

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ACINETOBACTER BAUMANNII ENOLAZININ
KLONLANMASI VE IN SILICO ANALİZİ

Anıl ATA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Şubat, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ACINETOBACTER BAUMANNII ENOLAZININ KLONLANMASI
VE IN SILICO ANALİZİ

Anıl ATA tarafından hazırlanan tez çalışması 20.02.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammet U. KAHVECİ, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOGULLARI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK sorumluluğunda tarafımda hazırlanan *Acinetobacter Baumannii* Enolazının Klonlanması ve *In Silico* Analizi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Anıl ATA
İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün FYL-2019-3496 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

*Aileme
ve
biricik eşime*

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımdaki ilk tecrübelerimi edinmemi sağlayan, laboratuvar ve tez çalışmam kapsamında bilgi, deneyim ve tecrübesiyle bana yol gösteren, karşılaştığım tüm sorunları ilgi ve sabırla dinleyip çözümler üreten, akademik çalışma hayatımın yanı sıra her konuda değerli önerilerini ve desteğini benimle paylaşan kendisinden çok şey öğrendiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK'a,

Tez çalışmamın yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanlığı'na ve bölümdeki tüm hocalarıma,

Tez çalışmamın yürütülmesine maddi destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne,

Tez çalışmamın farklı aşamalarında çok değerli katkılar sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Özal MUTLU'ya, Dr. Öğr. Üyesi Sinem KOÇER'e,

Tez çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanması sürecinde kıymetli fikir ve tecrübelerini benimle paylaşan Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Emrah SARIYER, Arş. Gör. Osman Mutluhan UĞUREL, Erennur UĞUREL, Tuğba Gül İNCİ, Merve GİRGİN, Gizem DOĞAN ve Gülce ÇELEN'e,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde eğitimini sürdüren diğer yüksek lisans, doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca aldığım kararları destekleyen, maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek yanımda olan kıymetli aileme ve sevgili eşim Derya TOPUZ ATA'ya çok teşekkür ederim.

Anıl ATA

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	x
KISALTMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
ABSTRACT	xxiii
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	4
2 Genel Bilgi	5
2.1 <i>Acinetobacter</i> Cinsi	5
2.1.1 <i>Acinetobacter</i> Cinsinin Tarihçesi.....	5
2.1.2 <i>Acinetobacter</i> Cinsinin Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	5
2.1.3 <i>Acinetobacter</i> Cinsinin Doğal Habitatları.....	7
2.1.4 <i>Acinetobacter</i> Cinsine Ait Taksonomi	8
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
2.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Klinik Önemi.....	10
2.2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	15
2.2.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> 'nin Neden Olduğu Enfeksiyonları Tedavi Etmek İçin Kullanılan Mevcut Antibiyotik Seçenekleri	15
2.3 <i>A. baumannii</i> Enerji Metabolizması.....	16
2.4 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı Hedefi Olarak Enolaz.....	21
2.5 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı.....	24
2.5.1 Homoloji Modelleme	30
2.5.2 Yüksek Verimde Sanal Tarama ve Moleküler Yanaştırma	40
3 Materyal ve Yöntem	50
3.1. Materyaller	50
3.1.1 Enzimler, Kitler ve Diğer Materyaller	50
3.1.2 Deneylerin Gerçekleştirilmesinde Kullanılan Cihazlar	52
3.1.3 Besiyerleri ve Çözücüler	53
3.1.4 Tamponlar ve Stok Çözeltiler	55

3.1.5 Primerler	59
3.1.6 Bakteriyel Suş Temini.....	60
3.1.7 Klonlama ve Ekspresyon Vektörleri	60
3.1.8 <i>Escherichia coli</i> Soyları.....	63
3.2 Yöntem	63
3.2.1 Klonlama Vektörü pGEM®-T Easy Vektör Sistemi'ne <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Enzimini Kodlayan Genin Klonlanması	63
3.2.1.1 AbENO Geni için Uygun Primerlerin Tasarlanması.....	63
3.2.1.2 Liyofilize Şekilde Temin Edilen <i>A. baumannii</i> RSKK 02026 Suşunun Açılması ve Genomik DNA'sının İzolasyonu	64
3.2.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	65
3.2.1.4 Etidyum Bromür ile Boyanan AgaroZ Jel Elektroförezü.....	68
3.2.1.5 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	68
3.2.1.6 AbENO Geninin Klonlanması için Adenin (A) Kuyruğunun Eklenmesi.....	68
3.2.1.7 Ligasyon.....	69
3.2.1.8 Kompetant <i>E. coli</i> Hücrelerinin Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$) Muamelesi ile Hazırlanması	70
3.2.1.9 <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerine Rekombinant Plazmid DNA'nın Transformasyonu	70
3.2.1.10 Klonlanan AbENO Geninin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü	71
3.2.1.11 Rekombinant Plazmid DNA İzolasyonu.....	72
3.2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Enzimini Kodlayan Genin pLATE 31 Vektörüne Klonlanması	73
3.2.2.1 aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) Sistemine Uygun Primerlerin Tasarlanması.....	73
3.2.2.2 pGEM®-T Easy Klonlama Vektöründen <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Geninin Amplifikasyonu	74
3.2.2.3 PCR ürünlerinin Kristal-Viyole (CV) Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması.....	76
3.2.2.4 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant Plazmid DNA'ların <i>E.coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu.....	76
3.2.2.5 Koloni PCR Metodu ile Klonlanan AbENO Geninin Kontrol Edilmesi	78
3.2.2.6 DNA Dizi Analizi	79
3.2.2.7 AbENO Dizisinin Aminoasit Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi	79

3.2.2.8 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Enziminin İfade Edilmesi ..	79
3.2.2.9 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	80
3.2.2.10 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolazının Molar Absorblama Katsayısının ve Molekül Ağırlığının Hesaplanması.....	81
3.2.2.11 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Enziminin Homoloji Modellemesi.....	81
3.2.2.12 Moleküler Yanaştırma Temelli Sanal Tarama ile Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi.....	83
4 Sonuç ve Öneriler	87
4.1 Sonuçlar.....	87
4.1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> RSKK 02026 Suşunun Açılması.....	87
4.1.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Enzimini Kodlayan Genin pGEM®-T Easy Vektör Sistemine Klonlanması.....	88
4.1.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Geninin Amplifikasyonu için Uygun Primerlerin Dizayn Edilmesi.....	88
4.1.2.2 AbENO Geninin Amplifikasyonu ve <i>E.coli DH5α</i> Hücrelerine Transformasyonu	89
4.1.2.3 Klonlanan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü	96
4.1.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz Enzimini Kodlayan Genin pLATE 31 Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	96
4.1.3.1 AbENO Geninin Amplifikasyonu ve <i>E. coli DH5α</i> Hücrelerine Transformasyonu	96
4.1.3.2 Klonlanan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü ve Dizi Analizinin Yapılması	100
4.1.4 AbENO Dizisinin Aminoasit Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi.	109
4.1.5 <i>Acinetobacter baumannii</i> Enolazının Molar Absorblama Katsayısının ve Molekül Ağırlığının Hesaplanması	112
4.1.6 <i>A. baumannii</i> Enolazının İfade Edilmesi	112
4.1.7 AbENO Enziminin Homoloji Modellemesi ve Validasyonu	114
4.1.7.1 MODELLER v9.15 programı Kullanılarak AbENO Açık ve Kapalı Konformasyonlarının Homoloji Modelinin Oluşturulması	117
4.1.7.2 SWISS-MODEL Programı Kullanılarak AbENO Açık ve Kapalı Konformasyonlarının Homoloji Modelinin Oluşturulması	126
4.1.8 Moleküler Yanaştırma Temelli Sanal Tarama ile Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi	136
4.2 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler.....	152
Kaynakça	156

EK A	171
EK B	175
Tezden Üretilmiş Yayınlar	177



SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
Å	Angstrom
bç	Baz çifti
β	Beta
dk	Dakika
Da	Dalton
dH ₂ O	Distile su
γ	Gama
g	Gram
G-C	Guanin-sitozin
HCl	Hidroklorik asit
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
kg	Kilogram
kcal	Kilokalori
ID	Kimlik
l	Litre
Mg	Magnezyum
Mg ⁺²	Magnezyum ²⁺ iyonu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgCl ₂ .6H ₂ O	Magnezyum klorür heksahidrat
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ϵ	Molar absorblama katsayısı
M	Molarite
Φ	phi
Ψ	psi
KCl	Potasyum Klorür
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
NaCl	Sodyum klorür
H ₂ O	Su
Δ G	Toplam Serbest Bağlanma Enerjisi
3B	Üç boyutlu

KISALTMA LİSTESİ

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AbENO	<i>Acinetobacter baumannii</i> Enolaz
ADMET	Absorbsiyon, dağılım, metabolizma, salınım ve toksisite
<i>A. haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
<i>A. indicus</i>	<i>Acinetobacter indicus</i>
Ala	Alanin
Arg	Arjinin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
ATP	Adenozin Trifosfat
BSA	Mavi Seçim Agarı
<i>B. Subtilis</i>	<i>Bacillus Subtilis</i>
Cys	Sistein
CV	Kristal Viyole
DOPE	Farklı optimize edilmiş protein enerjisi
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ENO	Enolaz
EtBr	Etidyum Bromür
FDA	Food and Drug Administration
<i>FnENO</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Enolaz
Gln	Glutamin
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
His	Histidin
HTVS	Yüksek Verimli Sanal Tarama
HuENO	<i>Homo sapiens</i> Enolaz Enzimi
Ile	İzolösin
IPTG	İzopropil- β -D- tiyogaltopiranosid
LB	Luria-Bertani
Leu	Lösin
LIC	Ligation Independent Cloning
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
MM/GBSA	Moleküler Mekanik / Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nükleer manyetik rezonans
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDB	Protein data bank
PEP	Fosfoenolpiruvat

2-PGA	2-Fosfogliserik asit
Phe	Fenilalanin
Pro	Prolin
Pyr	Pirüvat
RMSD	Sapmanın ortalama karekökü
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAB	Örnek Uygulama Tamponu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Ser	Serin
SP	Standart Hassasiyet
TAE	Tris-asetat-EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamin
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
Val	Valin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid
XP	Eksta Hassasiyet
z-DOPE	Normalize DOPE

