece Model IV_{red} ile karşılaştırılmıştır. Ancak indirgenmiş modellerle halka bükülme açıları arasında büyük oranda fark bulunmaktadır (155°, 178°) (Şekil 3.20.b) Model IV_{red} N5-N10 ekseninde 4FGL kristal kodlu enzime göre daha yüksek derecede bükülme göstermektedir. Bu durumda enzimler yeterli derecede çakışmamakta ve benzerlik göstermemektedirler.

PDB'ta 4FGL kristal kodlu enziminin indirgenmiş formda olduğu belirtilen Leung ve Shilton'un çalışması incelendiğinde; 4FGL PBD kristal kodlu enzimin halka bükülmesinin minimal olmasına karşın yükseltgenmiş olarak kabul edilen 4FGJ PBD kristal kodlu enzimden fazla olması ve düzlemselden yaklaşık 4-5° sapmasından dolayı 4FGL PBD kristal kodlu enziminin indirgenmiş olarak kabul edildiği vurgulanmıştır (Leung ve Shilton, 2013). Ancak bir enzimin indirgenmiş kabul edilebilmesi için düzlemsellikten 4-5° sapmış olması tez çalışmamızın içeriği ve literatür taraması kapsamında

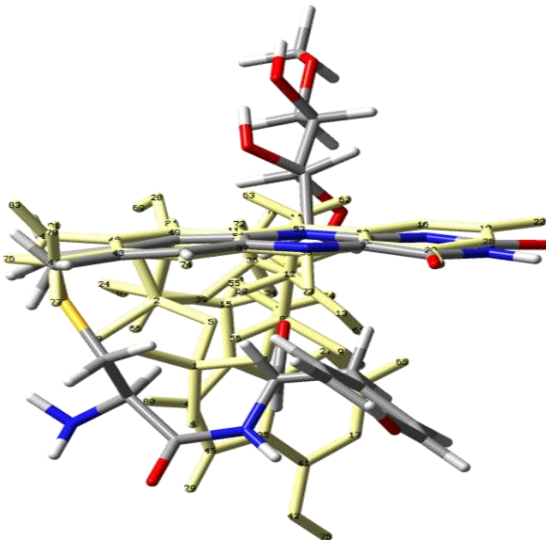
düşünüldüğünde yeterli değildir (Şekil 3.20.b). Bu tez çalışması kapsamında 4FGL PDB kristal kodlu enzimin kristal yapısında yükeltgenmiş formda olduğunu söyleyebiliriz.



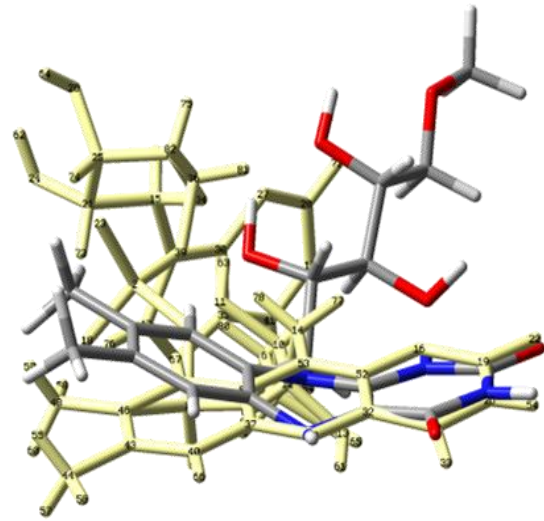
Şekil 3.19.a. Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz (4QOG) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4QOG Enzimi 178°, Model IV_{ox} 176°)



Şekil 3.19.b. Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz (4QOG) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4QOG Enzimi 178°, Model IV_{red} 155°)



Şekil 3.20.a. Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz (4U7H) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4U7H Enzimi 175°, Model IV_{ox} 176°)

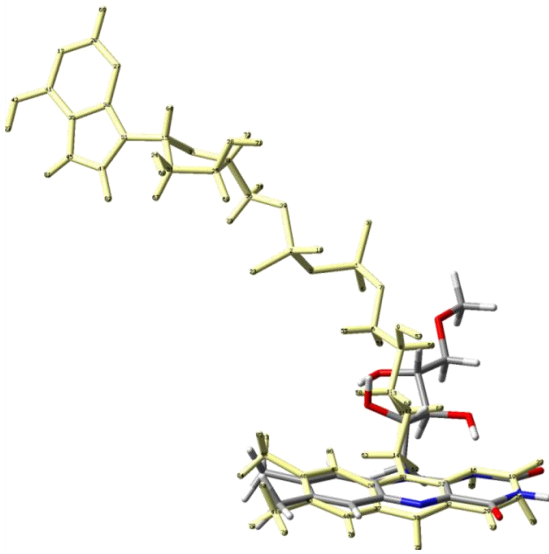


Şekil 3.20.b. Ribosildihidronikotinamit Dehidrojenaz (4FGL) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red}'nin Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4FGL Enzimi 178°, Model IV_{red} 155°)

Lizin Spesifik Demetilaz 1 (LSD1)

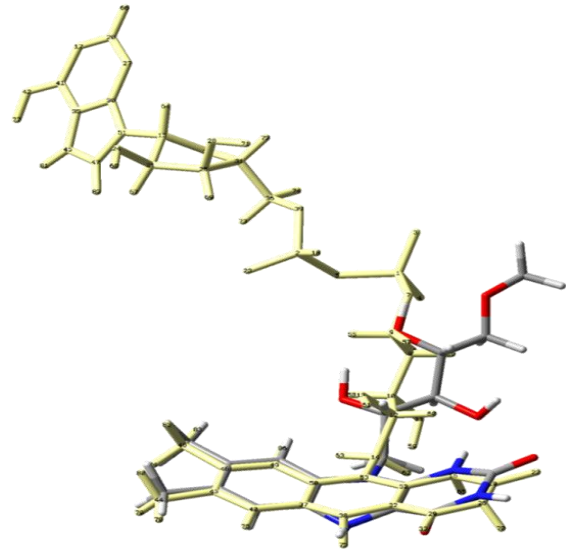
Lizin Spesifik Demetilaz 1 histon demetilazıdır ve flavin adenin dinükleotitli amin oksidazların ailesindendir. LSD1 mono veya dimetilatlı dimetillenmiş histon H3 lizin 4 (H3K4) ve H3 lizin 9'un (H3K9) demetilasyonunu redoks işlemi ile gerçekleştirir. Son zamanlardaki çalışmalar LSD1'in hücre proliferasyonu, adipogenez, spermatogenesis, kromozom ayrımı ve embriyonik gelişim gibi geniş biyolojik süreç spektrumunda önemli rol oynadığını göstermektedir. P53'ün tümör aktivitesini inhibe etmek için LSD1 geliştirilmektedir. Bugüne kadar anti tümör ilaçlarını keşfetmede potansiyel bir ilaç olarak LSD1 inhibitörlerinin tıbbi önemi büyüktür (Chen vd., 2012).

2DW4 PDB kristal kodlu LSD1 enzimi ile model IV_{ox} ve IV_{red} aktif bölgeleri karşılaştırılmıştır. Model yapıların triol kısmı ile enzimin kuyruk kısmı yükseltgenmiş ve indirgenmiş formlarda aynı yönlerde benzer yönelimler göstermiştir. 2DW4 PDB kristal kodlu enzim ile Model yapıların FAD bükülme açıları karşılaştırıldığında; indirgenmiş modele nazaran yükseltgenmiş modelde daha az açı farkı bulunmaktadır (Şekil 3.21.a, 3.21.b). 2DW4 PDB kristal kodlu LSD1 enzimi yükseltgenmiş modelde büyük oranda benzerlik gösterdiğinden kristal yapısında yükseltgenmiş formda olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 3.21.a. LSD1 (2DW4) Enzimi (Sarı)

ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LSD1 Enzimi 170°, Model IV_{ox} 176°)



Şekil 3.21.b. LSD1 (2DW4) Enzimi (Sarı)

ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LSD1 Enzimi 170°, Model IV_{red} 155°)

Glutasyon Redüktaz ve Glutasyon Oksidaz

Glutasyon Redüktaz

Glutasyon Redüktaz GSH redüktaz olarak bilinir ve flavoprotein ailesine aittir. Glutasyon Redüktaz (EC 1.8.1.7) Glutasyon Disülfürün (GSSG) oksidatif strese direnmekte ve hücrenin indirgeyici ortamını korumada kritik bir molekül olan sülfhidril form glutasyonuna (GSH) indirgenmesini katalize eder. Bir hücrenin düzgün çalışması ve hasar görmesinin önlenmesi için GSH, insan hücrelerinde oksidatif stresin önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. GSH doğrudan hidroksil radikallerini ve singlet (tekli) oksijenleri temizler çeşitli detoksifiye enzimlerde kofaktör rolü oynar, plazma zarından aminoasit taşınmasına katılır ve E ve C vitamini gibi önemli antioksidanları reaktif formlarına rejenere eder (Masella vd., 2005). Glutasyonun antioksidan kapasitesi hücre içindeki GSSG/2GSH'nin redoks durumuyla bağlantılıdır (Pastore vd., 2003). GSH redüktazın işlevi, hücredeki yüksek indirgenmiş oksitlenmiş GSH oranına dar redoks durumunda korumaktır (Masella vd., 2005).

Glutasyon Oksidaz

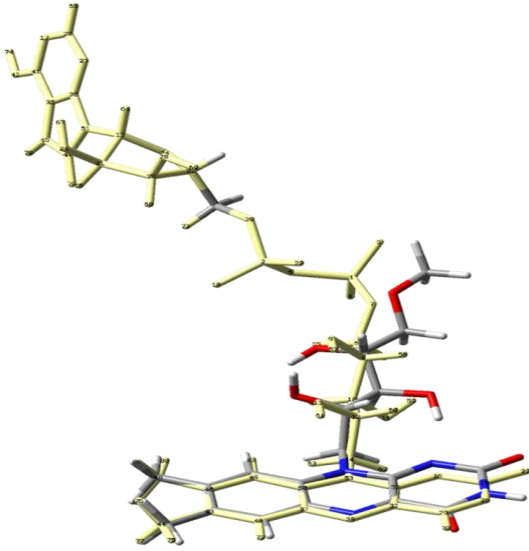
Enzimolojide (EC1.8.3.3) Şekil 3.22'deki kimyasal reaksiyonu katalize eden oksidoredüktaz ailesinden bir enzimdir.



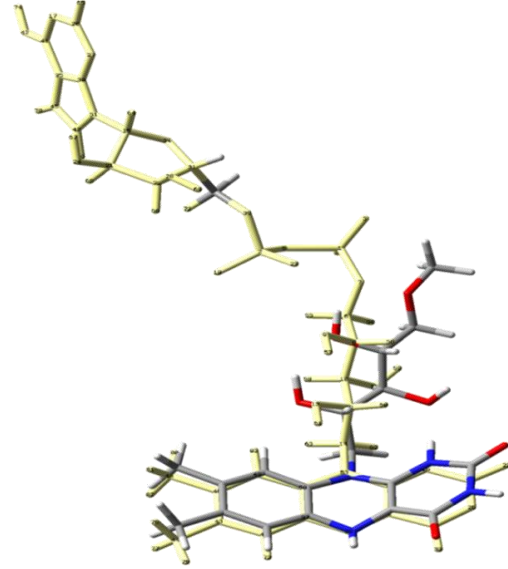
Şekil 3.22. Glutasyon Oksidaz Enzim Katalizasyonu

Glutasyon ve O_2 bu enzimin substratı iken glutasyon disülfür ve H_2O_2 ürünleridir. Özellikle oksijen alıcı olan bir sülfür donör grubuna etki eden maddelerdir. Enzimin sistematik ismi Glutasyon Oksijen Oksidoredüktazdır. Glutasyon metabolizmasına katılır (Kusakabe vd., 1982).

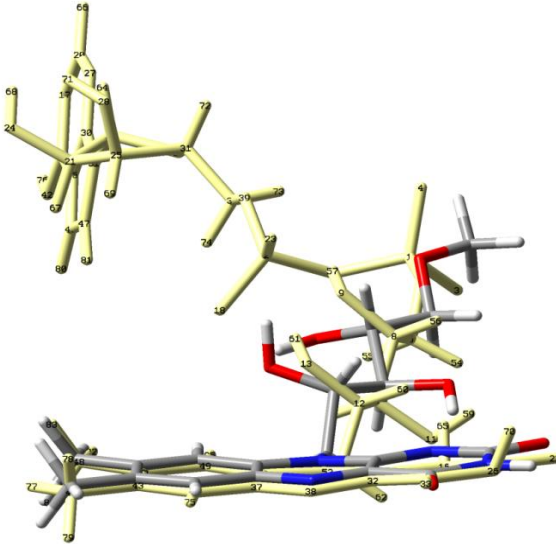
3DK9 PDB kristal kodlu Glutasyon Redüktaz ve 2F6C PDB kristal kodlu Glutasyon Oksidaz enzimlerinin FAD halka bükülme açılarının yükseltgenmiş modelle çok yakın olması ve büyük oranda yükseltgenmiş modelle çakışmalarından (Şekil 3.23.a, Şekil 3.24.a) dolayı kristal yapılarında yükseltgenmiş formda bulunduklarını söyleyebiliriz.



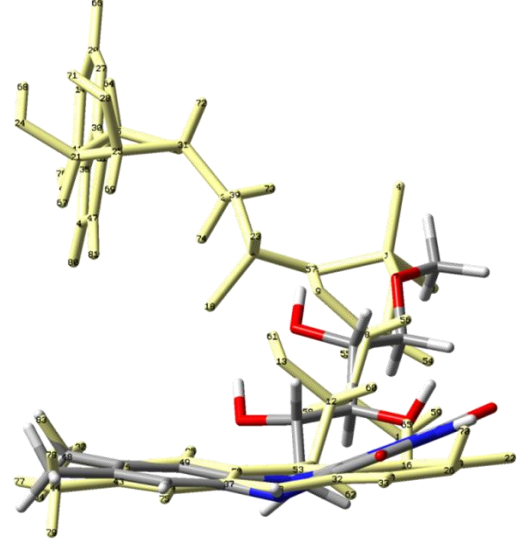
Şekil 3.23.a. Glutasyon Redüktaz (3DK9) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 3DK9 Enzimi 175°, Model IV_{ox} 176°)



Şekil 3.23.b. Glutasyon Redüktaz (3DK9) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 3DK9 Enzimi 175°, Model IV_{red} 155°)



Şekil 3.24.a. Glutasyon Oksidaz (2F6C) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2F6C Enzimi 174°, Model IV_{ox} 176°)



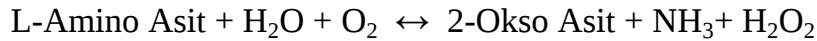
Şekil 3.24.b. Glutasyon Oksidaz (2F6C) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2F6C Enzimi 174°, Model IV_{red} 155°)

D-Amino Asit Oksidaz (DAAO)

FAD'li oksidoredüktaz ailesine aittir. D-amino asit oksidaz (DAAO, DAO, OXDA, DAMOX), mayalardan insana kadar birçok canlıda bulunan kofaktör olarak FAD içeren peroksizomal bir enzimdir (Pollegioni vd., 2007). D-Amino Asit Dehidrojenaz kullanan bitkilerde veya bakterilerde bulunmamaktadır. D-amino asitleri karşılık gelen imino asitlerine okside eder ve amonyak ve hidrojen peroksit üretir. DAAO'nun son zamanlarda beyindeki D-serin metabolizması ve glutamaterjik nörotransmisyon regülasyonu ile ilgili olduğu da bulunmuştur. Postmodern bir çalışmada DAAO'nun aktivitesi şizofrenide iki kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Madeira vd., 2008). DAAO sefalosporin C'nin oksidasyonu, rasemik D-amino asit solüsyonlarının derişimi ve biyolojik sıvıların D-amino asitlerindeki içeriğinin tayini için çeşitli biyosensörlerdeki biyolojik bileşen gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanılır.

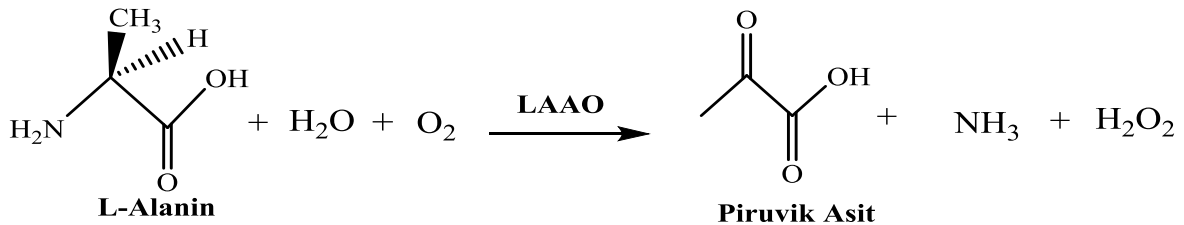
L-Amino Asit Oksidaz (LAAO)

Enzimolojide L-amino Asit Oksidaz (EC1.4.3.2) Şekil 3.25'deki kimyasal reaksiyonu katalizleyen bir enzimdir.



Şekil 3.25. LAAO Enziminin Katalizasyonu

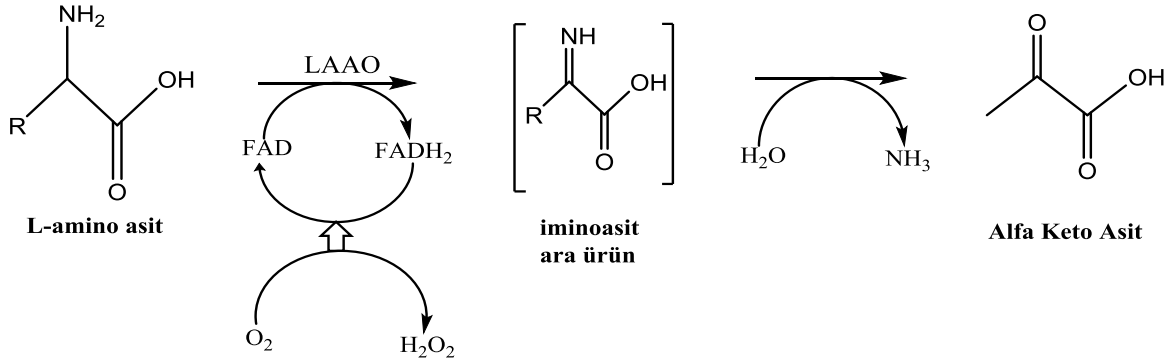
LAAO'lar L-amino asitin stereospesifik oksidatif deaminasyonunu katalizlemek üzere işlev gören flavoenzimlerdir (Fox, 2012). Enzimatik reaksiyonun substratları L-amino asit, su ve oksijendir. Buna karşın ürünleri ise α -keto asit (2-okso asit), amonyak ve hidrojen peroksittir. Enzimin aktivitesine bir örnek L-alanin'in piruvik asit (2-oksopropanoik asit)'e dönüşümüdür (Şekil 3.26).



Şekil 3.26. L-Alanin'in Piruvik Asit (2-Oksopropanoik Asit)'e Dönüşüm Reaksiyonu

LAAO'lar çeşitli ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda bulunmakla birlikte (Mitra ve Bhattacharyya, 2013) yılan zehiri, enzimin zengin kaynaklarındandır. LAAO'ların bazı balık türlerinin harici savunmasında eşsiz bir antibakteriyel protein türü olduğu tespit

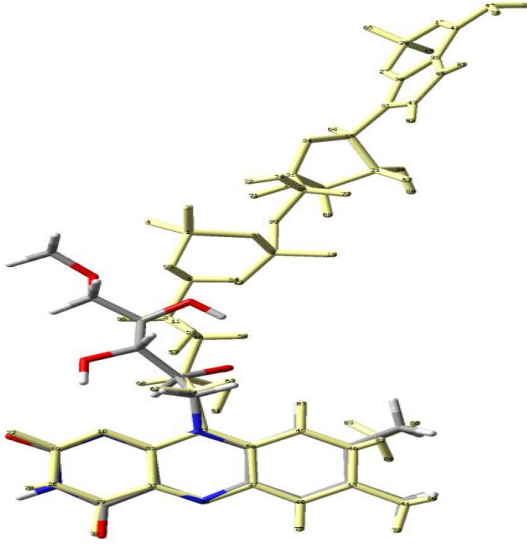
edilmiştir. LAAO sekiz farklı metabolik yola katılır. Bunlar alanin ve aspartat metabolizması, metiyonin metabolizması, valin, lösin ve izolösin bozunması, tirozin metabolizması, fenilalanin metabolizması, triptofan metabolizması, fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi ve alkaloid biyosentezidir. LAAO'lar sadece FAD kofaktörünü kullanır. Enzim, katalitik işlemin ilk basamağında FAD'a bağlanır ve böylece FAD'ı FADH₂'ye indirger. Mekanizma, bir iminoasit ara ürününü veren L-amino asidin oksidatif deaminasyonu yoluyla ilerlemektedir (Şekil 3.27).



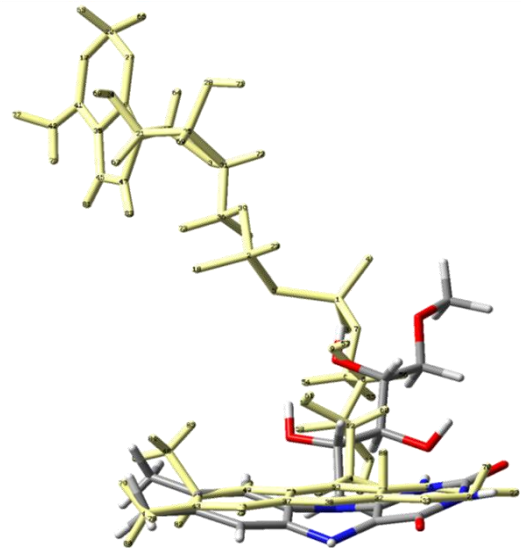
Şekil 3.27. LAAO Enzim Katalizasyonu

3ZNN PDB krsital kodlu DAAO enzimi gerek halka bükülme açısı gerekse FAD halkalarının çakışması bakımından yükseltgenmiş modelle benzerlik göstermektedir (Şekil 3.28.a). Kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz.