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1** *A. baumannii*'nin boyanma özellikleri ve morfolojisi. (A) Kokoid ve kokobasil elemanlara sahip olan durgun faz hücrelerinin gram boyama görüntüsü, bazı mavi renkte görünen elemanlar kristal viyolet boyasının tutulmasından kaynaklanmıştır. (B) ve (C) ise sırasıyla *A. baumannii* AYE ve ACICU suşlarının taramalı elektron mikroskop görüntüleridir 6
- Şekil 2.2** *A. baumannii*'nin yol açtığı enfeksiyonlar ile *A. baumannii*'nin konağı enfekte etmesinde ve konağın kolonizasyonunda etkili olan faktörler. 11
- Şekil 2.3** OECD ve OECD ülkelerine dahil olmayan ülkelerde; iki farklı zaman periyodunda *A. baumannii* enfeksiyonlarının imipenem karşı göstermiş olduğu ilaç direncinin yüzde olarak gösterilmesi. N: Her ülkede yapılmış olan toplam araştırma sayısını gösterir. 13
- Şekil 2.4** Prokaryotlarda en yaygın kullanılan glikolitik yollar. EMP yolağı PFK enzimiyle beraber kırmızı renkle, OPP yolağı Zwf enzimiyle mavi renkte, ED yolağı KDPG aldolaz (Eda) enzimiyle yeşil renkte gösterilmiştir. Tüm yollarda ortak olan reaksiyonlar siyah ile belirtilmiştir. Eda, KDPG aldolaz; Edd, fosfoglukonat dehidrataz; Eno, enolaz; Fba, fruktoz bisfosfat aldolaz; Gdh, glukoz dehidrojenaz; Gk, glukonat kinaz; Gnd, 6-fosfoglukonat dehidrojenaz; Pgm, fosfogliserat mutaz; Pfk, 6-fosfofruktokinaz; Pgi, fosfoglukoz izomeraz; Pkg, fosfogliserat kinaz; Rpe, ribuloz-5-fosfat epimeraz; Rpi, ribuloz-5-fosfat izomeraz; Tal, transaldolaz; Tim, triosefosfat izomeraz; Tkt, transketolaz; Zwf, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz 17
- Şekil 2.5** *Acinetobacter*lerin Entner-Doudoroff glikolitik yolağı. 20
- Şekil 2.6** Klasik Glikoliz (EMP) yolağı. 21
- Şekil 2.7** Bilgisayar destekli ilaç tasarım basamakları 26
- Şekil 2.8** Yapıya dayalı ilaç tasarımının basamakları. A) Hedef yapının belirlenmesi ve bağlanma bölgesinin analiz edilmesi; b) sanal kütüphanenin oluşturulması; c) hedef molekülün bağlanma bölgesi ve bileşiklerin yanıştırma çalışmaları 29
- Şekil 2.9** Homoloji Modellemenin temel basamakları 33
- Şekil 2.10** Homoloji modellemenin temel basamakları ve ilaç keşfetme prosesindeki uygulamaları 38
- Şekil 2.11** Yapıya dayalı sanal tarama ve liganda dayalı sanal tarama yaklaşımları. 41
- Şekil 2.12** Kademeli yapı oluşturma metodu. (a) ligand (karbon açık mavi ile gösterilmiştir) çok sayıda parçaya bölünür; (b) bağlantı parçası, moleküler hedefin bağlanma bölgesine yanıştırılır (karbon somon renginde gösterilmiştir); (c) sonraki parça bağlantı parçasından sonra yanıştırılır; (d ve e) diğer parçalar bağlanma konformasyonundan tam bir ligand oluşturmak için sıra ile yanıştırılır. aktif bölgedeki rezidüer çubuk şeklinde gösterilmiştir (karbon somon renkte). hidrojen bağları kesik çizgilerle belirtilmiştir. 45

Şekil 3.1	a) O'GeneRuler DNA Ladder Mix b) Lambda DNA/Hind III markır.	51
Şekil 3.2	pGEM®-T Easy Vektör Sistemi .	61
Şekil 3.3	pLATE 31 ekspresyon vektörü .	61
Şekil 3.4	pLATE 31 vektör elementleri .	62
Şekil 4.1	Nutrient Agar üzerinde liyofilize <i>Acinetobacter baumannii</i> RSKK 02026 suşunun açılması sonucu gelişen kolonilerin petri görüntüsü.....	87
Şekil 4.2	<i>A. baumannii</i> iki alt türünün enolazı kodlayan gen dizilerinin eşleştirmesi sonucundaki 5' ucu nükleotid dizisi.	88
Şekil 4.3	<i>A. baumannii</i> iki alt türünün enolazı kodlayan gen dizilerinin eşleştirmesi sonucundaki 3' ucu nükleotid dizisi.	88
Şekil 4.4	<i>AbENO</i> geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: <i>Pfu</i> DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri.....	90
Şekil 4.5	<i>AbENO</i> geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: <i>Pfu</i> DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri.....	90
Şekil 4.6	<i>AbENO</i> geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-5: Farklı $MgSO_4$ konsantrasyonlarında, <i>Pfu</i> DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri.	91
Şekil 4.7	<i>AbENO</i> geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-2: <i>Pfu</i> DNA Polimeraz kullanılarak yapılan PCR ürünü.....	92
Şekil 4.8	<i>AbENO</i> geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 50 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: <i>Pfu</i> DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünü, Hat 2: Long PCR Enzim Mix kullanılarak amplifiye edilen PCR ürünü.	93
Şekil 4.9	<i>AbENO</i> geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürünü.	93
Şekil 4.10	<i>AbENO</i> geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün saflaştırılması sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü Hat M1: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürününün saflaştırma sonrası görüntüsü Hat 2: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürününün saflaştırma sonrası görüntüsü Hat M2: Lambda Markır.	94

- Şekil 4.11** Saflaştırma işlemi sonrası kaybedilen PCR ürünü yerine aynı koşullarda *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5mikrolitresinin etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürünü. 94
- Şekil 4.12** pGEM®-T Easy Vektör Sistemi kullanılarak gerçekleştirilen klonlama sonrası yapılan transformasyon sonucunda LB-BSA petrilerinde oluşan kolonilerin görüntüsü. 95
- Şekil 4.13** Klonlanan genin PCR ile yapılan kontrolünün jel görüntüsü. Hat M:GeneRuler DNA Markır, Hat 1-5: Seçilen kolonilerden elde edilen plazmid DNA'lar ile yapılan PCR sonucu Hat 4:Pozitif Koloni. 96
- Şekil 4.14** *AbENO* geninin Phusion High Fidelity DNA Polimeraz enzimi kullanılarak yapılan amplifikasyonunun agaroz jel görüntüsü. Hat M1:GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilen PCR ürünü, Hat M2: Lambda Markır. 97
- Şekil 4.15** *AbENO* geninin Phusion High Fidelity DNAPolimeraz enzimi kullanılarak yapılan amplifikasyonun agaroz jel görüntüsü. Hat M:GeneRuler DNA Markır, Hat 1-2: Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları. 98
- Şekil 4.16** Plate31 vektör sistemi kullanılarak gerçekleştirilen klonlama sonrası yapılan transformasyon sonucunda LB agar petrilerinde oluşan kolonilerin görüntüsü. 99
- Şekil 4.17** Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-9: Negatif PCR Sonucu. ... 100
- Şekil 4.18** Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-9: Negatif PCR Sonucu. ... 100
- Şekil 4.19** 600-700 bp uzunluğundaki nükleotid parçasının pLATE 31 ekspresyon vektörüne uygun olarak dizayn edilmiş forward primerle yapılan dizileme sonucu. 101
- Şekil 4.20** *AbENO* geninin Phusion High Fidelity DNA Polimeraz enzimi kullanılarak yapılan amplifikasyonunun agaroz jel görüntüsü. Hat M1:GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilen PCR ürünleri. 102
- Şekil 4.21** *AbENO* geninin EcoPURE PCR/Gel Purification Kit Kullanılarak Saflaştırılması Sonrası Etidyum Bromürle Boyanmış Agaroz Jelde Görüntüsü. Hat M1:GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Saflaştırılmış *AbENO* geni Hat M2: Lambda DNA/HindIII Markır. 103
- Şekil 4.22** Plate31 vektör sistemi kullanılarak yapılan klonlama sonrası gerçekleştirilen transformasyon sonucu LB agar petrilerinde oluşan pozitif olduğu düşünülen kolonilerin görüntüsü. 104
- Şekil 4.23** Koloni PCR sonrasında elde edilen etidyum bromürle boyanmış agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 5: Pozitif koloni PCR sonucu. 105
- Şekil 4.24** *E. coli* DH5α hücrelerinden izole edilen *AbENO* genini içeren plazmid DNA'ların *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu sonrası oluşan petri görüntüleri. 105

- Şekil 4.25** Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır; Hat 1,2: Negatif PCR sonucu, Hat 3: Pozitif PCR sonucu. 106
- Şekil 4.26** T7 universal primeri kullanılarak dizilenen; LIC 5' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile *A. baumannii* ENO'nun referans dizisinin eşleştirme sonucu. 1. sıra: Klonlanan DNA'nın gen dizisi; 2. sıra: *A. baumannii* enolaz enzimini kodlayan referans gen dizisi..... 107
- Şekil 4.27** PQE-FP universal primeri revers primer olarak kullanılarak dizilenen; LIC 3' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile *A. baumannii* ENO'nun referans dizisinin eşleştirme sonucu. 1. sıra: Klonlanan DNA'nın gen dizisi; 2. sıra: *A. baumannii* enolaz enzimini kodlayan referans gen dizisi. 108
- Şekil 4.28** Enolazın çoklu dizi eşleştirmesi. Bu eşleştirme neticesinde yıldız işareti 2-PG ile etkileşimde olan, elips işareti dehidrasyon aşamasında etkili olan, kare işareti Mg^{+2} iyonu ile etkileşimde olan katalitik rezidüleri göstermektedir. Kırmızı kutu içine alınan bölgeler insersiyon bölgelerini, yeşil kutu plazminojen bağlanma bölgesini ve siyah kutu halka 1 bölgesini göstermektedir. 110
- Şekil 4.29** Hücrelerin 5 saat inkübe edilmesinin ardından elde edilen ekspresyon sonucu. Hat M: Protein markır, Hat 1: İndüklenmeyen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 2: İndüklenmeyen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti; Hat 3: İndüklenen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı Hat 4: İndüklenen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti, Hat 5: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 6: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti; Hat 7: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 8: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti. 113
- Şekil 4.30** Hücrelerin bir gece boyunca inkübe edilmesinin ardından elde edilen ekspresyon sonucu. Hat M: Protein markır; Hat 1: İndüklenmeyen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 2: İndüklenmeyen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti, Hat 3: İndüklenen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 4: İndüklenen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti, Hat 5: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı Hat 6: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti, Hat 7: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı Hat 8: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti..... 114
- Şekil 4.31** *AbENO* açık konformasyonun homoloji modelinin oluşturulması için kalıp olarak seçilen *B. Subtilis* enolaz proteininin (1. sıra) ve *A. baumannii* enolaz proteininin (2. sıra) aminoasit dizilerinin eşleştirilmesi. 116

- Şekil 4.32** AbENO kapalı konformasyonun homoloji modelinin oluşturulması için kalıp olarak seçilen *E.coli* enolaz proteininin (1. sıra) ve *A. baumannii* enolaz proteininin (2. sıra) aminoasit dizilerinin eşleştirilmesi..... 117
- Şekil 4.33** Enerji minimizasyonu sonrası AbENO açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan homoloji modeller. Mavi renkle gösterilen kapalı form için oluşturulan homoloji modeli, turuncu renkle ise açık form için oluşturulan modeli göstermektedir. 118
- Şekil 4.34** AbENO açık konformasyonu için oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı. 120
- Şekil 4.35** AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı. 121
- Şekil 4.36** Enerji minimizasyonu sonrası AbENO açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin Z-skor sonucu..... 122
- Şekil 4.37** Enerji minimizasyonu gerçekleştirildikten sonra AbENO açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin enerji düzeyi grafiği..... 123
- Şekil 4.38** AbENO açık konformasyonu için oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu..... 125
- Şekil 4.39** AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu..... 125
- Şekil 4.40** Enerji minimizasyon sonrası SWISS- MODEL kullanılarak AbENO açık ve kapalı form için oluşturulan homoloji modeller. Kapalı form için oluşturulan model mavi renk ile gösterilmiştir. Sarı renk ise açık form için oluşturulan modeli göstermektedir. 127
- Şekil 4.41** AbENO açık konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı. 128
- Şekil 4.42** AbENO kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı. 129
- Şekil 4.43** Enerji minimizasyonu sonrası AbENO açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin Z-skor sonucu..... 130
- Şekil 4.44** Enerji minimizasyonu gerçekleştirildikten sonra AbENO açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin enerji düzeyi grafiği..... 131
- Şekil 4.45** AbENO açık konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu..... 132
- Şekil 4.46** AbENO kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu..... 132
- Şekil 4.47** AbENO açık konformasyonu için oluşturulan modelin DoGSiteScorer sonuçları (a). Sarı ile gösterilen bölge AbENO açık konformasyon için oluşturulan modelde interface bölgeyi simgelerken mor ile gösterilen bölge ise aktif bölgeyi göstermektedir (b). 137

- Şekil 4.48** AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin DoGSiteScorer sonuçları (a). Pembe ile gösterilen bölge AbENO kapalı konformasyon için oluşturulan modelde en yüksek ilaç skoruna sahip olan bölgeyi gösterirken sarı ile gösterilen bölge ise aktif bölgeye ve katalitik halkaya en yakın olan bölgeyi göstermektedir (b)..... 138
- Şekil 4.49** AbENO açık konformasyonu için öngörülen modelin aktif bölgesi ile 100766 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.....143
- Şekil 4.50** AbENO açık konformasyonu için öngörülen modelin P0 bölgesi ile 100766 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.. 144
- Şekil 4.51** AbENO kapalı konformasyonu için öngörülen modelin P0 bölgesi ile 3068866 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı. .149
- Şekil 4.52** AbENO kapalı konformasyonu için öngörülen modelin P3 bölgesi ile 6436013 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.. 150
- Şekil 4.53** AbENO açık konformasyonun P1 ve P0 bölgesi üzerinde en iyi bağlanma afinitesi gösteren 100766 numaralı bileşiğin gösterimi. 151
- Şekil 4.54** AbENO kapalı konformasyonun P0 ve P3 bölgesi üzerinde en iyi bağlanma afinitesi gösteren sırasıyla 3068866 ve 6436013 numaralı bileşiklerin gösterimi. 151

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Çeşitli kaynaklardan izole edilebilen bazı <i>Acinetobacter</i> türleri	8
Tablo 2.2 Homoloji Model oluşturmak için kullanılan bazı modelleme sunucularının temel özellikleri	36
Tablo 3.1 Deneyle gerçekleştirilirken kullanılan cihazlar ve markaları.....	52
Tablo 3.2 Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri	53
Tablo 3.3 Luria-Bertani (LB) Agar.....	53
Tablo 3.4 SOC Medium (25 ml) bileşenleri	54
Tablo 3.5 Mavi-Beyaz koloni seçimi için LB Agar (Amp/IPTG/X-Gal) (BSA) ..	55
Tablo 3.6 CaCl ₂ çözeltisi	55
Tablo 3.7 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tampon çözeltisi (100 ml).....	55
Tablo 3.8 Mg ⁺² stok çözeltisi (100 ml)	56
Tablo 3.9 EtBr-Agaroz Jel için Örnek Uygulama Tamponu (EtBr-SAB) (10 ml)	56
Tablo 3.10 Kristal Viyole Jel için Örnek Uygulama Tamponu (CV-SAB).....	57
Tablo 3.11 % 30 Akrilamid/Bis Çalışma Çözeltisi (30 ml)	57
Tablo 3.12 SDS-PAGE Ayırma Jeli (%12)	58
Tablo 3.13 SDS-PAGE Yükleme Jeli (%4)	58
Tablo 3.14 SDS-PAGE Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB) (10 ml).....	58
Tablo 3.15 5X SDS-PAGE Tank Tamponu	59
Tablo 3.16 Protein Boyama Çözeltisi	59
Tablo 3.17 Boya Uzaklaştırıcı Çözelti.....	59
Tablo 3.18 <i>AbENO</i> geninin genomik DNA'dan <i>Pfu</i> DNAPolimeraz (Fermentas) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri	65
Tablo 3.19 <i>AbENO</i> geninin genomik DNA'dan <i>Pfu</i> DNAPolimeraz (Fermentas) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri	66
Tablo 3.20 <i>AbENO</i> geninin genomik DNA'dan <i>Pfu</i> DNAPolimeraz (Fermentas) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri	66
Tablo 3.21 <i>AbENO</i> geninin genomik DNA'dan Long PCR Enzim Mix ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri	67
Tablo 3.22 <i>AbENO</i> geninin genomik DNA'dan Phusion High Fidelity DNA Polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.....	67
Tablo 3.23 Adenin kuyruğu ekleme reaksiyonu	69
Tablo 3.24 Ligasyon bileşenleri.....	69
Tablo 3.25 Koloni PCR bileşenleri.....	71
Tablo 3.26 <i>AbENO</i> geninin Phusion High Fidelity DNA Polimeraz ile rekombinant plazmid DNA'dan amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri.....	75
Tablo 3.27 <i>AbENO</i> gende 5' ve 3' yapışkan uçları oluşturmak için gerekli olan reaksiyon bileşenleri	77
Tablo 3.28 Koloni PCR metodunda kullanılan PCR bileşenleri.....	78

Tablo 4.1	<i>A.baumannii</i> enolazının çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri	112
Tablo 4.2	Minimizasyon sonrası <i>AbENO</i> açık konformasyonu için MODELLER v9.15 ve SWISS-MODEL’le oluşturulan modellerin karşılaştırılması	134
Tablo 4.3	Minimizasyon sonrası <i>AbENO</i> kapalı konformasyonu için MODELLER v9.15 ve SWISS-MODEL’le oluşturulan modellerin karşılaştırılması	135
Tablo 4.4	<i>AbENO</i> açık konformasyon için öngörülen modelin aktif bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)	139
Tablo 4.5	<i>AbENO</i> açık konformasyon için öngörülen modelin muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)	141
Tablo 4.6	100766 PubChem numaralı ligandın <i>AbENO</i> açık formu için oluşturulan modelin aktif bölgesi ve muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler ..	142
Tablo 4.7	100766 PubChem numaralı ligandın <i>AbENO</i> açık formu için oluşturulan modelin aktif bölgesi ve muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler (devamı).....	143
Tablo 4.8	<i>AbENO</i> kapalı konformasyon için öngörülen P0 bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)	145
Tablo 4.9	<i>AbENO</i> kapalı konformasyon için öngörülen modelin P3 muhtemel ilaç bağlanma bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)	147
Tablo 4.10	PubChem ID: 3068866 olan ligandın <i>AbENO</i> kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin P0 bölgesi ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler ve 6436013 PubChem numarasına sahip ligandın <i>AbENO</i> kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin P3 bölgesi ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler	148

***Acinetobacter Baumannii* Enolazının Klonlanması Ve In Silico Analizi**

Anıl ATA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Gram negatif, nozokomiyal fırsatçı bir patojen olan *Acinetobacter baumannii*, dünya genelinde sağlık bakım ünitelerinde ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. *A. baumannii*'nin sebep olduğu en yaygın enfeksiyonlar ventilatör ilişkili pnömoni ile kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır. *A. baumannii*'nin antibakteriyel ilaçların etkisinden etkili bir şekilde kaçmayı başaran en ciddi organizmalardan biri olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından açıklanmıştır. Bu açıklama *A. baumannii*'nin sebep olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için alternatif ilaç adaylarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Geleneksel metotlar kullanarak yeni ilaçların geliştirilmesi; para ve iş gücü bakımından maliyetli ve yıllar süren bir süreçtir. Son zamanlarda, bilgisayar destekli ilaç tasarımı, yeni ilaç keşfetme ve geliştirme alanında maliyeti ve zamanı önemli derecede düşürdüğü için büyük önem kazanmıştır.

A. baumannii'nin glikolitik yolağında bulunan enolaz, Mg^{+2} iyonları varlığında, tersinir olarak 2-fosfogliseratın fosfoenol pirüvata dönüşümünü katalize eden önemli bir enzimdir. Bu tez çalışmasında enolaz, *A. baumannii*'nin enerji

metabolizmasındaki bu görevinden dolayı hedef molekül olarak seçilmiştir. İleri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanmak amacıyla, *A. baumannii* enolaz geni literatürde ilk defa klonlanmıştır, ekspresyon çalışmaları yapılmıştır ve *A. baumannii* enolazının açık ve kapalı konformasyonları için homoloji modelleme ve moleküler yanıştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen tüm bu sonuçlar doğrultusunda; yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımına dayanarak yeni görüşler oluşturulabilecek ve enolaz, *Acinetobacter baumannii*'nin sebep olduğu enfeksiyonları baskılamak için aday olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter baumannii*, enolaz, klonlama, homoloji modelleme, moleküler yanıştırma

Cloning And *In Silico* Analysis Of Enolase From *Acinetobacter Baumannii*

Anıl ATA

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Acinetobacter baumannii brings about serious infections in hospitals across the world. Bacteremia and ventilator-associated pneumonia are the most prevalent infections which *A. baumannii* causes. WHO announced *A. baumannii* is one of the most critical organisms which can escape the effects of antibiotics. This announcement shows that alternative drug candidates should be developed in order to treat *A. baumannii* infections. The development of new drugs using conventional methods is costly process with regard to manpower, money and it takes many years. Computer-aided drug discovery has become important in the field of new drug discovery and development on account of decreasing time and cost considerably in the recent times.

Enolase found in the glycolytic pathway of *A. baumannii* is a key enzyme that catalyzes the reversible conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate in the presence of Mg^{2+} ions. In this study, *A. baumannii* enolase was selected as a target molecule due to its duty in the energy metabolism of the bacteria. The gene encoding enolase from *A. baumannii* was cloned to be used for further *in vitro* characterization and inhibitor testing researches. Homology modelling

methods and docking analyses were carried out for open and closed conformations of *A. baumannii* enolase for the first time in the literature.

All these results may pave the way for new approaches related to computer-aided drug discovery studies and enolase may be a candidate molecule to struggle against *A. baumannii* infections in human.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, enolase, cloning, homology modelling, molecular docking



1.1 Literatür Özeti

Acinetobacter cinsine ait türler; flagelluma sahip olmayan, oksidaz negatif, katalaz pozitif özellik gösteren hareketsiz, zorunlu aerob gram negatif bakterilerdir. *Acinetobacter* cinsi bakteriler, doğada saprofit bir biçimde serbest yaşayabilen, cansız yüzeylerde uzun süreler canlı kalabilen bakterilerdir. *Acinetobacter*ler; metabolizmaları ve enerji ihtiyaçlarını karşılamak için çok sayıda farklı metabolitlerden ve karbon kaynaklarından faydalanabilme yeteneğindedirler. Farklı ve değişen sıcaklık değerlerinde ve pH ortamlarında hayatını sürdürebilmeleri, kuruluğa karşı dayanıklı olmaları bu bakterilerin ayırt edici özellikleridir. *Acinetobacter* cinsine ait 30'dan fazla tür belirlenmiştir [2]. Tespit edilen bütün türler içerisinde sağlık bakım ünitelerinde en ciddi enfeksiyonlara neden olan tür *Acinetobacter baumannii*'dir. *A. baumannii* dünya genelinde hastane enfeksiyonlarına yol açan en önemli patojenlerden biridir. Özellikle hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalarda bakteriyemi ve ventilatör ilişkili pnömoni en yaygın görülmek üzere, üriner sistem enfeksiyonları, menenjit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açmaktadır [3]. Dünya çapında yoğun bakım ünitelerinde görülen enfeksiyonların %20'si kadarından sorumlu tutulmaktadır [4]. *A. baumannii*'nin sahip olduğu çoklu ilaç direnci, hastane kaynaklı *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli problemdir. *A. baumannii*'nin sahip olduğu geniş çaplı antibiyotik direnci, bu bakterinin sebep olduğu enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılabilecek etkili ilaç seçeneklerinin sayısını oldukça azaltmaktadır [5]. 2017 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan raporda; *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde en başarılı şekilde kullanılan karbapenemlere dahi direnç geliştiği gösterilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan risk sınıflandırılmasında *A. baumannii*'nin karbapenem direnci, acilen yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken

en kritik öncelik sınıfına dahil edilmiştir [6]. Bu rapor; *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif ilaç adaylarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Yeni bir ilacın keşfi ve geliştirilmesi için gerekli prosesler genel olarak uzun zaman gerektiren, riskli ve maliyetli olarak nitelendirilmektedir. Özgün bir ilacın keşfedilmesini ve geliştirilmesini içeren bu süreç yaklaşık 10-15 yıl almaktadır [7]. Bu noktada bilgisayar destekli ilaç tasarımı ön plana çıkmaktadır. Bir ilacın keşfi için başarısızlık riskini ve maliyeti düşüren, araştırma döngüsünü kısaltan bir yaklaşım olan bilgisayar destekli ilaç tasarımı, ilaç olma potansiyeline sahip öncü adayların toksisitelerinin ve farmakolojik etkilerinin değerlendirilmesine olanak sağlayıp, bu öncü adayların seçiciliğinin erken değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu özelliği ile ilaçların keşfedilmesi için gereken maliyette tasarruf sağlar ve yeni moleküllerin daha hızlı bir şekilde geliştirilmesine imkan tanımaktadır [8]. Yapıya dayalı ilaç tasarımı, liganda dayalı ilaç tasarımı ve dizi temelli yaklaşımlar; yaygın olarak kullanılan bilgisayar destekli ilaç keşfi yaklaşımlarıdır. Hedef olarak belirlenen molekülün (enzim/reseptör) üç boyutlu yapı bilgisi kullanılarak potansiyel ligandların taranması, bu işlemin ardında deneysel olarak biyolojik testlerin yapılması ve optimizasyon basamakları yapıya dayalı ilaç tasarımı oluşturan temel basamaklardır [9].