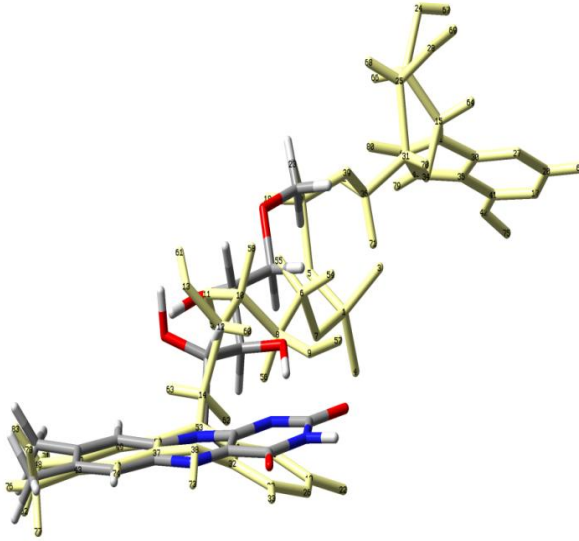
4FEG PDB kristal kodlu LAAO enzimi N5-N10 ekseninde halka bükülmesi düzlemsellikten 15° sapmıştır. Enzimin FAD halka bükülme açısı yükseltgenmiş modelle 11°, indirgenmiş modelle 10° fark bulunmaktadır (Şekil 3.29.a, Şekil 3.29.b) . Her iki modelle de yaklaşık aynı derecelerde fark olmasına karşın indirgenmiş model ile enzimin düzlemsellikten sapma yönlerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Model yapımız si yüze doğru bükülme gösterirken 4FEG PDB kristal kodlu LAAO enzimi re yüze doğru bükülme göstermektedir. Bu durumda 4FEG PDB kristal kodlu enzim ile Model IV_{red}'in düzlemsellikten sapma açı değerlerinin yakın olduğu gözlenmektedir (Şekil 3.29.b). Aynı yönleri bükülme gösterecekler büyük oranda da çakışacaklardır. Bu durumda enzimin kristal formunda indirgenmiş halde bulunduğunu söyleyebiliriz. Enzimin farklı yönlerde bükülmesi enzimin halka bükülme açısı üzerinde süstitüentler dışında farklı etkilerin de olabileceğini düşündürmektedir.



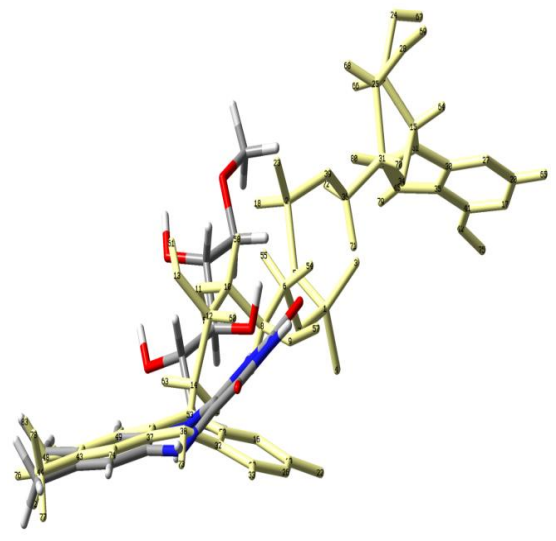
Şekil 3.28.a. DAAO (3ZNN) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: DAAO Enzimi 174°, Model IV_{ox} 176°)



Şekil 3.28.b. DAAO (3ZNN) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: DAAO Enzimi 174°, Model IV_{red} 155°)



Şekil 3.29.a. LAAO (4FEG) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LAAO Enzimi 165°, Model IV_{ox} 176°)



Şekil 3.29.b. LAAO (4FEG) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: LAAO Enzimi 165°, Model IV_{red} 155°)

Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)

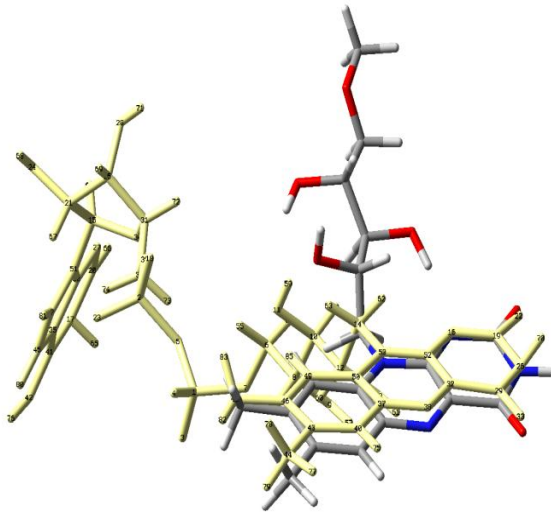
Hücrelerde anabolik tepkimelerde (yağ asidi ve nükleik asit sentezi gibi) indirgeyici olarak kullanılır. Enzimolojide ise flavin redüktaz (EC 1.5.1.30) Şekil 3.30'daki kimyasal reaksiyonu katalize eden enzimdir.



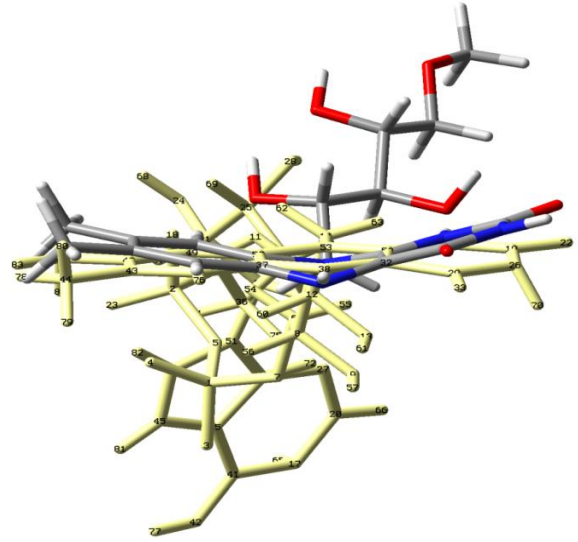
Şekil 3.30. NAD(P)H Katalizasyonu

Bu enzim oksidoredüktaz ailesine (özellikle de alıcı olarak NAD^+ veya NADP^+ ile CH-NH grubu donörlerine etki eden) aittir. Kloroplastlarda NADP fotosentezin ilk tepkimelerinde bir indirgeyici (elektron verici) olarak rol oynar ve fotosentezde ortaya çıkan NADPH'nin indirgeyici gücü, fotosentezin kalvin döngüsündeki biyosentetik tepkimelerde kullanılır. NADPH'nin hücrelerdeki başlıca kaynağı pentoz fosfat döngüsünün yükseltgenme evresidir. NADPH biyosentetik tepkimelerde ve reaktif oksijen türlerine karşı korunmada gereken indirgeme potansiyelini sağlar. NADPH ayrıca anabolik yollarda yağ asidi sentezi, kolesterol sentezi ve yağ asidi uzamasında kullanılır. Aromatik bileşikler, steroidler, alkoller ve bazı ilaçların Sitokrom P450 tarafından hidroksile edilmesi için gereken indirgeme potansiyeli de NADPH tarafından sağlanır.

1D4A PDB kristal kodlu NAD(P)H enziminin FAD halka bükülme açısı yükseltgenmiş modele çok yakındır ve aynı zamanda yükseltgenmiş modelle büyük oranda çakışmaktadır (Şekil 3.31.a). Bu durumda 1D4A PDB kristal kodlu NAD(P)H enziminin kristal formunda yükseltgenmiş halde bulunduğunu söyleyebiliriz. 1D4A PDB kristal kodlu NAD(P)H enzimi redüktaz olduğundan kristal yapısının reaksiyon bitiminde elde edildiğini de söyleyebiliriz.



Şekil 3.31.a. NAD(P)H Dehidrojenaz (1D4A) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} (1D4A) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1D4A Enzimi 179°, Model IV_{ox} 176°)

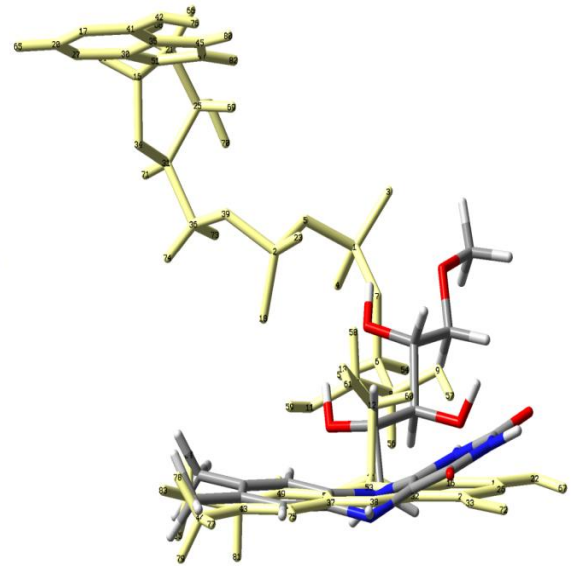
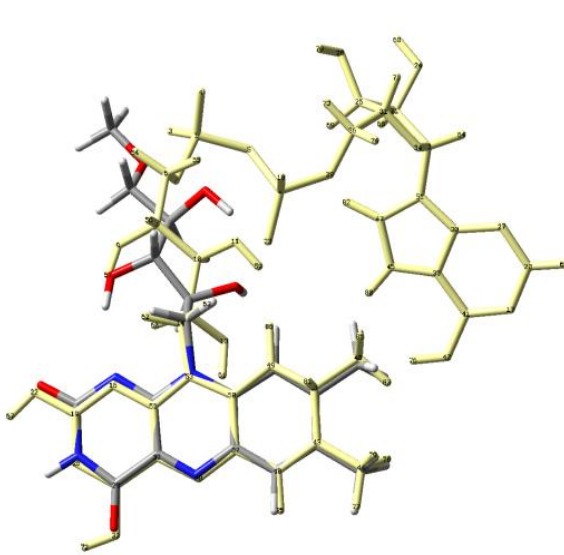


Şekil 3.31.b. NAD(P)H Dehidrojenaz (1D4A) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} (1D4A) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 1D4A Enzimi 179°, Model IV_{red} 155°)

Sülfhidril Oksidaz (SOX)

Sülfhidril Oksidazlar proteinlerdeki serbest sülfhidril gruplarını ve tiyol içeren küçük molekülleri, moleküler oksijen kullanarak elektron alıcısı olarak oksitleyebilen enzimlerdir. Birçok organizmanın hücre içi bölmelerinden SOX'lar izole edilmekle birlikte salgılanan SOX'lar da bilinmektedir. Son yıllarda SOX'lar üzerine artan sayıda bilimsel yayın ve patent başvurusu yayınlanmaktadır (Faccio vd., 2011).

4LDK PDB kristal kodlu enzimi yükseltgenmiş model ile çakışmıştır ve aralarında sadece 1° açı farkı bulunmaktadır. 4LDK kristal kodlu SOX enziminin kristal yapısında yükseltgenmiş formda olduğunu söyleyebiliriz.

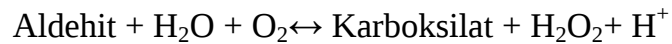


Şekil 3.32.a. Sülfhidril Oksidaz (4LDK) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4LDK Enzimi 177°, Model IV_{ox} 176°)

Şekil 3.32.b. Sülfhidril Oksidaz (4LDK) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4LDK Enzimi 177°, Model IV_{red} 155°)

Aldehit Oksidaz (AO)

Aldehid oksidaz 1, insanlarda AOX1 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Aldehid Oksidaz hidrojen peroksit üretir ve belirli koşullar altında süperoksit oluşumunu katalize edebilir (Şekil 3.33) (Maeda vd., 2012).

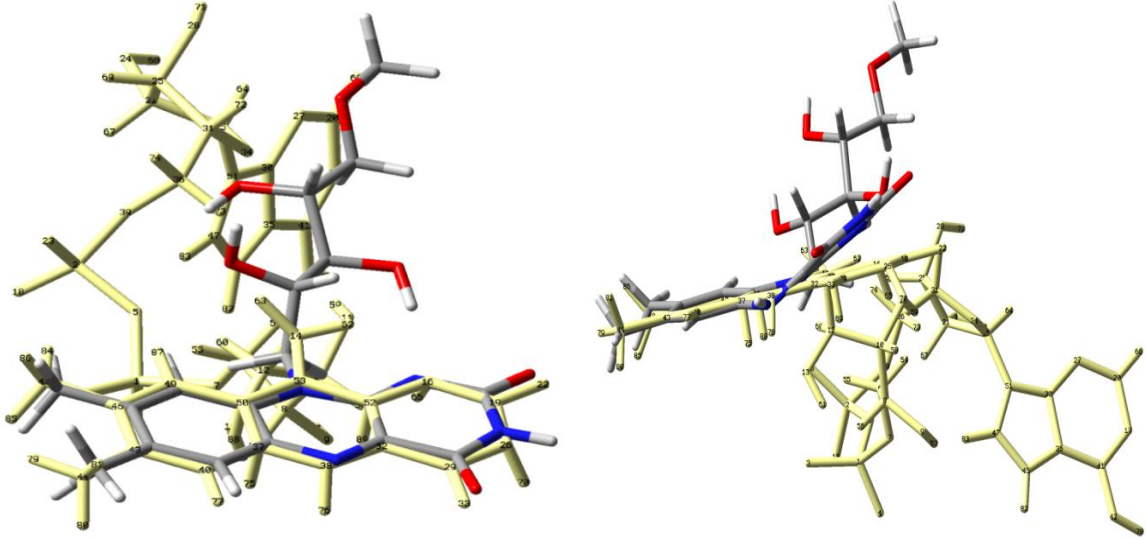


Şekil 3.33. Aldehit Oksidaz Katalizasyonu AO birçok organizmada dokuların sitozolik kompartımanında yer alan metabolizan bir enzimdir.

AO aldehitlerin karboksilik aside dönüşmesini katalize eder ve buna ek olarak, bazı heterosikliklerin hidrozilasyonunu da katalize eder. Hem Sitokrom P450 (CYP450) hem de MAO ara ürünlerinin oksidasyonunu katalizleyebilir. AO çok sayıda ilacın metabolizmasında çok önemli rol oynamaktadır. Aldehid Oksidaz kanser ve immünoşüpresif ilaçlar gibi çoklu aldehitleri ve azotlu heterosiklik bileşikleri okside ettiği karaciğerde konsantre olarak bulunur (Gordon vd., 1940). Bazı AO aktivitesi ciğerler (epitelyal hücreler ve alveoler hücreler), böbrekler ve gastrointestinal sistem (küçük ve kalın bağırsak) de dahil olmak üzere vücudun diğer bölgelerinde bulunur. AO geniş substrat özgülüğü nedeniyle karaciğerdeki birçok ilacı (N-1-metilnikotinamid, N-

metilftalazinyum, benzaldehit, retinal ve vanilin gibi) oksitleyebilir (Strelevitz vd., 2012). AO uyuşturucuların ve diğer bileşiklerin karaciğer temizliğine büyük ölçüde katkıda bulunur (Hartmann vd., 2012).

2E1Q PDB kristal kodlu Aldehit Oksidaz enzimi kristal yapıda 179,5° açı değeri vardır ve neredeyse düzlemseldir. Model yapılarımızdan yükseltgenmiş modelle çakışmaktadır. 2E1Q PDB kristal kodlu Aldehit Oksidaz enziminin kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz.



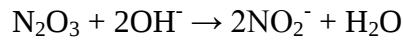
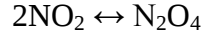
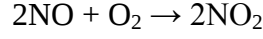
Şekil 3.34.a. Aldehit Oksidaz (2E1Q) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2E1Q Enzimi 179,5°, Model IV_{ox} 176°)

Şekil 3.34.b. Aldehit Oksidaz (2E1Q) Enzimi (sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması(FAD Halkası Bükülme Açısı: 2E1Q Enzimi 179,5°, Model IV_{red} 155°)

Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

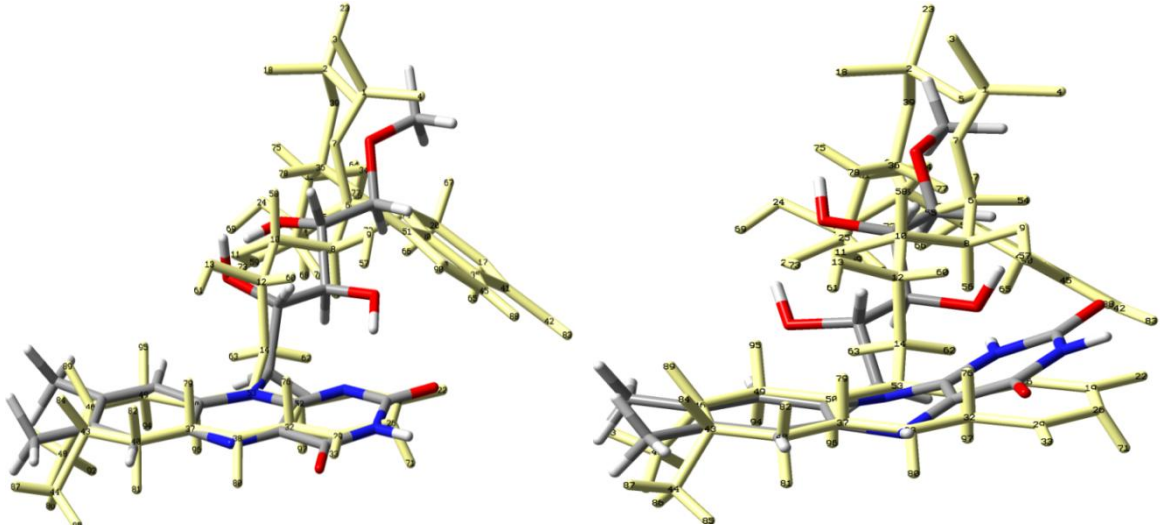
Nitrik oksit (NO) son yıllarda tanınan birçok biyolojik olayda önemli rolü olan ve çok kısa yarı ömürlü serbest bir radikaldir. NO ve diğer bir son ürün olan sitrüllin argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. NOS'ın genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan konstitutif endotelial izoform (eNOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen konstitutif nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (iNOS)'dur. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca⁺⁺ kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın iNOS bundan bağımsızdır (Çekmen vd., 2001). NOS moleküler oksijen, L-arjinin ve nikotinamit dinükleotit fosfat

(NADPH) kullanarak NO, sitrülin ve NADP⁺ oluşumuna neden olur. Bu olaylar sırasında NOS flavin FMN, FAD, kalmodulin ve tetrahidrobiyopterin gibi kofaktörler ile kalsiyum ve demir gibi katyonlara gerek duyar. NOS enzimleri aracılığı ile oluşan NO biyolojik dokularda bir dizi reaksiyona girer. Bunlar şekil 3.35'deki gibi nitrit ve nitrat oluşumu ile ilgili olan reaksiyonlardır (Tunçtan, 2005).



şekil 3.35. Nitrit ve Nitrat Oluşum Reaksiyonları

1F2O PDB kristal kodlu NOS enzimi yükseltgenmiş modelle benzerlik göstermektedir. Nitrit oksit bileşiğinin izoalloksazin halkasındaki oksijenler halka düzlemine dik olarak bulunmaktadır. Gauswiev programı görüntüleme yaparken bağ uzunluluklarına göre uygun yerlere hidrojen eklemektedir. Ancak 1F2O PDB kristal kodlu NOS enziminde hidrojenler uygun konformasyonda eklenmemişlerdir. Halka düzleminde hidrojenlerin düzleme dik bulunması kararlı bir durum değildir.

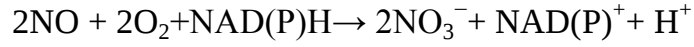


şekil 3.36.a. Nitrik Oksit Sentaz (1F2O) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açışı: 1F2O Enzimi 173 , Model IV_{ox} 176 )

şekil 3.36.b. Nitrik Oksit Sentaz (1F2O) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açışı: 1F2O Enzimi 173 , Model IV_{red} 155 )

Nitrik Oksit Dioksijenaz (NOD)

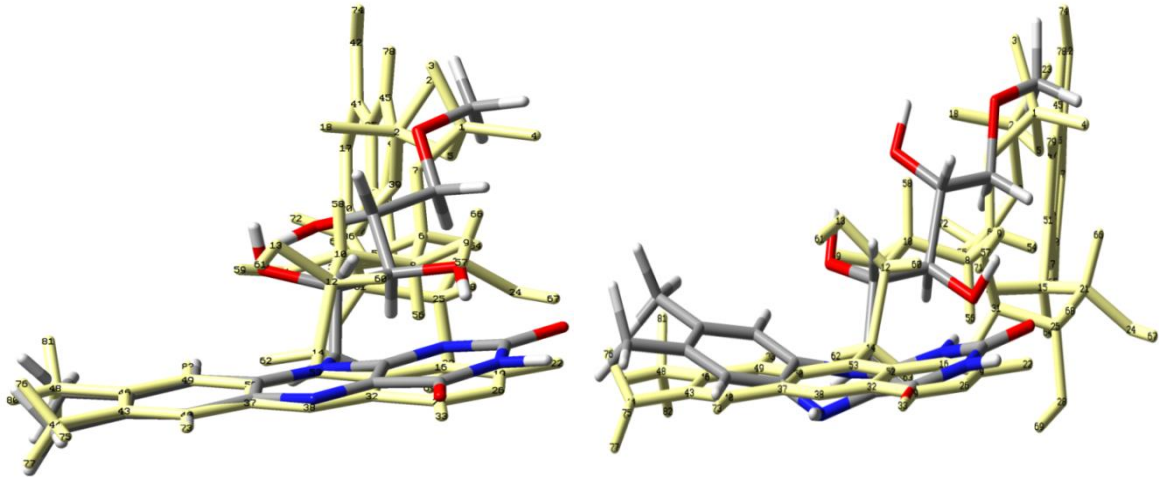
Nitrik Oksit Dioksijenaz (EC1.14.12.17) nitrik oksiti nitrata dönüştüren bir katalizördür. NOD tarafından katalizlenen net reaksiyon Şekil 3.37'deki gibidir.