Bu tez çalışmasında yapıya dayalı ilaç tasarımı doğrultusunda *A. baumannii* enolazı hedef molekül olarak seçilmiştir. *A. baumannii*'nin Entner-Duodorof glikolitik yolağında görev alan enolaz, Mg^{+2} iyonları varlığında, 2-fosfogliseratın fosfoenol pirüvata dönüşümünü katalize eden çok önemli bir glikolitik enzimdir [10,11]. Enolaz enerji metabolizmasında ki görevinin yanı sıra, patolojik olarak fibronektin bağlayıcı aktiviteye sahiptir. Bu aktivite ile bakteri adhezyonuna fayda sağlamaktadır. Fibronektin bağlayıcı aktivitesine ek olarak önemli plazminojen bağlayıcı reseptörlere sahip olması bir diğer önemli patolojik özelliğidir [12,13].

Hesaplamalı yapı tahmin etme yöntemlerinden biri olan homoloji modelleme; hedef olarak belirlenen proteinin amino asit dizi bilgisini kullanarak o proteinin 3 boyutlu (3B) yapısının tahmin edilmesinde yararlanılan bir metottur. Homoloji

modelleme hesaplamalı yapı tahmin etme metotları arasında en yüksek doğrulukta sonuç veren metot olarak değerlendirilmektedir [14].

Yapıya dayalı ilaç tasarımında sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem ise moleküler yanaştırmadır. Moleküler yanaştırmada; uygun hedef bağlanma bölgesinde, küçük molekülü ligandların konformasyonunu yüksek doğrulukta tahmin edebilen bir metottur [15]. Moleküler yanaştırma algoritmaları; ligand-reseptör kompleksinin bağlanma afinitelerini temel alarak moleküler yanaştırması yapılmış bileşikler sıralar ve bu bileşiklerin bağlanma enerjilerinin tahminini kantitatif olarak gerçekleştirir [16].

Bu tez kapsamında; ileri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanmak amacıyla, literatürde ilk defa *A. baumannii* enolaz geni klonlanmıştır ve *A. baumannii* enolazının açık ve kapalı konformasyonları için homoloji modelleme ve moleküler yanaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Acinetobacter baumannii'nin yol açtığı hastalıklara karşı alternatif tedavi yöntemleri geliştirmek için yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımı doğrultusunda *Acinetobacter baumannii* enolazını kodlayan genin klonlanması, proteinin eksprese edilmesi, yüksek saflıkta üretilerek kinetik parametrelerinin belirlenmesi ve bilgisayar tabanlı yöntemler kullanılarak enzimin homoloji modelinin oluşturularak moleküler yanaştırma çalışmalarının yapılması tezin amacını oluşturmaktadır.

Bu doğrultuda *A. baumannii* enolazının rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak *in vitro* şartlarda yüksek saflıkta prototip olarak üretilmesi, bilgisayar tabanlı yöntemler kullanılarak homoloji modelinin oluşturulması ve moleküler yanaştırmasının gerçekleştirilmesiyle *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek yapıya dayalı bir ilacın tasarımı yönünde yapılacak olan ileri *in vitro* ve *in vivo* analizlerin önünün açılacağı öngörülmektedir.

1.3 Hipotez

Günümüzde *A. baumannii*'nin sahip olduğu geniş çaplı antibiyotik direnci, *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılabilecek etkili ilaç seçeneklerinin sayısını oldukça azaltmaktadır. Etkili ilaç seçeneklerinin azalması; *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif ilaç adaylarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu noktada, yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımı ön plana çıkmaktadır. *A. baumannii* pirüvat kinaz gibi bazı önemli glikolitik enzimlere sahip olmadığı için Emden-Meyerhof-Parnas glikolizini gerçekleştirememektedir. Bu glikolitik yolak yerine alternatif olarak Entner-Duodoroff glikolitik yolağını enerji üretmek için kullanmaktadır. Bu yolağın işletilmesi sonucunda oluşan Gliseraldehit 3-P'nin pirüvata dönüştürülmesi aşamasında; 2-P Gliserat'ın fosfoenol pirüvata dönüşümünü sağlayan enolaz hedef molekül olarak seçilmiştir. Enolazın enerji metabolizmasındaki görevinin yanı sıra bakterinin patolojisinde de önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında; *A. baumannii* enolaz enzimi hedeflenerek glikolitik yolağın inhibe edilmesi ile bu bakterinin sebep olduğu enfeksiyonların baskılanabileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda *A. baumannii* enolazının klonlanıp ifade edilerek yüksek saflıkta ve aktif bir biçimde üretilmesi ile yeni ilaçların geliştirilmesi için ileride gerçekleştirilebilecek olan ilaç çalışmalarında enolazın potansiyel bir hedef olarak kullanılabileceği tahmin edilmektedir.

2.1 *Acinetobacter* Cinsi

2.1.1 *Acinetobacter* Cinsinin Tarihçesi

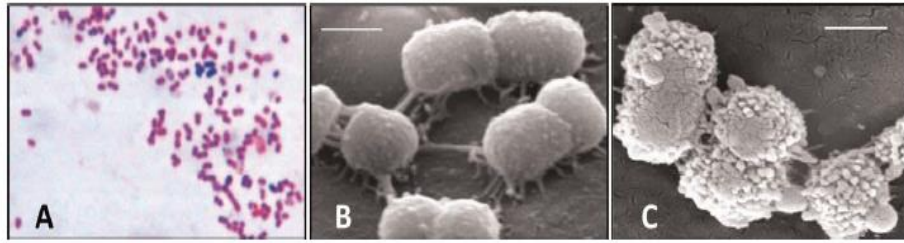
Acinetobacter cinsi, 1911 yılında Hollandalı mikrobiyolog olan Martinus Willem Beijerinck tarafından keşfedilmiştir. Kalsiyum-asetat mineral medyumu kullanılarak topraktan izole edilen bu cins, ilk olarak *Mikrococcus calco-aseticus* olarak isimlendirilmiştir [17]. *Acinetobacter* cinsi, 1950'li yıllara kadar birçok farklı şekilde isimlendirilmiştir [2]. Günümüzde kullanılan *Acinetobacter* ismi 1954 yılında Brisou ve Prevot tarafından önerilmiştir [18]. Brisou ve Prevot, birbirine benzer morfolojik özellikler sunan bu mikroorganizmalar arasında bazılarının hareket etmediklerini göstermişlerdir ve Yunanca hareket etmeyen manasına gelen 'Akinetos' kelimesinden esinlenerek bu bakterilere '*Acinetobacter*' ismini vermişlerdir [19].

2.1.2 *Acinetobacter* Cinsinin Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Acinetobacter türleri hızlı büyüme fazı esnasında genellikle 1.0–1.5 μm ile 1.5–2.5 μm arasında değişen bir büyüklüğe sahip olurlar. Kısa ve dolgun bir görünüm sergilerler. Durgun fazda ise genellikle kokoid haline dönüşürler, çoğunlukla çiftler halinde veya değişebilen çeşitli uzunluklarda uzun zincirler halinde bulunurlar [3]. *Acinetobacter* türleri zor gelişen bakteri türlerinden olmayıp uygun laboratuvar koşullarında kolayca büyüme gösterebilirler. Bazı türler 20-30°C aralığında gelişim gösterirken, klinik izolatların en iyi gelişim gösterdiği sıcaklık aralığı 37-42°C'dir. Çoğu tür için optimum gelişimin gözlemlendiği sıcaklık aralığı ise 33-35°C'dir. *Acinetobacter*in hücreleri farklı katı besiyeri ortamlarında farklı şekil ve renk özelliklerine sahip olabilirler. Örneğin; kanlı agar plaklarında 18-24 saat 37°C'de inkübasyon sonrası gelişim gösteren koloniler renksizdirler (beyaz veya krem renkli olabilir) ve 1-2 mm çapa sahip, düz, pürüzsüz veya mukoid (eğer

kapsül var ise) şeklinde olabilirler. Farklı agarlarda koloniler farklı renklere sahip olurlar. Örneğin; koloniler Eozin metilen mavi agarda mavi-gri bir renkte gözlemlenirken, Herellea agarda solgun eflatun renkte, Leeds *Acinetobacter* medyumunda ise mor zemin üzerinde pembe renkte gözlemlenirler [20] .

Acinetobacter türleri; katalaz pozitif, indol negatif, oksidaz negatif, sitrat pozitif özellik gösteren flagelluma sahip olmayan, hareketsiz, G+C içeriği %39-47 arasında değişen, zorunlu aerob gram negatif bakterilerdir [21,22]. Bu cinse ait olan bakteri türleri, glikozu fermente edemeyen kapsüllü kokobasillerdir. Özellikle büyümenin erken evrelerinde, akışkan ortamlarda hüküm sürerler. Çoğu *Acinetobacter* türü nitrata nitrite indirgeme yeteneğinde değildir [23]. *Acinetobacter*in hücre duvarı diğer gram negatif bakterilerin hücre duvarlarına benzer özellik gösterir fakat diğer gram negatif bakterilerle kıyasla kristal viyole ile boyama yapmak daha zordur. Bunun nedeni *Acinetobacter* hücre duvarının kristal viyoleyi tutmasıdır. Bu durum *Acinetobacter*lerin gram pozitif koklar olarak yanlış tespit edilmesine yol açabilir [5]. *Acinetobacter* türlerinden biri olan *Acinetobacter baumannii*'nin morfolojisi ve gram boyama sonucu oluşturduğu görüntü Şekil 2.1'de gösterilmiştir [24] .



Şekil 2.1 *A. baumannii*'nin boyanma özellikleri ve morfolojisi. (A) Kokoid ve kokobasil elemanlara sahip olan durgun faz hücrelerinin gram boyama görüntüsü, bazı mavi renkte görünen elemanlar kristal viyole boyasının tutulmasından kaynaklanmıştır. (B) ve (C) ise sırasıyla *A. baumannii* AYE ve ACICU suşlarının taramalı elektron mikroskop görüntüleridir [24].

2.1.3 *Acinetobacter* Cinsinin Doğal Habitatları

*Acinetobacter*ler genellikle çevrede yaygın olarak bulunan bakterilerdir. Bunun yanı sıra bu cinse ait olan bazı türler farklı habitatlarda da yaşamlarını sürdürebilirler. Bu habitatlara örnek olarak; su, toprak, kanalizasyon, insan, yiyecekler ve hayvanlar verilebilir. Bunların yanı sıra; derinin normal florasında, mukoza membranında ve insan solunum sisteminde bulunabilen *Acinetobacter* türleri de mevcuttur [10]. *A. baumannii* gibi bazı *Acinetobacter* türleri, genellikle hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalarda; ventilatörle ilişkili pnömoni ve kateterle ilişkili bakteriyemi başta olmak üzere, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olan kokobasillerdir [3]. Bu organizmalar daha çok hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastaların deri yüzeyinde, sindirim sistemlerinde ve orofarenkslerinde kolonize olmaktadır [3].

Hasta bireylerin belirli vücut bölgelerinde kolonize olmasının yanı sıra, Seifert ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışma sonrası, *Acinetobacter* türlerinin sağlıklı insanların vücudunda pek çok farklı lokasyonda bulunabileceği gösterilmiştir. Sağlıklı insanların alın, burun, kulak, boğaz, trake ve el gibi vücut bölgelerinden *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir [25].

Acinetobacter türleri kuş, balık gibi hayvanlardan da izole edilebilmektedir. Bununla birlikte yiyeceklerde *Acinetobacter*lerin yaşam alanlarındandır. Sebzelerden, meyvelerden, süt ve süt ürünlerinden *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir [10]. *Acinetobacter*ler kuru şartlara uzun süreler boyunca dayanıklıdırlar. Özellikle *A. baumannii*, tekrar kullanılabilir medikal ekipmanlardan sıklıkla izole edilirler. Buna ek olarak, sağlık personellerinin deri yüzeylerinden, hastanelerde kullanılan ventilatör ekipmanlarının tümünden ve nemli her yerden izole edilirler [12].

2.1.4 *Acinetobacter* Cinsine Ait Taksonomi

Acinetobacter cinsi uzun ve anlaşılması güç olan karmaşık bir taksonomik tarihe sahiptir. 1911 yılında, Beijerinck günümüzde *Acinetobacter* olarak tanınan mikroorganizmanın ilk örneğini izole edip tanımlamıştır. Bu tanımlamadan sonra bu cinsin üyeleri birçok farklı isim altında sınıflandırılmıştır (*Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*) [26]. Bu karışık durum, bu organizmaların klinik önemlerinin ve epidemiyolojilerinin doğru olarak saptanmasında zorluk yaşanmasına neden olmuştur. Günümüzde, gelişmiş moleküler metotların kullanımıyla birçok bakteriyel taksonomist tarafından geniş kabul gören bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre; *Acinetobacter*in sınıfı Gamma Proteobacteria, türü Pseudomonadales, ailesi Moraxellaceae, cinsi *Acinetobacter* olarak tanımlanmıştır [3]. *Acinetobacter*e ait olan en az 33 farklı tür saptanmıştır ve bu türlerin 18 tanesinin isimleri belirlenmiştir [27]. *Acinetobacter* cinsine ait olan türlerin bazıları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Çeşitli kaynaklardan izole edilebilen bazı *Acinetobacter* türleri [21]

<i>Acinetobacter</i> türleri	Elde edildiği Kaynak
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Toprak ve insan (klinik örnekler)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Toprak, insan (klinik örnekler), et ve sebzeler
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	İnsan (klinik örnekler)
<i>Acinetobacter junii</i>	İnsan (klinik örnekler)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	İnsan (klinik örnekler) ve hayvanlar
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	İnsan (klinik örnekler) ve hayvanlar
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Toprak, insan (klinik örnekler) ve pamuk
<i>Acinetobacter ursingii</i>	İnsan (klinik örnekler)

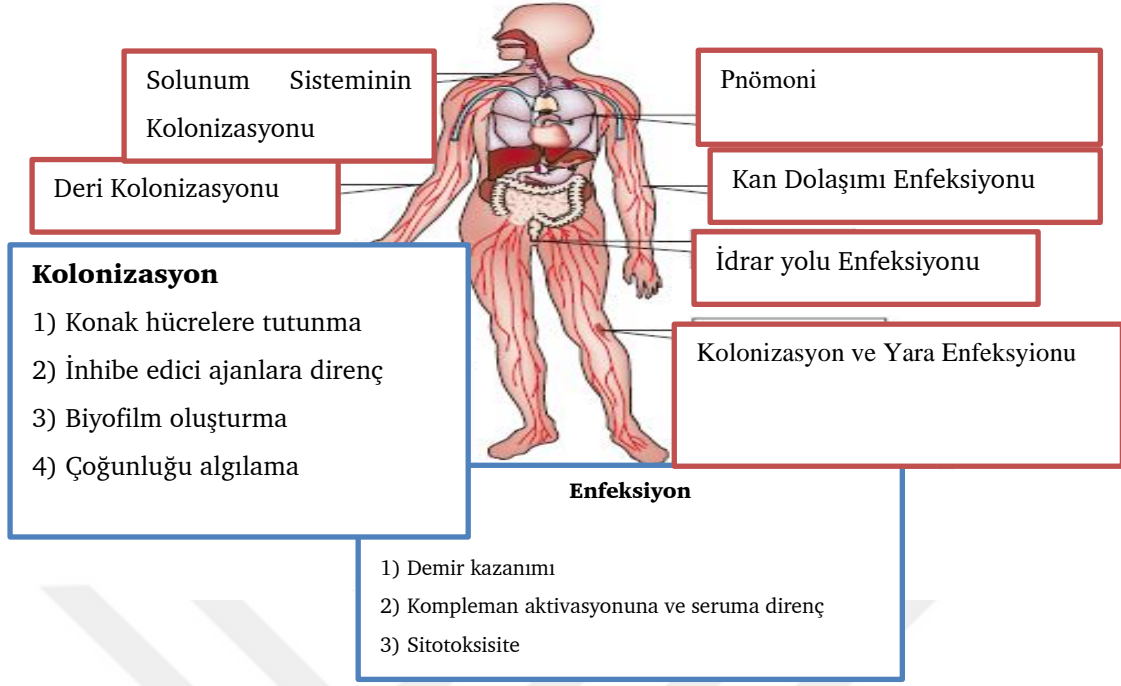
Bu türlerin çoğunluğu patojen olmayan çevresel organizmalardır. Bu cinsi oluşturan türler arasında; *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. schindleri* ve *A. ursingii*'nin patojen olduğu rapor edilmiştir [28]. Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar ve klinik dataların değerlendirilmesi sonucu elde edilen bilgiler sonucu *A. baumannii*'nin bu cinsine ait olan tüm türler arasında en virulent tür olduğu saptanmıştır [29]. *Acinetobacter* cinsi sürekli artan sayıda tanımlanan bakteriyel türe sahip olsa da bu türlerin az bir bölümü klinik olarak önem taşımaktadır. *A. baumannii*, *A. haemolyticus* ve *A. calcoaceticus* klinik olarak önem taşıyan *Acinetobacter* türleridir [24].

A. baumannii ve onun yakın akrabaları olan genomik tür 3 ve 13TU, “*Acinetobacter baumannii* kompleksi” adı verilen bir yapıyı oluştururlar. Bu kompleks, *Acinetobacter* türlerinin hastanelerde yol açtığı salgınlar ve enfeksiyonların büyük çoğunluğundan sorumlu olan ve bu yüzden klinik olarak en önemli genomik türleri içeren kompleks olarak tanımlanır [27]. Bu kompleksin üyelerini doğru bir şekilde tanımlayıp birbirlerinden ayırt etmek rutin laboratuvarlar için çok zor bir işlem olup, bu noktada gelişmiş moleküler diagnostik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu organizmaların yol açtığı enfeksiyonlar, hastalığı kritik şekilde seyreden hastaların bulunduğu yoğun bakım ünitelerinde gerçekleşmektedir [26]. Bu komplekse ait olan türler, en öldürücü özelliğe sahip olan antimikrobiyal bileşiklere karşı bile çok hızlı direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptirler. Bu türler evrende bulunan diğer bakterilerle genetik materyal değişimi yapabilmekte ve bu sayede düşük çevre sıcaklıklarında gelişimlerini sürdürebilmektedirler. Bu genetik değişim esnasında çevredeki diğer bakterilerden kazandıkları antibiyotik direnç genleri yoluyla birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirme potansiyeline sahiptirler [26].

2.2 *Acinetobacter baumannii*

2.2.1 *Acinetobacter baumannii*'nin Klinik Önemi

Gram negatif, nozokomiyal fırsatçı bir patojen olan *Acinetobacter baumannii*, dünya genelinde hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan, çoklu ilaç direnci gösteren en önemli altı mikroorganizmadan biridir [30]. Bu insan patojeni; deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, solunum sistemi enfeksiyonları ve sekonder menenjit gibi birçok ciddi enfeksiyonun oluşumundan sorumludur [31,32]. Bu enfeksiyonlar arasında kan dolaşımı enfeksiyonları ve ventilatör ilişkili pnömoni *A. baumannii*'nin yol açtığı en yaygın enfeksiyonlardandır. *A. baumannii*'nin yol açtığı enfeksiyonlar Şekil 2.2'de gösterilmiştir [27]. Bu enfeksiyonlar sonucu mortalite oranı %35'e kadar ulaşabilmektedir [6]. *A. baumannii*'nin yol açtığı enfeksiyonlar yaygın olarak hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalığı kritik seyreden ve cerrahi operasyon geçirmiş hastalarda görülür. *A. baumannii*; intravasküler kateterler, mekanik ventilatörler ve açık yaraların varlığı yoluyla vücuda kolayca giriş yapabilir. Hastanede tedavi süresinin uzunluğu, hastanın cinsiyeti ve yaş durumu, *A. baumannii*'nin sebep olduğu enfeksiyonları ile ilişkilendirilen önemli faktörlerdir [8,33]. Daha az yaygın olmakla birlikte *A. baumannii* toplumsal kaynaklı enfeksiyonlara da sebep olabilir. Bu enfeksiyonlar arasında bakteriyemi ve pnömoni en yaygın gözlemlenen enfeksiyonlardır. *Acinetobacter baumannii*'nin yol açtığı toplumsal kaynaklı enfeksiyonların %85'ini pnömoni oluşturur. Deri, yumuşak doku, göz enfeksiyonları, sekonder menenjit ve endokardit diğer toplum kaynaklı enfeksiyonlar arasındadır [34,35]. Bu enfeksiyonlar genellikle erkek cinsiyetinde yaygın olmakla beraber alkol kullanımı, yaş faktörü, sigara kullanımı, diyabet bu enfeksiyonların seyrini etkileyen unsurlardır. Toplum kaynaklı *A. baumannii* pnömonisi, nozokomiyal pnömoniyeye oranla daha ciddi seyredip daha ani gelişen bir hastalıktır ve mortalite oranı %60'a kadar ulaşabilmektedir [1].