Şekil 3.37. NOD Katalizasyonu

Nitrik oksit düz kas vazodilatasyonu, trombosit parçalanması, nörotransmisyon ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı bağışıklık sağlamak gibi çok çeşitli fizyolojik proseslere entegre olan her yerde bulunan küçük bir moleküldür (Fang, 2004). NO'nun potansiyel ölümcül etkisinden dolayı NO'nun nitrata dönüşmesini katalize edebilen Nitrik Oksit Dioksijenazın evrimi hücrelere büyük fayda sağlamıştır. NO Dioksijenaz oksidoredüktaz ailesine aittir. Nitrik Oksit Dioksijenaz oksijen depolaması ve taşınması için hemoglobin/miyogloblin fonksiyonunun analogunu sağlamaya yardımcı olmaktadır. Günümüzde NOD'ın NO toksisitesini (nitrosatif stres) önlemek ve NO sinyalini düzenlemek gibi iki önemli fonksiyonu vardır (Forrester ve Foster, 2012). NOD'ların inhibitörleri ise mikrobiyal antibiyotikler, anti-tümör ajanları ve NO sinyalleme modulatorleri olarak geliştirilmektedir (El Hammi, 2011). NO dioksijenaz inhibitörünün bugüne kadarki en tanınmış sınıfı imidazol antibiyotikleridir.

4EH1 PDB kristal kodlu NOD enzimi model yapılarımızdan yükseltgenmiş modele benzediğinden (Şekil 3.38.a) kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz.



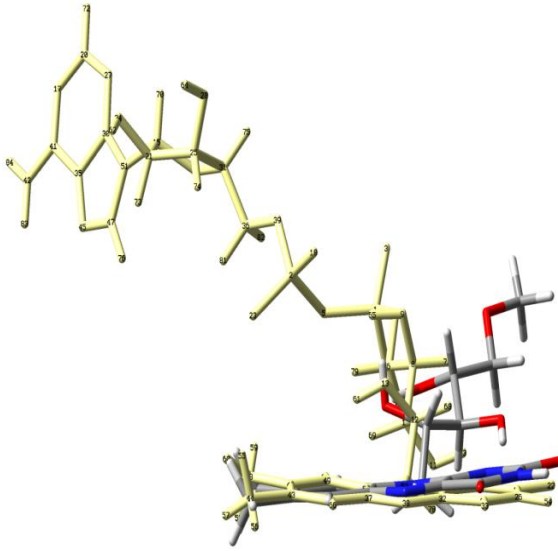
Şekil 3.38.a. Nitrik Oksit Dioksijenaz (4EH1) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4EH1 Enzimi 178°, Model IV_{ox} 176°)

Şekil 3.38.b. Nitrik Oksit Dioksijenaz (4EH1) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 4EH1 Enzimi 178°, Model IV_{red} 155°)

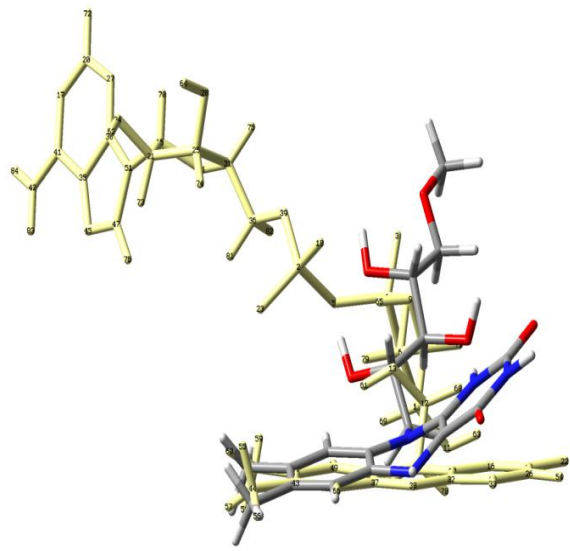
Renalaz (Katekolamin Oksidaz)

Renalaz FAD'li amin oksidaz enzimidir ve insanlarda RNLS geni tarafından kodlanır. Renelaz böbrekten kana salgılanmaktadır. Renalaz'ın kan dolaşımında adrenalin (epinefrin) ve noradrenalin (norepinefrin) gibi katekolaminleri indirgediği iddia edilmektedir. Dr Desir Yale Tıp Fakültesi'ndeki laboratuvarında 2005 yılında renalazı keşfetmiş, adlandırmış ve insan böbreğinde kan basıncının düzenlenmesi için renalazın salınmasını önermiştir (Desir, 2009). Renalazın katekolamin substratlarını yükseltgemesi tartışmalıdır (Baroni vd., 2013). Katekolamin oksidasyonu için H_2O_2 'nin saptanması kanıt olmasına rağmen katekolaminler doğal bir bozunma reaksiyonunda O_2 varlığında H_2O_2 yaymaktadır. 2013 yılında, renalazın, β -NAD⁺'a α -NADH'yi (normal formundaki β -anomer) okside ettiği ve O_2 'nin H_2O_2 'ye eş zamanlı olarak indirgendiği iddia edilmiştir (Beaupre vd., 2013). Ağır kronik böbrek hastalığı (son dönem böbrek hastalığı) olan hastalarda Renalaz seviyeleri belirgin şekilde azalmaktadır. Ayrıca Renelaz'ın Tip 1 diyabetle de ilişkisi vardır.

2ZCD PDB kristal kodlu Katakolomin Oksidaz enzimi model yapılarımızdan yükseltgenmiş modele benzediğinden (Şekil 3.39.a) kristal yapısında yükseltgenmiş formda bulunduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 3.39.a. Katekolamin Oksidaz (2ZCD) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{ox} Karşılaştırılması, (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2ZCD Enzimi 173°, Model IV_{ox} 176°)



Şekil 3.39.b. Katekolamin Oksidaz (2ZCD) Enzimi (Sarı) ile Model IV_{red} Karşılaştırılması (FAD Halkası Bükülme Açısı: 2ZCD Enzimi 173°, Model IV_{red} 155°)

Özetle, FAD'te kovalent bağlanma motifi içermeyen enzimlerle Model IV_{ox} ve IV_{red} karşılaştırıldığında 4FEG PDB kristal kodlu LAAO enzimi haricindekilerin yükseltgenmiş modelle büyük oranda çakıştıkları ve FAD halka bükülme açıları arasındaki farkların çok az olduğu gözlenmiştir. 4FEG PDB kristal kodlu LAAO enzimi ile indirgenmiş modelin bükülme yönleri farklılık göstermekle birlikte düzlemsellikten sapma açıları benzerdir.

Tez çalışmasında kullanılan C8'den kovalent motif içeren ve içermeyen FAD'li enzimlerden oksidaz ya da redüktaz olsun 4FEG PDB kristal kodlu LAAO ve 2Z5X PDB kristal kodlu MAO A haricindekilerin flavin halkasının düzlemsele yakın olduğunu görüyoruz. Bu durum, halka bükülme açısını etkileyen süstitüent etkisi dışında enzimlerin aktif bölgesindeki diğer aminoasit grupları ve su moleküllerinden kaynaklanabilecek başka etkiler de olabileceğini düşündürmüştür. 4FGL PDB kristal kodlu Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz enziminin kristal formunda indirgenmiş formda olduğu belirtilmiştir (Leung ve Shilton,2013). Ancak tez çalışmamız ve literatür taraması ışığında 4FGL PDB kristal kodlu Ribosildihidronikotinamid Dehidrojenaz enziminin yükseltgenmiş modelle gerek FAD halka bükülme açısı gerekse büyük oranda çakışmasından dolayı kristal formunda yükseltgenmiş formda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Ayrıca, inhibitör yaklaşma yönünün FAD bükülme yönüne etkisi de araştırılmıştır. Bunun için, 3ZNN PDB kristal kodlu DAAO, 4FEG PDB kristal kodlu LAAO ve 2Z5X PDB kristal kodlu MAO A enzimlerine inhibitör yaklaşma yönleri incelendiğinde 3ZNN PDB kristal kodlu DAAO enziminde inhibitör re yüzden yaklaşmakta ve FAD halkası düzlemseldir. MAO enziminde inhibitör FAD halkasının re yüzünden yaklaşmakta ve FAD halka bükülmesi si yöne doğrudur. LAAO enziminde FAD halkası re yüze doğru bükülmekle birlikte inhibitör enzime C7 ve C8' e bağlı gruplar üzerinden yaklaşmaktadır. İnhibitörün bir bölümü FAD'ın si yüzüne dönüktür. 3ZNN PDB kristal kodlu DAAO enzimi düzlemsel olduğundan reaksiyon başlangıcında veya reaksiyonun geriye yükseltgendiğinde elde edilmiştir. İnhibitörün FAD halkasına yaklaşma yönünün enzimin halka bükülme yönü ve derecesi üzerinde etkili olabileceği düşüncesi heyecan vericidir. Ancak konunun açıklığa kavuşabilmesi için daha fazla enzim ile karşılaştırmalar yapılmalıdır.

4.GENEL DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında süstitüe flavin yapıları kuantum kimya yöntemleriyle modellenerek, FAD halkasına ve flavin redoks tepkimesine süstitüent etkisi incelenmiştir. FAD'te kovalent bağlı olan ve kovalent bağlı olmayan birçok enzim model yapılarla karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular özetlenecek olursa:

* FAD halkasının X ve Y pozisyonuna çeşitli süstitüentler takılarak 18 adet model yapı oluşturulmuştur. Bu model yapılar yoğunluk fonksiyoneli teorisi M06-2X/6-31+G(d,p) yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda 9 adet yükseltgenmiş modelin halka konjugasyonunun diğer etkileşimlere baskın geldiği ve bunun sonucunda FAD halkasının düzlemsel olduğu ya da düzlemsellikten en az 3° en fazla 10° arasında sapma gösterdiği tespit edilmiştir.

* İndirgenmiş durumdaki flavinin X-ışını kristalografik analizinde, 1,5-dihidroflavinin merkezi pirazin halkası 8 π elektron içerdiğinden, bir Hückel antiaromatik sistemi olduğu ve flavin hidrokinon bu antiaromatik bozulmayı azaltmak için N5-N10 eksenini boyunca katlanarak, "bükülmüş" veya "kelebek" konformasyona dönüştüğü vurgulanmıştır (Rizzo, 2001). Bu konu üzerine yapılan model çalışmalarında;

- İndirgenmiş olan 9 adet model yapının N5-N10 ekseninde en az 24° en fazla 29° arasında FAD halka bükülme açısına sahip olduğu tespit edilmekle birlikte 2 adet model yapı indirgenmiş olmasına karşın şaşırtıcı bir şekilde düzlemsel geometride bulunduğu tespit edilmiştir. Küçük süstitüent içeren bu model yapıların düzlemsel olmasının, FAD halka bükülme açısına süstitüent etkisinin bir göstergesi olduğu görülmektedir.

- Y pozisyonunda aynı süstitüentler bağlı olduğunda modellerin FAD halkasının bükülme açılarının birbirlerine yakın olması ve X pozisyonunda aynı süstitüentler bağlı olduğunda model yapıların FAD halkasının bükülme açılarının birbirlerine yakın (Model III hariç) olması, X ve Y'ye bağlı süstitüentlerin FAD halkasının bükülme açısını etkilediğinin diğer bir göstergesidir.