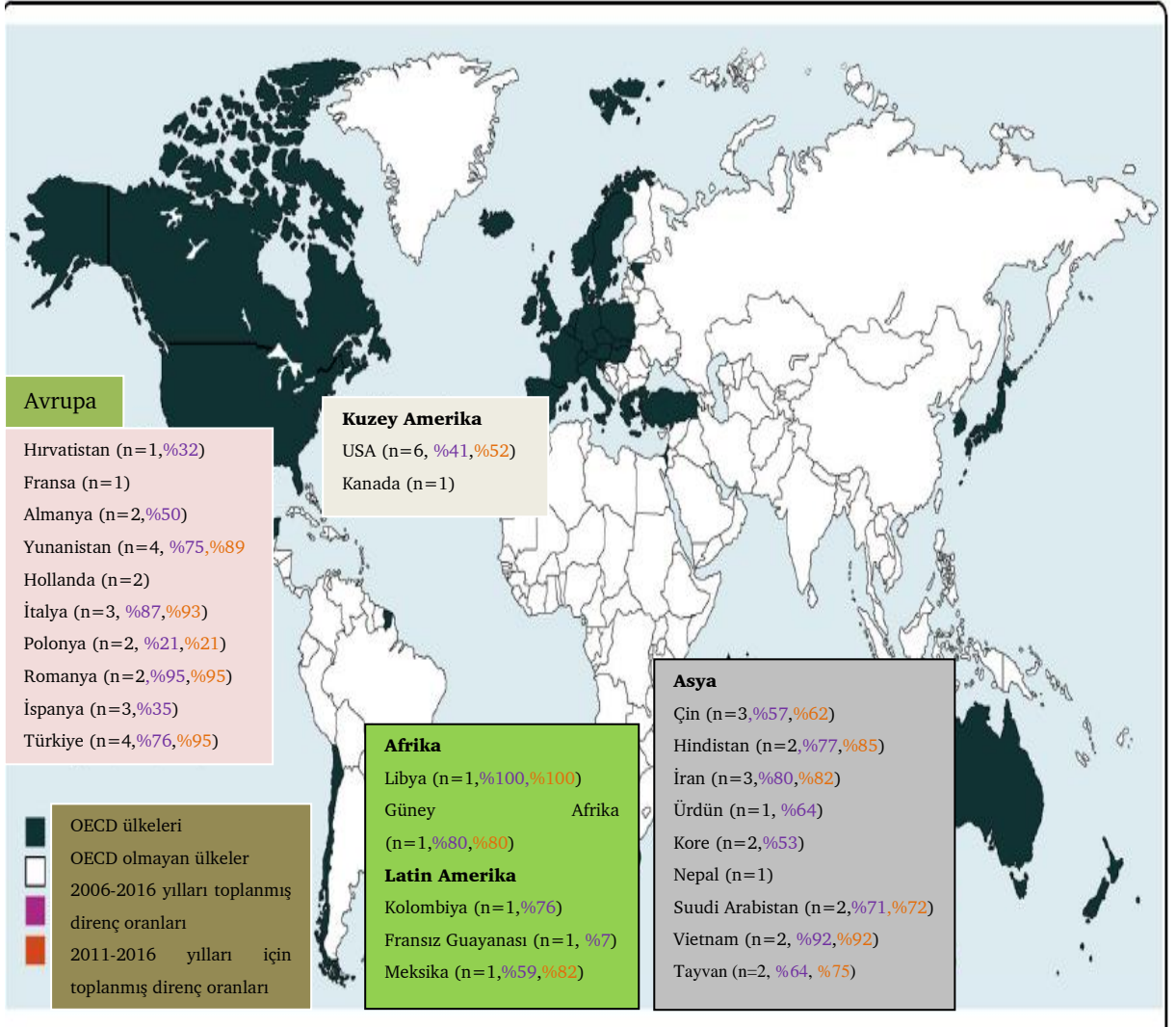


Şekil 2.2 *A. baumannii*'nin yol açtığı enfeksiyonlar ile *A. baumannii*'nin konağı enfekte etmesinde ve konağın kolonizasyonunda etkili olan faktörler [1].

A. baumannii hızlı bir şekilde ilaç direnci kazanması ve yüksek mortalite oranına sahip olması nedeniyle dünya genelinde sağlık hizmeti veren kuruluşlar arasında global tehdit olarak görülmektedir [36]. Amerika ve Avrupa'da sağlık hizmeti veren kuruluşlarda meydana gelen enfeksiyonların %2'sinden *A. baumannii*'nin sorumlu olduğu rapor edilmiştir [37, 38]. Bu oranın Asya ve Orta Doğu'da Amerika ve Avrupa ile kıyaslandığında iki kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir [57].

A. baumannii'nin yol açtığı enfeksiyon oranları diğer gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların oranından düşük olmasına rağmen küresel olarak bakıldığında tüm *A. baumannii* izolatlarının %45'inin çoklu ilaç direnci gösterdiği düşünülmektedir ve bu oranın Latin Amerika ve Orta Doğu'da %70'lere ulaşabildiği tahmin edilmektedir [39]. *A. baumannii* izolatlarında gözlemlenen bu yüksek çoklu ilaç direnci oranı, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi gram negatif bakterilerde gözlemlenen çoklu ilaç direnci oranının neredeyse dört katı kadardır [58].

Antimikrobiyal direnç günümüzde küresel bir kriz haline dönüşmüş durumdadır. Yapılan tahminlere göre eğer gerekli önlemler alınmaz ise 2050 yılına kadar her yıl yaklaşık 10 milyon kişinin antimikrobiyal direnç nedeniyle hayatını kaybedebileceği ön görülmektedir [40]. 2018 yılında *A. baumannii* enfeksiyonlarında antibiyotik direncinin küresel prevalansının analiz edildiği bir çalışmada direncin OECD ülkelerinde çok hızlı bir şekilde arttığı rapor edilmiştir [41]. Çoklu ilaç direncine sahip olan *A. baumannii*'nin aminoglikozidler, β -laktamlar (penisilin ve sefalosporinler hariç), karbapenemler, florokinolonlar ve tetrasiklinleri içeren üç veya daha fazla antimikrobiyal ajan sınıfına karşı dirençli olduğu belirtilmiştir. 2006-2016 yılları arasında OECD ülkelerinde imipeneme karşı geliştirilen antibiyotik direnci %53,6 iken OECD ülkeleri dışında kalan ülkelerde bu direnç oranının %76,8 olduğu belirtilmiştir. OECD ülkeleri arasında da antibiyotik direnç prevalansının önemli değişiklikler gösterdiği vurgulanmıştır. Fransız Guayanası ülkesinde imipeneme karşı antibiyotik prevalansı en düşük olarak (%7) saptanırken bu oran İtalya'da %87, Romanya'da %95 olduğu belirtilmiştir. Türkiye'de ise 2006-2016 yılları arasında imipeneme direnç yüzdesi %75 iken 2011-2016 yılları arasında bu yüzdenin %95'e yükseldiği gözlemlenmiştir. İki farklı zaman periyodunda, OECD ve OECD ülkelerine dahil olmayan ülkelerde *A. baumannii* enfeksiyonlarının imipeneme karşı geliştirdiği ilaç direnci yüzdesi Şekil 2.3'de gösterilmiştir [41].



Şekil 2.3 OECD ve OECD ülkelerine dahil olmayan ülkelerde; iki farklı zaman periyodunda *A. baumannii* enfeksiyonlarının imipeneme karşı göstermiş olduğu ilaç direncinin yüzde olarak gösterilmesi. N: Her ülkede yapılmış olan toplam araştırma sayısını gösterir [41].

İmipenem kullanımının yanısıra Tigesiklin *A. baumannii* enfeksiyonlarında antibiyotik direnci için son çare olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlardan biridir. *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaklaşık 10 yıl gibi kısa bir süre kullanılmasına rağmen OECD ülkeleri ve OECD ülkeleri dışında kalan ülkelerde yüksek direnç yüzdesi gözlemlenmiştir. Gelişen yüksek ilaç direnci yüzdesi tigesiklini *A.baumannii* enfeksiyonlarına karşı duyarsız hale getirmiştir [41]. Kolistin ilaç direnci gösteren *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için son çare olarak görülen antimikrobiyal ajanlardan bir diğeridir [42,43]. 2006-2016 yılları arasında, OECD ülkelerinde kolistin direncinin prevalansı %1.4'ten

daha düşük olduğu belirtilirken OECD ülkelerine dahil olmayan ülkeler bu prevalans %2.3'ten düşük olarak rapor edilmiştir. Bu direnç yüzdelerinden yola çıkılarak kolistinin günümüzde *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı kullanılan en aktif antimikrobiyal ajan olduğu gösterilmiştir [61]. Bu çalışma sonucu OECD ülkelerinde ve OECD ülkelerine dahil olmayan ülkelerde *A. baumannii*'nin sahip olduğu çoklu ilaç direnci prevalansının yüksek olduğu kanıtlanmış olup sırasıyla 56.9% ve 80.4%'tür Yunanistan ve Türkiye çoklu ilaç direnci prevalansı en yüksek olan ülkelerdir. Yunanistan'da bu oran %90 iken Türkiye'de %96'dır. En düşük çoklu ilaç direnci prevalansı ise Kanada'da gözlemlenmiştir. Çoklu ilaç direnci gösteren *A. baumannii* enfeksiyonları genel olarak yüksek mortalite ile ilişkilendirilir. Dünya genelinde bu mortalitenin %42.7'ye ulaşabileceği belirtilmiştir. Örneğin Amerika en düşük mortalite oranına sahipken (%27), Türkiye'de bu oran %64, Kore'de %52'dir [61].

Antimikrobiyal direnç oluşturma konusunda *A. baumannii*'nin çok yüksek potansiyele sahip olduğu ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da gösterilmiştir. *A. baumannii*, ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından dünya sağlığına karşı çok ciddi bir tehdit olarak kategorize edilmiştir [55].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) insan sağlığını tehdit eden en tehlikeli bakterileri (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Enterobacteriaceae*) duyurduğu listesinde; karbapeneme direnç gösteren *A. baumannii*'yi listenin en kritik ve en tehlikeli sınıfına dahil etmiştir ve bu dirençli *A. baumannii*'ye karşı yeni antimikrobiyal tedavilerin geliştirilmesi için araştırma çalışmalarının öncelikli hale getirilmesi gerektiğini duyurmuştur [6]. Günümüzde *A.baumannii* neredeyse bilinen tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş durumdadır [44]. Klinisyenler bu durum karşısında *A. baumannii* enfeksiyonlarına karşı eskiden kullandıkları ciddi yan etkilere sahip olan kolistini seçmek zorunda kalmışlardır [45]. Bu zorunlu tedavi seçiminin yanı sıra, bazı coğrafik bölgelerde *A. baumannii* klinik izolatlarının kolistine karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir. Bu durum *A. baumannii*'nin

sebepler olduğu enfeksiyonlara karşı son çare olarak kullanılan kolistin de etkisiz hale geleceğini göstermektedir [46].

2.2.2 *Acinetobacter baumannii*'nin Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

A. baumannii, antimikrobiyal direnç kazanmadaki üstün yeteneğinden dolayı modern sağlık kuruluşlarında ciddi sorunlara yol açan en tehlikeli patojenlerden biri olarak değerlendirilmektedir. *A. baumannii*'nin birçok suşu, klinik olarak mevcut olan çoğu antibiyotiğe karşı dirençli durumdadır [47].

A. baumannii birçok farklı antimikrobiyal direnç mekanizmasına sahiptir. Beta-laktamazlar, aminoglikozid modifiye edici enzimler, efflux pompaları, geçirgenlik kusurları ve hedef bölgelerin modifikasyonu gibi mekanizmalar *A. baumannii*'nin antimikrobiyal direnç mekanizmalarını oluşturmaktadır. Bu antimikrobiyal direnç mekanizmaları arasında beta-laktamazlar tarafından beta-laktamların inaktivasyonu ana antimikrobiyal direnç mekanizmasıdır [48].