- İndirgenmiş ve yükseltgenmiş modellerde X pozisyonuna bağlanan süstitüentlere oranla Y pozisyonuna bağlanan süstitüentlerin FAD halka bükülme açısını önemli oranda etkilediği tespit edilmiştir. Kovalent flavinasyon protein kararlılığını artırabilir, kofaktör bağlanmasını sağlar ve kofaktörü nispeten yüksek bir redoks potansiyeline indükleyebilmektedir (Heuts vd.,2009). Bütün model yapılar arasında kovalent flavinasyon içeren Model III en yüksek indirgenme eğilimine sahiptir. Bunun en

önemli sebebi kovalent flavinasyonun halkaya kattığı kararlılıktır. Diğer kovalent flavinasyon içeren modellere göre daha yüksek indirgenme eğilimi göstermesinin sebebi ise Y pozisyonuna bağlı olan sübstitüentin halka ile yaptığı güçlü etkileşimler olduğu değerlendirilmiştir.

-Özet olarak kovalent flavinasyon ve X, Y pozisyonuna bağlı sübstituent FAD halkasının şeklini, bükülme yönünü ve indirgenme eğilimini etkilediği tespit edilmiştir.

* Bir bileşiğin kristal yapısında yükseltgenmiş formda mı indirgenmiş formda mı bulunduğu bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında bileşiklerin kristal yapıdaki formlarının tespit edilmesi için optimize edilen modellerle yapılan karşılaştırmalar sonucunda;

- FAD'te 8a-Cys'den kovalent bağlanma motifi içeren 6 adet enzimle model yapılarımızın yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda 1S3B ve 2Z5X PDB kristal kodlu MAO enzimleri haricindeki enzimlerin gerek FAD halka bükülmesi gerekse enzimlerin çakışması bakımından yükseltgenmiş modele benzediklerinden dolayı kristal yapılarında yükseltgenmiş formda bulunduklarını söyleyebiliriz.

- FAD'te kovalent bağlanma motifi içermeyen 14 adet enzimle model yapılarımızın yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda 4FEG PDB kristal kodlu LAAO enzimi haricindekilerin yükseltgenmiş modelle büyük oranda çakıştıkları ve FAD halka bükülme açıları arasındaki farkların da çok az olduğu ve bu sebeplerden kristal yapılarında yükseltgenmiş formda bulundukları değerlendirilmiştir.

- Bu tezde incelenen tüm flavoenzimler içinde yalnızca LAAO ve MAO indirgenmiş FAD halinde kristal yapıya sahiptir. Diğer tüm enzimlerde FAD yükseltgenmiş formdadır.

* Elde edilen sonuçlar ve yapılan değerlendirmelerle birlikte;

- C8'den kovalent motif içeren ve içermeyen FAD'lı enzimlerden oksidaz ya da redüktaz olsun birçok enzimin FAD halkasının düzlemsele yakın olması,

- 4FEG PDB kristal kodlu LAAO ve 2Z5X PDB kristal kodlu MAO enzimlerinin oksidaz olmalarına karşın düzlemsel olmamaları ve

- Ters yönde bükülmelerine rağmen birbirlerine yakın halka bükülme açılarına sahip olmaları, FAD halkasının bükülme açısının üzerinde başka etkilerin de olabileceğini düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

Akyüz, M.A., Erdem, S.S., (2013). Computational modeling of the direct hydride transfer mechanism for the MAO catalyzed oxidation of phenethylamine and benzylamine: ONIOM (QM/QM) calculations. *J. Neural Transm.*, 120, 937-945.

Augustin, P., Hromic, A., Pavkov-Keller, T., Gruber, K., Macheroux, P., (2016). Structure and biochemical properties of recombinant human dimethylglycine dehydrogenase and comparison to the disease-related H109R variant. *Febs J.*, 283, 3587-3603.

Bach, A.W.J., Lan, N.C., Abell, C.W., Bembenek, M.E., Kwan, S.W., Seeburg, P.H., Shih, J.C., (1988). cDNA Cloning of Human Liver Monoamine Oxidase A and B: Molecular Basis of Differences in Enzymatic Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 4934-4938.

Barile, M., Giancaspero, T.A., Brizio, C., Panebianco, C., Indiveri, C., Galluccio, M., Vergani, L., Eberini, I., Gianazza, E., (2013). Biosynthesis of flavin cofactors in man: implications in health and disease. *Current Pharmaceutical Design.*, 19(14), 2649–2675.

Bannwarth, M., Heckmann-Pohl, D., Bastian, S., Giffhorn, F., Schulz, G.E., (2006). Reaction Geometry and Thermostable Variant of Pyranose 2-Oxidase from the White-Rot Fungus *Peniophora* sp. *Biochemistry*, 45, 6587-6595.

Baroni, S., Milani, M., Pandini, V., Pavesi, G., Horner, D., Aliverti, A., (2013). Is renalase a novel player in catecholaminergic signaling? The mystery of the catalytic activity of an intriguing new flavoenzyme. *Current Pharmaceutical Design.* 19(14), 2540–2551.

Beaupre, B.A., Carmichael, B.R., Hoag, M.R., Shah, D.D., Moran, G.R., (2013). Renalase is an α -NAD(P)H oxidase/anomerase. *Journal of the American Chemical Society.* 135 (37), 13980–13987.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., (2002). *Biochemistry*, 5th Edition, International Edition, New York, USA.

Berkholz, D.S., Faber, H.R., Savvides, S.N., Karplus, P.A., (2008). Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 382, 371-384.

Binda, C., Wang, J., Pisani, L., Caccia, C., Carotti, A., Salvati, P., Edmondson, D.E., Mattevi, A., (2007). Structures of Human Monoamine Oxidase B Complexes with

Selective Noncovalent Inhibitors: Safinamide and Coumarin Analogs. *J.Med.Chem.*, 50(23), 5848-5852.

Binda, C., Li, M., Herzig, Y., Sterling, J., Edmondson, D.E., Mattevi, A., (2004). Crystal Structures of Monoamine Oxidase B in Complex with Four Inhibitors of the N-Propargylaminoindan Class.*J.Med.Chem.*, 47, 1767-1774.

Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubálek, F., Edmondson, D.E., Mattevi, A., (2001). Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nature Structural Biology*, 9, 22–26.

Binda, C., Coda, A., Angelini, R., Federico, R., Ascenzi, P., Mattevi, A., (1999). A 30-angstrom-long U-shaped catalytic tunnel in the crystal structure of polyamine oxidase. *Structure Fold.Des.*, 7, 265-276.

Bonivento, D., Milczek, E. M., McDonald, G. R., Binda, C., Holt, A., Edmondson, D. E., Mattevi, A., (2010). Potentiation of Ligand Binding Through Cooperative Effects in Monoamine Oxidase B. *J.Biol.Chem.*, 285, 36849-36855.

Carrell, C.J., Bruckner, R.C., Venci, D., Zhao, G., Jorns, M.S., Mathews, F.S., (2007). NikD, an unusual amino acid oxidase essential for nikkomycin biosynthesis: structures of closed and open forms at 1.15 and 1.90 Å resolution. *Structure*, 15, 928-941.

Carter, P., Wells, J. A., (1988). Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature*, 332, 564–568.

Chajkowski-Scarry, S., Rimoldi, J. M., (2014). Monoamine oxidase A and B substrates: probing the pathway for drug development. *Future Med. Chem.*, 6(6), 697–717.

Chen, Z., Trickey, P., Jorns, M.S., Mathews, F.S., (Yayınlanmadı, Released Date: 2007-02-06). Structure of the complex of monomeric sarcosine with its substrate analogue inhibitor 2-furoic acid at 1.3 Å resolution.

Chen, Y., Jie, W., Yan, W., Zhou, K., Xiaou, Y., (2012). Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1): A potential molecular target for tumor therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 22(1), 53-59.

Chen, Z.W., Koh, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J.J., Bartsch, R.G., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., Mathews, F.S., (1994). The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science*, 266, 430-432.

Chiba, K., Trevor, A., Castagnoli, N., (1984). Metabolism of the neuro toxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 120, 574–578.

Chlumsky, L.J., Zhang, L., Jorns, M.S., (1995). Sequence analysis of sarcosine oxidase and nearby genes reveals homologies with key enzymes of folate one-carbon metabolism., *J. Biol. Chem.*, 270, 18252-18259.

Colibus, L.D., Li, M., Binda, C., Lusting, A., Edmondson, D.E., Mattevi, A., (2005). Three-Dimensional Structure of Human Monoamine Oxidase A (MAO-A): Relation to the Structures of Rat MAO and Human MAO-B. *PNAS*, 102, 12684-12689.

Collard, F., Zhang, J., Nemet, I., Qanungo, K.R., Monnier, V.M., Yee, V.C., (Yayınlanmadı, Released Date: 2008-07-22). Crystal structure of the deglycating enzyme fructosamine oxidase (FAOX-II).

Covitz, T., Westheimer, F.H., (1963). The hydrolysis of methylethylene phosphate: steric hindrance in general base catalysis., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1773–1777.

Cusanovich, M.A., Meyer, T.E., Bartsch, R.G., (1991). Flavocytochromes C. In: Mueller, F., ed. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, vol II., Boca Raton Florida, CRC Press., pp 377-393.

Çakır, K., (2016). Monoamin Oksidaz (Mao) Enzimlerinin Hidrür Transferi Mekanizması Tek Basamaklı mı Çok Basamaklı mıdır?, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Çekmen, M.B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A.D., Gözükara, E.M., (2001). Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Pediatr.*, 10(4), 226-235.

Daprigh, S., Komaromi, I., Byun, K.S., Morokuma, K., Frisch, M. J., (1999). A New ONIOM Implementation in Gaussian98. Part I. The Calculation of Energies, Vibrational Frequencies and Field Derivatives. *Journal of Molecular Structure Theochem.*, 461-462, 1-21.

Desir, G.V., (2009). Regulation of blood pressure and cardiovascular function by renin. *Kidney International*. 76 (4), 366–370.

Devlin, T.M., (2011). *Textbook of Biochemistry: with Clinical Correlations* (7th ed.). Hoboken, N.J., John Wiley & Sons.

Dijkman, W.P., Gonzalo, G., Mattevi, A., Fraaije, M.W., (2013). Flavoprotein oxidases: classification and applications, *Mini Review, Appl Microbiol Biotechnol.*, 97, 5177–5188.

Dong, M., Ramadan, S., Thorpe, C., Bahnson, B., (Yayınlanmadı, Released Date:2014-07-16). FAD-linked sulfhydryl oxidase ALR mutation.

Dudley, K.H., Ehrenberg, A., Hemmerich, P., Müller, F., (1964). Spektren und strukturen der am flavin-redox system beteiligten partikein. *Helv Chim Acta.*, 47, 1354–1383.

Edmondson, D.E., (1983). *Radicals in Biochemistry*, 108, ISBN: 978-3-540-11846-6 Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Edmondson, D.E., Ghisla, S., (1999). Electronic effects of 7 and 8 ring substituents as predictors of flavin oxidation–reduction potentials. In *Flavins and Flavoproteins* (Ghisla S, Kroneck P, Macheroux P & Sund H, eds). Rudolf Weber Agency for Scientific Publications, Berlin., 71-76.

Edmondson, D.E., Binda, C., Mattevi, A., (2004). The FAD Binding Site of Human Monoamine Oxidase A and B. *NeuroTox.*, 25, 63-72.

Edmondson, D.E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., Hubalek, F., (2004). Structure and Mechanism of Monoamine Oxidase. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1983-1993.

Edmondson, D.E., Binda, C., Mattevi, A., (2007). Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464, 269-276.

Edmondson, D.E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A.K., Mattevi, A., (2009). Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. *Biochemistry*, 48, 4220–4230.

El Hammi, E., Warkentin, E., Demmer, U., Limam, F., Marzouki, N.M., Ermler, U., Baciou, L., (2011). Structure of *Ralstonia eutropha* flavohemoglobin in complex with three antibiotic azole compounds. *Biochemistry*. 50 (7), 1255–1264.

Engin, H., (2015). Monoamin Oksidaz B (Mao B) Katalizleme Tepkimesine Aktif Bölgenin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Erdem, S., (2006). Hesapsal Organik Kimya Ders Notları, <http://fbe.marmara.edu.tr>.

Erkişi, A., (2007). Bazı Bileşiklerin Elektronik ve Titreşim Özelliklerinin Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi ile İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Faccio, G., Nivala, O., Kruus, K., Buchert, J., Saloheimo, M., (2011). Sulfhydryl oxidases: sources, properties, production and applications. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 91(4), 957-966.

Faig, M., Bianchet, M.A., Talalay, P., Chen, S., Winski, S., Ross, D., Amzel, L.M., (2000). Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductases: species comparison and structural changes with substrate binding and release. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 97, 3177-3182.

Fan, F., Ghanem, M., Gadda, G., (2004). Cloning, sequence analysis and purification of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*: a bacterial enzyme involved in osmotic stress tolerance. *Arch Biochim Biophys.*, 421, 149–158.

Fang, F.C., (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (10), 820–832.

Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A., (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, 38, D211–222.

Fitzpatrick, P.F., (2004). Carbanion versus Hydride Transfer Mechanisms in Flavoprotein-Catalyzed Dehydrogenations. *Bioorganic Chem.*, 32, 125-139.

Fitzpatrick, P.F., (2010). Oxidation of amines by flavoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 493, 13–25.

Forrester, M.T., Foster, M.W., (2012). Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* 52 (9), 1620–1633.

Fox, J.W., (2012). A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon.*, 62, 75–82.

Fowler, C.J., Benedetti, M.S., (1983). The Metabolism of Dopamine by Both Forms of Monoamine Oxidase in the Rat Brain and Its Inhibition by Cimoxatone. *J. Neurochem.*, 40, 1534–1541.

Fraaije, M.W., Van den Heuvel, R.H.H., Van Berkel, W.J.H., Mattevi, A., (1999). Covalent flavinylation is essential for efficient redox catalysis in vanillyl-alcohol oxidase. *J. Biol. Chem.* 274, 35514–35520.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, N. J., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. Gaussian 09, Revision A.1, (2009) Gaussian, Inc., Wallingford CT.

Gaál, J., Hermecz, I., (1993). Pharmacology and Clinical Use in Neuro degenerative Disorders, in *Inhibitors of Monoamine Oxidase B.* Szelenyi, I., Ed., Birkhauser, Boston, Berlin.

Gadda, G., (2012). Oxygen activation in flavoprotein oxidases: the importance of being positive. *Biochemistry*, 5, 2662–2669.

GaussView, Version 5, Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. *Semichem Inc.*, Shawnee Mission KS, 2009.

Gordon, A.H., Green, D.E., Subrahmanyam, V., (1940). Liver aldehyde oxidase. *The Biochemical Journal.*, 34 (5), 764–774.

Guo, P.C., Ma, Y.L., Jiang, Y.L., Wang, S.J., Bao, Z.Z., Yu, X.J., Chen, Y., Zhou, C.Z., (2012). Structure of yeast sulfhydryl oxidase Erv1 reveals electron transfer of the disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem.*, 42, 3496–34969.

Gürünlü, H.,(2008). Kübik Gan (001) Yüzeyinin Elektronik Yapısı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Hartmann, T., Terao, M., Garattini, E., Teutloff, C., Alfaro, J.F., Jones, J.P., Leimkühler, S., (2012). The impact of single nucleotide polymorphisms on human aldehyde oxidase. *Drug Metabolism and Disposition*. 40 (5), 856–864.

Hayward, D.O., (2002). *Quantum Mechanics*., Royal Society of Chemistry, United Kingdom.

Hemmerich, P.,(1976). The present status of flavin and flavoenzyme chemistry. *Prog Chem. Org Nat Prod*, 33, 451–524.

Hemmerich, P.,Massey, V.(1982). In *Oxidation and Related Redox System*. King, T.E., Mason, H.S.,Morrison, M., Eds., Pergamon Press, New York, 379-405.

Heuts, D.P.H.M., Scrutton, N.S., McIntire, W.S. ve Fraaije, M.W., (2009). What's in a covalent bond? On the role and formation of covalently bound flavin cofactors., *Review Article, FEBS Journal*, 276, 3405–3427.

Hopkins, S.C., Heffernan, M.L.R., Saraswat, L.D., Bowen, C.A., Melnick, L., Hardy, L.W., Orsini, M.A., Allen, M.S., Koch, P., Spear, K.L., Foglesong, R.J., Soukri, M., Chytil, M., Fang, Q.K., Jones, S.W., Varney, M.A., Panatier, A., Oliet, S.H.R., Pollegioni, L., Piubelli, L., Molla, G., Nardini, M., Large, T.H., (2013). Structural, Kinetic, and Pharmacodynamic Mechanisms of D-Amino Acid Oxidase Inhibition by Small Molecules., *J.Med.Chem.*, 56, 3710.

Hsu, J.T.,Wang, H.C., Chen, G.W.,Shih, S.R., (2006). Antiviral drug discovery targeting to viral proteases. *Current Pharmaceutical Design*., 12 (11), 1301–1314.

Imagawa, T., Tsurumura, T., Sugimoto, Y., Aki, K., Ishido, K., Kuramitsu, S., Tsuge, H., (2011). Structural Basis of Free Reduced Flavin Generation by Flavin Reductase from *Thermus Thermophilus*. *J.Biol.Chem.*, 286(51), 44078–44085.

Kenney, W.C., Singer, T.P.,(1977). Evidence for a thioether linkage between the flavin and polypeptide chain of Chromatium cytochrome C₅₅₂, *J. Biol Chem*, 252, 4767-4772.

Kiess, M., Hecht, H.J., Kalisz, H.M., (1998). Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with the other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur J Biochem.*, 252, 90–99.

- Kim H.J., Winge D.R., (2013). Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1827 (5), 627–636.
- Koppitz, M., Eis, K., (2006). Automated medicinal chemistry. *Drug Discov. Today*, 11(11-12), 561–568.
- Kusakabe, H., Kuninaka, A., Yoshino, H., (1982). Purification and properties of a new enzyme, glutathione oxidase from *Penicillium* sp.K-6-5. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2057–2067.
- Kvalnes-Krick, K., Jorns, M.S., (1991). Role of the covalent and noncovalent flavins in sarcosine oxidase. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Muller, F., ed), 425–435, CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Kyte, J., (1995). *Mechanism in Protein Chemistry*. New York, Garland Publishing.
- Lang, H., Polster, M., Brandsch, R., (1991). Rat liver dimethylglycine dehydrogenase: flavinylation of the enzyme in hepatocytes in primary culture and characterization of a cDNA clone. *Eur. J. Biochem.*, 198, 793–799.
- Leung, K.K., Shilton, B.H., (2013). Chloroquine Binding Reveals Flavin Redox Switch Function of Quinone Reductase 2. *J. Biol. Chem.*, 288(16), 11242–11251.
- Leung, K.K., Shilton, B.H., (2015). Quinone Reductase 2 is an Adventitious Target of Protein Kinase CK2 Inhibitors TBBz (TBI) and DMAT. *Biochemistry*, 54, 47–59.
- Lew, W., Chen, X., Kim, C.U., (2000). Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Curr. Med. Chem.*, 7(6), 663–72.
- Li, G., Glusac, K.D., (2008). *Journal of Physical Chemistry*, A. 112, 4573.
- Li, M., Binda, C., Mattevi, A., Edmondson, D.E., (2006). Functional role of the aromatic cage in human monoamine oxidase B: Structures and catalytic properties of Tyr435 mutant proteins. *Biochemistry*, 45, 4775–4784.
- Liao, S., Dulaney J.T., Williams-Ashman, H.G., (1962). "Purification and properties of a flavoprotein catalyzing the oxidation of reduced ribosyl nicotinamide". *J. Biol. Chem.*, 237, 2981–2987.

- Lienhart, W.D., Gudipati, V., Macheroux, P., (2013). The human flavoproteome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 535 (2), 150–162.
- Lu, X., Rodriguez, M., Silverman, R.B., Vintem A.P.B., Ramsay, R.R., (2002). Irreversible inactivation of mitochondrial monoamine oxidase. *Flavins and flavoproteins*, Agency for Scientific Publications, Vienna, Avusturya.
- Lundblad, R.L., (2004). *Chemical Reagents for Protein Modification* CRC PressInc.
- Ma, J.,Yoshimura, M., Yamashita, E., Nakagawa, A., Ito, A., Tsukihara, T., (2004). Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J.Mol.Biol.*,338, 103–114.
- Mack, M.,Grill, S., (2006). Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl.Microbiol Biotechnol.*, 71, 265–275.
- Macheroux, P., Kappes,B., Ealick, S., (2011). Flavogenomics—a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. Review Article, *FEBS Journal*, 278, 2625–2634.
- Madeira, C., Freitas, M.E., Vargas-Lopes, C., Wolosker, H., Panizzutti, R., (2008). Increased brain d-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 101 (1–3), 76–83.
- Maeda, K., Ohno, T., Igarashi, S., Yoshimura, T., Yamashiro, K., Sakai, M., (2012). Aldehyde oxidase 1 gene is regulated by Nrf2 pathway. *Gene.*, 505 (2), 374–378.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C.,(2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.*, 16 (10), 577-586.
- McDonald, A.G.,Boyce, S., Tipton, K.F., (2009). ExplorEnz: The Primary Source of the IUBMB Enzyme List.*Nucl.Acids Res.*, 37 (suppl 1), 593-597.
- Mewies, M.,Mcintire, W.S.,Scrutton, N.S., (1998). Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes:The current state of affairs.*Cambridge University Press.,Protein Science*, 7, 7-20.
- Meyer, T.E., Bartsch, R.G., Caffrey, M.S., Cusanovich, M.A., (1991a). Redox potentials of flavocytochromes c from the phototrophic bacteria, *Chromatium winosum* and *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Arch Biochem Biophys*, 287, 128-134.

Meyer, T.E., Bartsch, R.G., Cusanovich, M.A., (1991b). Adduct formation between sulfite and the flavin of phototrophic bacterial flavocytochromes c. Kinetics of sequential bleach, recolor, and rebleach of flavin as a function of pH., *Biochemistry*, 30, 8840-8845.

Meyer, D., Neumann, P., Koers, E., Sjuts, H., Ludtke, S., Sheldrick, G.M., Ficner, R., Tittmann, K., (2012). Unexpected tautomeric equilibria of the carbanion-enamine intermediate in pyruvate oxidase highlight unrecognized chemical versatility of thiamin., *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, 109, 10867-10872.

Michaelis, L., Schubert, M. P., Smythe, C.V., (1936). Potentiometric Study of the Flavins, *Journal of Biological Chemistry*, 116, 587–607.

Miller, J.R., Edmondson, D.E., (1999). Structure-activity relationships in the oxidation of para-substituted benzylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase A. *Biochemistry*, 38, 13670–13683.