2.2.3 *Acinetobacter baumannii*'nin Neden Olduğu Enfeksiyonları Tedavi Etmek İçin Kullanılan Mevcut Antibiyotik Seçenekleri

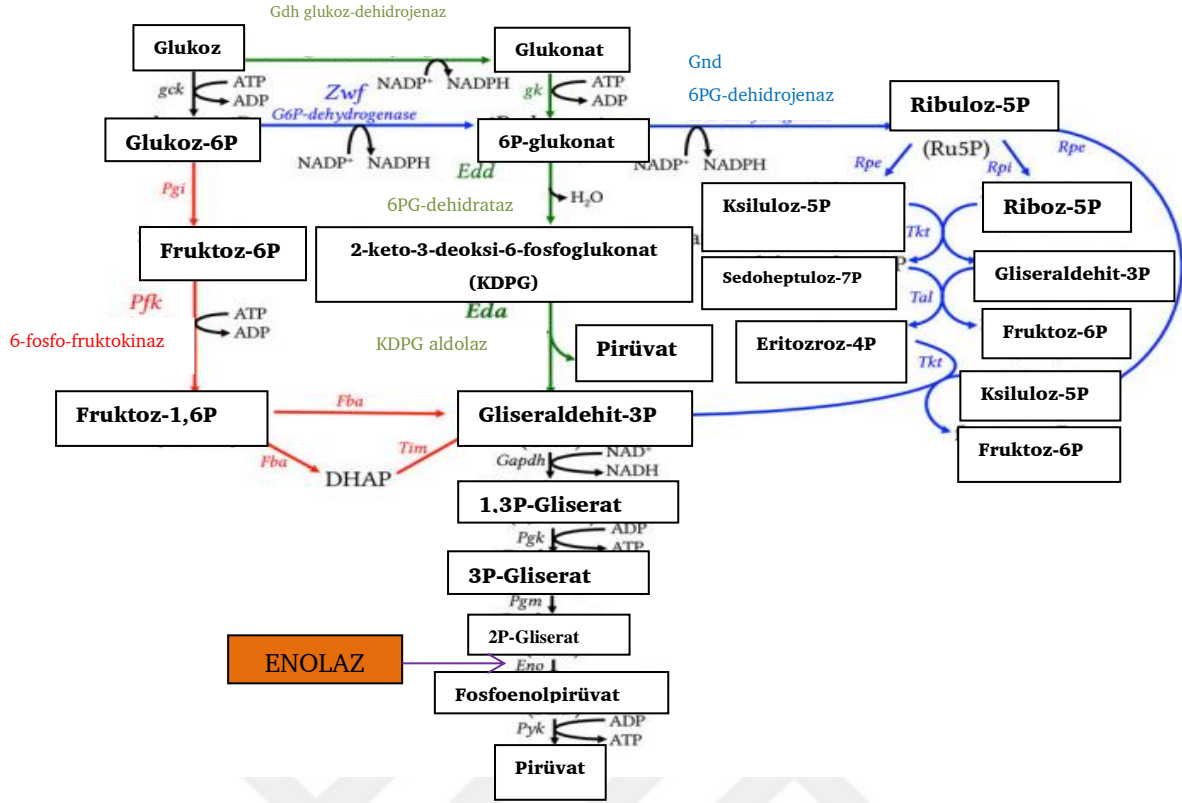
İmipenem, meropenem ve doripenemi içeren karbapenemler, genellikle *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi edebilen ajanlar olarak değerlendirilirler. Karbapenemlerin bu organizma üzerindeki etkili aktiviteleri ve vücuda alındığında diğer antibiyotiklerle kıyaslandığında daha güvenli olması sebebiyle, *A. baumannii* enfeksiyonlarını tedavi etmek için karbapenemler tercih edilmektedir. Buna rağmen *A. baumannii*'nin karbapenemlere olan duyarlılığı gün geçtikçe azalmakta olup *A. baumannii* bu antibiyotik sınıfına karşı da direnç geliştirmektedir. Bu gelişen direnç durumu, klinisyenleri ve araştırmacıları alternatif terapötik yaklaşımlar geliştirmek zorunda bırakmaktadır [49].

Karbapenemlere dirençli *A. baumannii* suşları, yaygın olarak kullanılan neredeyse diğer tüm antibiyotiklere karşı dirençlidirler ve günümüzde minosiklin/tigesiklin ve polimiksinleri (kolistin ve polimiksin B) içeren sadece sınırlı sayıda antibiyotiklere karşı duyarlı durumdadır [47]. *A. baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan sınırlı sayıda etkili antibiyotiklerle kombine edilmiş

karbapenem terapileri, çok yoğun bir şekilde klinisyenler ve araştırmacılar tarafından çalışılmaktadır ve çoğu vakada, bu tedaviler *A. baumannii*'ye karşı sinerjistik etki göstermektedir. Bununla beraber son yıllarda tespit edilen tigesiklin ve kolistin dirençli *A. baumannii* suşlarının artış göstermesi, dünya çapında toplum sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir [50,51].

2.3 A. baumannii Enerji Metabolizması

Tüm canlılar için glukozun parçalanmasını sağlayan yollar karbon metabolizması ve enerji üretimi için gereklidir. Bu yollar amino asitler, nükleotidler ve yağ asitleri için; ATP, NAD(P)H ve biyosentetik öncü moleküllerin sentezini gerçekleştirirler ve bu yüzden hayati öneme sahiptirler [52]. Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) yolağı (klasik glikolizis), oksidatif pentoz fosfat yolağı (OPP) ve Entner-Doudoroff (ED) yolağı karbonhidratları okside etmek için kullanılan yollardır. EMP yolağı (glikolizis) ve oksidatif pentoz fosfat yolağı ökaryotik karbon ve enerji metabolizmasının temelini oluşturur. Prokaryotlarda bu durumun aksine şeker oksidasyon yollarında geniş bir çeşitlilik gözlemlenmektedir Bu yollar; ATP üretim verimlerine, kimyasal ara ürünlerine, kullanılan enzimlere ve bu enzimlerin kofaktörlerine göre farklılık göstermektedirler. Prokaryotlarda en yaygın bulunan glikolitik yollar; EMP, OPP ve ED yollarıdır (Şekil 2.4) [52].



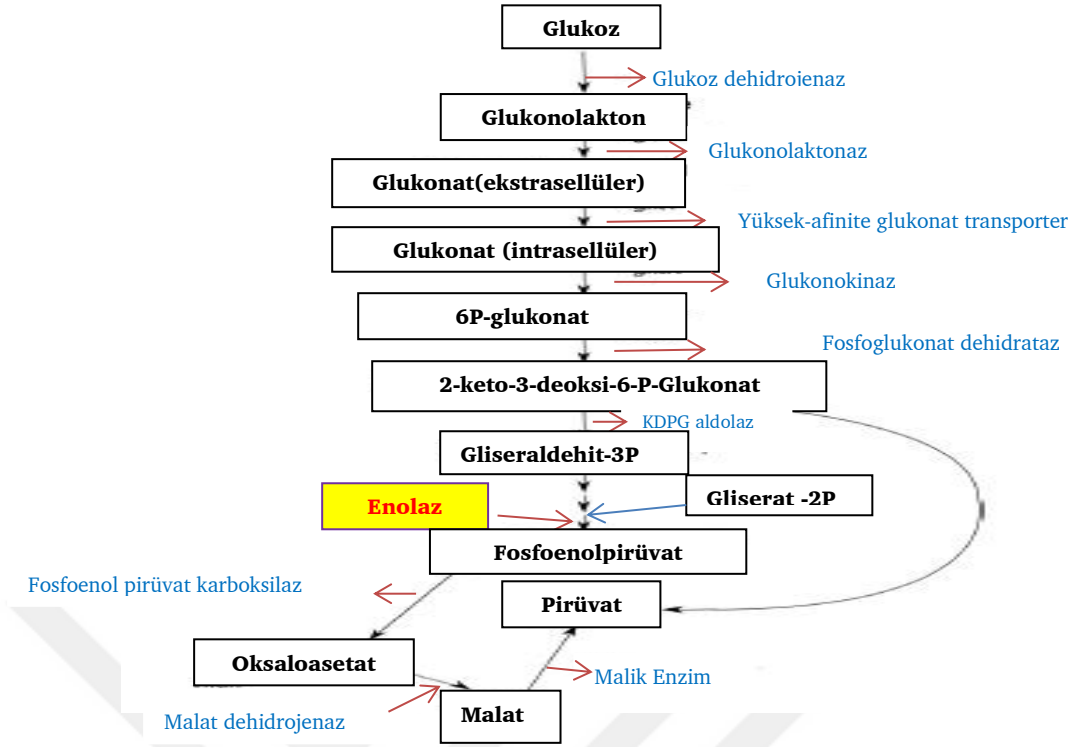
Şekil 2.4 Prokaryotlarda en yaygın kullanılan glikolitik yollar. EMP yolağı PFK enzimiyle beraber kırmızı renkle, OPP yolağı Zwf enzimiyle mavi renkte, ED yolağı KDPG aldolaz (Eda) enzimiyle yeşil renkte gösterilmiştir. Tüm yollarında ortak olan reaksiyonlar siyah ile belirtilmiştir. Eda, KDPG aldolaz; Edd, fosfoglukonat dehidrataz; Eno, enolaz; Fba, fruktoz bisfosfat aldolaz; Gdh, glukoz dehidrojenaz; Gk, glukonat kinaz; Gnd, 6-fosfoglukonat dehidrojenaz; Pgm, fosfogliserat mutaz; Pfk, 6-fosfofruktokinaz; Pgi, fosfoglukoz izomeraz; Pgk, fosfogliserat kinaz; Rpe, ribuloz-5-fosfat epimeraz; Rpi, ribuloz-5-fosfat izomeraz; Tal, transaldolaz; Tim, triosefosfat izomeraz; Tkt, transketolaz; Zwf, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz [52].

Katabolik yolda; ED yolağına özgü en önemli enzim 2-keto3-deoksiglukonat-6-fosfat (KDPG) aldolaz (Eda) iken, fosfofruktokinaz (PFK) ise EMP yolağına özgü en önemli enzimdir. Bir metabolit olarak KDPG yalnızca ED yolağında bulunur. OPP yolağının ilk iki basamağı glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (Zwf) ve 6-fosfoglukonat dehidrojenaz (Gnd) tarafından katalize edilir [52].

İnsanda meydana gelen çok sayıda nözokomiyal enfeksiyona sebebiyet veren *A. baumannii*, sahip olduğu güçlü ve çok yönlü metabolizmasıyla çeşitli karbon kaynakları ve enerjiden faydalanabilme yeteneğinde olup, farklı şartlara uyum sağlayabilmektedir. [53]. *A. baumannii* genomu bir kromozomdan ve çok sayıda

plazmidten oluşmaktadır. *A. baumannii* türleri üzerinde yapılan metabolizma çalışmalarında *A. baumannii*'nin birçok temel enzimden eksik olduğu onaylanmıştır. Fosfotransferaz transport sistem proteinleri, 6-fosfofruktokinaz, pirüvat kinaz ve glukokinaz *A. baumannii*'de var olmayan enzimlerdir [54]. Bu enzimlerin bulunmamasında dolayı *Acinetobacter* türlerinde Embden–Meyerhof–Parnas glikolizi gerçekleştirilememektedir. Bu glikolitik yol yerine alternatif olarak Entner-Doudoroff glikolitik yolağı kullanılmaktadır [55]. Bu glikolitik yolak için gerekli tüm genler, 3 farklı *Acinetobacter* genomunda tanımlanmıştır. *Acinetobacter baylyi* ve *A. baumannii* SDF suşu membran-bağılı quinoprotein glikoz dehidrojenazı [56] kodlayan sadece *gcd* genine sahipken *A. baumannii* AYE suşu quinoprotein glikoz dehidrojenazların çözünür formlarını (s-GDH) [57] kodlayan iki tane fazladan gene (ABAYE1605, ABAYE1751) sahiptir. Bu durum muhtemelen hücre tarafından sağlanan alternatif substratlardan yararlanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu noktada *Acinetobacter*lerde farklı gen içeriklerinin farklı yaşam stilleri sunduğu anlaşılmaktadır [58]. Glikoliz glukozu pirüvat ve hidrojen iyonlarına dönüştüren metabolik yoldur. Glikoliz sonucu üretilen serbest enerji yüksek enerjili bileşikler olan ATP (adenozin trifosfat) ve NADH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid) üretmek için kullanılır. Çoğu bakteri klasik glikolizi (EMP yolağı) kullanırken, bazı bakteriler klasik glikoliz yerine Entner-Doudoroff glikolitik yolağını enerji üretmek için kullanırlar. Fosfofruktokinaz-1 gibi klasik glikoliz için gerekli enzimleri bulunmayan bakteriler bu yolağı tercih etmektedir. Genellikle; *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter* ve bazı gram-negatif bakterilerde bu yolak bulunur. *Enterococcus faecalis* gibi çok az sayıda gram pozitif bakteride de bu yolağa rastlanır. ED yolağını kullanan çoğu organizma her bir glukoz molekülü için düşük ATP veriminden dolayı aerobtur. ED yolağının ayırt edici özellikleri şunlardır: 1) Sadece prokaryotlarda meydana gelir. 2) 6-fosfoglukonat dehidratase ve 2-keto-3-deoksifosfoglukonat aldolase glukozdan pirüvat oluşturmak için kullanılır. 3) Reaksiyona giren her bir glukoz molekülünden net 1 ATP, 1 NADH ve 1 NADPH üretimi gerçekleşir. Klasik glikoliz ile kıyaslandığında; klasik glikolizde her bir işlenen glukoz molekülü için net 2 ATP ve 2 NADH üretilmektedir [59].