Mimasu, S., Sengoku, T., Fukuzawa, S., Umehara, T., Yokoyama, S., (2008). Crystal structure of histone demethylase LSD1 and tranylcypromine at 2.25Å., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 366, 15-22.

Mitra, J., Bhattacharyya, D., (2013). Irreversible inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by covalent modification during catalysis of L-propargylglycine. *FEBS Open Bio.*, 3, 135–143.

Moonen, C.T.W., Vervoort, J., Muller, F., (1984). Reinvestigation of the structure of oxidized and reduced flavin: carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 23, 4859–4868.

Moonen, C.T.W., Vervoort, J., Muller, F., (1984). Carbon-13 nuclear magnetic resonance study on the dynamics of the conformation of reduced flavin. *Biochemistry*, 23, 4868–4872.

Muller, F., Hemmerich, P., Ehrenberg, A., Palmer, G., (1970). The Chemical and Electronic Structure of the Neutral Flavin Radical as Revealed by Electron Spin Resonance Spectroscopy of Chemically and Isotopically Substituted Derivatives, *European Journal of Biochemistry*, 14, 185-196.

Nandigama, R.K., Edmondson, D.E., (2000). Influence of FAD Structure on Its Binding and Activity with the C406A Mutant of Recombinant Human Liver Monoamine Oxidase A, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 27, 20527–20532.

Nelson, D. L., Cox, M.M., (2012). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th Edition., North American Edition, New York, USA.

Nivie`re,V.,Fieschi, F., De`cout, J.L, Fontecave, M., (1999). The NAD(P)H:Flavin Oxidoreductase from *Escherichia coli*.*The Journal Of Biological Chem.*, 274 (26), 8252–18260.

Norrestam, R.,Von Glehn, M., (1972). Studies on flavin derivatives. The crystal and molecular structure of 9- bromo-1,3,7,8,10-pentamethyl-1,5-dihydroisoalloxazine. *Acta Crystallogr.*, B28, 434–447.

Ozturk, N., Selby, C.P., Zhong, D., Sancar, A., (2014). *J.Biol.Chem.*, 289, 4634.

Parr, R.G., Yang, W., (1989).*Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, Newyork, USA.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F.,(2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.*, 333 (1), 19-39.

Pollard, M.G., Travers, K.J., Weissman, J.S., (1998). Ero1P: novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1, 171-182.

Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M.S., Molla, G., (2007). Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64 (11), 1373–94.

Price, N.,Hames, B.,(1996).Rickwood (Ed.) *ProteinsLabFaxAcademicPress*.

Ralph, E.C., Hirschi, J.S., Anderson, M.A., Cleland, W.W., Singleton, D.A., Fitzpatrick, P.F., (2007). Insights into the Mechanism of Flavoprotein-Catalyzed Amine Oxidation from Nitrogen Isotope Effects on the Reaction of N-Methyltryptophan Oxidase. *Biochemistry*, 46, 7655-7664.

- Rebrin, I., Geha, R.M., Chen, K., Shih, J.C., (2001). Effects of Carboxyl-terminal Truncations on the Activity and Solubility of Human Monoamine Oxidase B. *J.Biol.Chem.*, 276, 29499–29506.
- Reuber, B.E., Karl, C., Reimann, S.A., Mihalik, S.J., Dodt, G., (1997). Cloning and functional expression of a mammalian gene for a peroxisomal sarcosine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 272, 6766-6776.
- Riederer, P., Przuntek, H., (1987). In MAO-B Inhibitor Selegiline (R-Deprenyl). Springer-Verlag, Wein, Germany.
- Rinne, U.K., (1978). Recent advances in research on Parkinsonism. *ActaNeurologica Scandinavica*, 57, suppl. 67, 77.
- Rizzo, C.J., (2001). Forum Original Research Communication Further Computational Studies on the Conformation of 1,5-Dihydrolumiflavin, Antioxidants&Redox Signaling. Volume 3, Number 5, Mary Ann Liebert Inc.
- Roth, J.P., Klinman, J.P., (2003). Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase. *PNAS*, 100, 62–67.
- Shalloe, F., Elliott, G, Ennis, O., Mantle, T.J., (1996). Evidence that biliverdin-IX beta reductase and flavin reductase are identical. *Biochem.J.*, 316 (2), 385–387.
- Serriere, J., Boutin, J.A., Isabet, T., Antoine, M., Ferry, G., (Yayınlanmadı, Released Date: 2015-07-01), Crystal structure of fad quinone reductase 2 in complex with melatonin at 1.4Å.
- Silverman, R.B., (1992). Electron transfer chemistry of monoamineoxidase. In: Mariano PS (ed) *Advances in electron transfer chemistry*. JAI PressIns, Greenwich, 2, 177–213.
- Silverman, R.B., (1995). Radical Ideas about Monoamine Oxidase. *Acc.Chem.Res.*, 28, 335-342.
- Silverman, R.B., (2004). *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 2nd Edition., Elsevier Academic Press, London, UK.
- Silverman, R.B., Holladay, M.W., (2014). *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 3rd Edition., Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

- Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A., Whitty, A., (2011). The resurgence of covalent drugs. *Nature Reviews*, 10, 307-317.
- Son, S.Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E., Tsukihara, T., (2008). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 105, 5739-5744.
- Stare, J., (2017). Complete sampling of an enzyme reaction pathway: a lesson from gas phase simulations. *RSC Adv.*, 7, 8740-8754.
- Strelevitz, T.J., Orozco, C.C., Obach, R.S., (2012). Hydralazine as a selective probe inactivator of aldehyde oxidase in human hepatocytes: estimation of the contribution of aldehyde oxidase to metabolic clearance. *Drug Metabolism and Disposition.*, 40, 7, 1441–1448.
- Stewart, J.J.P., (2008). Application of the PM6 method to Modeling the solid state. *J. Mol. Model.*, 14, 499–535.
- Stewart, J.J.P., (2009). Application of the PM6 method to Modeling proteins. *J. Mol. Model.*, 15, 765–805.
- Sucharitakul, J., Wongnate, T., Chaiyen, P., (2010). Kinetic Isotope Effects on the Noncovalent Flavin Mutant Protein of Pyranose 2-Oxidase Reveal Insights into the Flavin Reduction Mechanism. *Biochemistry*, 49, 3753–3765.
- Suzuki, H., Okajima, K., Ikeuchi, M., (2008). *Journal of American Chemical Society*, 130, 12884.
- Tanner, J.J., Lei, B., Tu, S.C., Krause, K.L., (1996). Flavin Reductase P: Structure of a Dimeric Enzyme That Reduces Flavin. *Biochemistry*, 35 (42), 13531–13539.
- Tokuoka, K., Nakajima, Y., Hirotsu, K., Miyahara, I., Nishina, Y., Shiga, K., Tamaoki, H., Setoyama, C., Tojo, H., Miura, R., (2006). Three dimensional structure of rat-liver Acyl-CoA oxidase in complex with a fatty acid: insights into substrate-recognition and reactivity toward molecular oxygen. *J. Biochem.*, 139, 789–795.
- Trickey, P., Wagner, M.A., Jorns, M.S., Mathews, F.S., (1999). Monomeric sarcosine oxidase: Structure of a covalently flavinylated amine oxidizing enzyme. *Structure Fold Des.*, 7, 331–345.

Truhlar, D.G., Zhao, Y., (2006). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four-MO6 class functionals and 12-other functionals. *Theor Chem Account*, 120, 215-224.

Tunçtan, B., (2005). Nitrik Oksit Sentaz ve Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemleri, Nitrik Oksit Miktarlarının Griess Yöntemi ile Ölçülmesi. *Türk Farmakoloji Derneği*, ME.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ab.D., Mersin (http://www.tfd.org.tr/eski/mersin_bahar2.pdf).

Van Beeumen, J., Demo1, H., Bartsch, R.G., Meyer, T.E., Dolata, M.M., Cusanovich, M.A., (1991). Covalent structure of the diheme cytochrome subunit and amino terminal sequence of the flavoprotein subunit of flavocytochrome c from *Chromatium winosum*. *J Biol Chem.*, 266, 12921-12931.

Venci, D., Zhao, G., Jorns, M.S., (2002). Molecular characterization of nikD, a new flavoenzyme important in the biosynthesis of nikkomycin antibiotics. *Biochemistry*. 41, 15795–15802.

Voet, D., Voet, J.G., (1990). *Biochemistry*, Wiley, New York.

Wagner, M.A., Khanna, P., Jorns, M.S., (1999). Structure of the flavocoenzyme of two homologous amine oxidases: Monomeric sarcosine oxidase and N-methyltryptophan oxidase. *Biochemistry*, 38, 5588–5595.

Weinreb, O., Amit, T., Riederer, P., Youdim, M.B.H., Mandel, S.A., (2011). Neuro protective profile of the multi target drug rasagiline in Parkinson's disease. *Int. Rev. Neurobiol.*, 100, 127–149.

Yamaguchi, Y., Matsumura, T., Ichida, K., Okamoto, K., Nishino, T., (2007). Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate. *J.Biochem. (Tokyo)*, 141, 513-524.

Yang, M., Gocke, C.B., Luo, X., Borek, D., Tomchick, D.R., Machius, M., Otwinowski, Z., Yu, H., (2006). Structural Basis for Corest-Dependent Demethylation of Nucleosomes by the Human Lsd1 Histone Demethylase. *Mol.Cell.*, 23, 377.

Zang, T., Papson, K., Ochran, R., Ridge, D.P., (2013). Stability of Flavin Semiquinones in the Gas Phase: The Electron Affinity, Proton Affinity, and Hydrogen Atom Affinity of Lumiflavin. *J. Phys. Chem.*, 117, 11136–11141.

Zarychta, B., Lyubimov, A., Ahmed, M., Munshi, P., Guillot, B., Vrielink, A., Jelsch, C., (2015). Cholesterol oxidase: ultrahigh-resolution crystal structure and multipolar atom Model-based analysis. *Acta Crystallogr., Sect.D* 71, 954-968.

Zhang, J., Martasek, P., Paschke, R., Shea, T., Siler Masters, B.S., Kim, J.J., (2001). Crystal structure of the FAD/NADPH-binding domain of rat neuronal nitric-oxide synthase. Comparisons with NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J.Biol.Chem.*, 276, 37506-37513.

Zheng, Y., Ornstein, R.L., (1996). A Theoretical Study of the Structures of Flavin in Different Oxidation and Protonation States, *J.Am.Chem.Soc.*, 118, 9402-9408.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Arzu TOPAL

Doğum Yeri : KAYSERİ

Doğum Tarihi : 17.02.1987

İletişim : arzu.topal@yahoo.com

Eğitim Bilgileri:

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Kimya Yüksek Lisans (2014-2017)

Kocaeli Üniversitesi Kimya Formasyonu (2010-2011)

Yıldız Teknik Üniversitesi İngilizce Öğretmenliği Sertifikası (2009-2010)

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2005-2009)

Sümer Süper Lisesi/Kayseri(2001-2005)

Sözlü Bildiri ve Poster Bildiri:

1.A.Topal, K.Çakır, S.S.Erdem, Flavın Redoks Tepkimesine Sübstitüent Etkisinin Modellenmesi, III.Ulusal Organik Kimya Kongresi 5-8 Eylül 2016, Trabzon (Poster)