Entner-Doudoroff glikolitik yolağı ilk olarak 1952 yılında Michael Doudoroff ve Nathan Entner tarafından *Pseudomonas saccharophila* bakterisinde rapor edilmiştir [60]. *Acinetobacter*lerin Entner-Doudoroff yolağını araştırmak için, geniş substrat spektrumu ve genomunun üzerinde dñzenlemelerin kolay yapılabilmesi nedeniyle *Acinetobacter baylyi* model organizma olarak kullanılmıştır. *A. baylyi* pirñvat kinaz genine sahip olmadığı için eşsiz bir glukonat metabolizmasına sahiptir [10]. *A. baylyi* sitrik asit dñngñsñ yoluyla ana metabolik yollara giren karbon kaynakları üzerinde genellikle iyi bir şekilde bñyñme gñsterirken, glukozun bulunduğu ortamdaki bñyñmesi ise daha yavaştır. *A. baylyi* glukozu Entner-Doudoroff yolağını kullanarak katabolize etmektedir. Bu yolda bir glukoz molekñlñ 1 molekñl pirñvat ve 1 molekñl gliseraldehit 3-fosfata dñnñřmektedir. Pirñvat, sitrik asit dñngñsñne yñnlendirilirken; gliseraldehit 3-fosfat önce fosfoenolpirñvata, bir sonraki adımda karboksillenip oxaloasetata, daha sonra malata dñnñřtirñlñp son adımda dekarboksillenerek pirñvata dñnñřtirñlñr. *Acinetobacter*ler pirñvat kinaz enziminden yoksun oldukları için glukozdan pirñvat üretmek için bu dñngñ gereklidir [61]. *A. baylyi* ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda *Acinetobacter*lerin kullandığı Entner-Doudoroff glikolitik yolağı şekil 2.5'te gñsterilmiřtir.



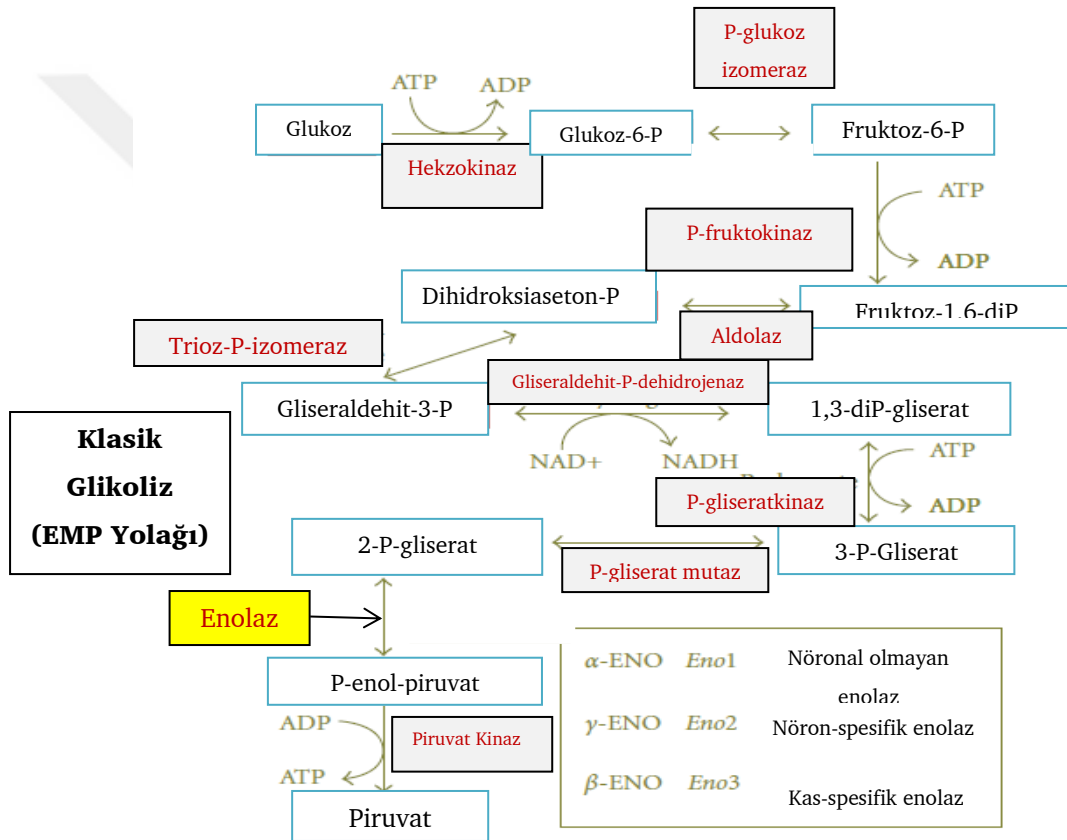
Şekil 2.5 *Acinetobacter*lerin Entner-Doudoroff glikolitik yolağı [10] (modifiye edilmiştir).

Bu tez kapsamında *A. baumannii*'nin enerji metabolizmasında Entner–Doudoroff glikolitik yolağında Gliseraldehit 3-P oluşuktan sonra pirüvatın oluşumunu izleyen metabolik yolda; 2-fosfo-D-gliseratın fosfoenolpirüvata (PEP) dönüşümünü katalize ederek *A. baumannii*'nin enerji metabolizmasında görev alan enolaz hedef olarak seçilmiştir. *A. baumannii* zorunlu aerob olduğu için oksijenli solunum basamağına geçilmeden önce enolazı hedef alan bir inhibitör belirlenerek enolazın Entner–Doudoroff glikolitik yolağındaki görevi engellenerek bakterinin enerji ve pirüvat üretmesi için gerekli yollardan birinin baskılanması amaçlanmaktadır.

Bu tezde; enolaz inhibe edilerek bakterinin etkinliğinin baskılanması doğrultusunda enolaz enzimi hedef protein olarak seçilip üzerine klonlama, homoloji modelleme ve moleküler yansıtırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.4 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı Hedefi Olarak Enolaz

Fosfopirüvat hidrataz olarak da adlandırılan enolaz (2-posfo-D-gliserat hidrolaz; EC 4.2.1.11), 1934 yılında Lohman ve Mayerhof tarafından keşfedilmiştir. Çok sayıda organizmada çok yüksek miktarlarda eksprese edilen sitozolik bir protein olan enolaz, katabolik glikolitik yolağın son basamaklarından biri olan 2-fosfo-D-gliseratın (2-PGA) fosfoenolpirüvata (PEP) dehidratasyonunu katalize eden önemli bir glikolitik enzimdir. Şekil 2.6'da EMP glikolitik yolağında enolazın görevi gösterilmiştir [11].



Şekil 2.6 Klasik Glikoliz (EMP) yolağı [11] (modifiye edilmiştir).

Bu enzim, glikolizin ters reaksiyonu olan glukogenesis sırasında ise PEP'in 2-PGA'ya hidrasyonunu katalize etmektedir [62]. Enolaz, glikolitik yolağın önemli bir basamağında görev aldığı için prokaryotik ve ökaryotik canlılar için oldukça önem taşımaktadır. Katalitik olarak aktif olabilmek için magnezyum metal

iyonuna ihtiyaç duyan bir metalloenzim olan enolaz, memelilerden arkebakterilere kadar birçok canlıda bulunur ve nükleotid dizisi yüksek oranda korunmuştur [63].

Enolaz iki farklı metal bağlanma bölgesine sahiptir. Konformasyonel metal bağlanma bölgesi enzimde konformasyonel değişiklikleri indükleyerek substrat analoglarının ve substratın bağlanmasına imkan tanır [64]. Substat veya substrat analogunun bu bölgeyle etkileşmesini takiben katalik olarak adlandırılan ikinci metal iyonu ikinci metal bağlanma bölgesine bağlanır ve katalitik reaksiyon meydana gelir. Bağlanmış olan ligandların salınması ise daha kompleks olup, yüksek metal iyon konstanstrasyonlarının enolazı inhibe etmesiyle gerçekleşir [65]. Enolaz, glukozun anaerobik olarak oksidasyon için uygun bileşenlere dönüşmesi için gereklidir [66].

Omurgalılarda enolaz 3 farklı izoformdan oluşmaktadır. α -enolaz (*Eno1*), β -enolaz (*Eno3*) ve γ -enolaz (*Eno2*) bu izoformları oluşturmaktadır. α -enolaz (*Eno1*) neredeyse tüm insan dokularında bulunmakta iken β -enolaz (*Eno3*) genellikle kas dokularında, γ -enolaz (*Eno2*) ise sadece nöron ve nöroendokrin dokularda bulunmaktadır [67]. Bu üç enolaz izoformu da yüksek dizi benzerliği ve benzer kinetik özellikler göstermektedir [11]. α -enolazın (*Eno1*) monomeri; nispeten daha küçük N-terminal domaininden (1-133 rezidüleri) ve nispeten daha büyük C-terminal domaininden (141-431 rezidüleri) oluşmaktadır [68]. Enolaz prokaryotlarda dimer ya da oktamer olarak bulunabilirken memelilerde dimer olarak bulunmaktadır [69].

Dimerik formda (homodimer veya heterodimer) bulunan enzimatik olarak aktif enolaz herbiri antiparalel şekilde karşılıklı duran 2 alt üniteden oluşmaktadır [70]. Ayrıca mayada ve insanda enolazın kristal yapısı belirlenmiş olup, katalitik mekanizmaları araştırılmaktadır [71,72].

Enolazın enerji metabolizmasındaki fonksiyonunun yanısıra, birçok farklı işleve sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin; farelerin mast hücrelerinin farklılaşmasında etkin rol oynamaktadır [73]. Farklı tümör hücre hatlarında enolaz ekspresyonunun azaltıldığı bir çalışmada, bu etkinin kanser hatlarının mikrotübüllere karşı olan hassasiyetini çok ciddi şekilde arttırdığı gösterilmiştir.

Bu durum enolaz ekspresyon seviyesinin tümör hücre hatlarının anti-tübülin ilaçlarına karşı hassaslığını etkileyebileceğini göstermiştir [74]. Bu fonksiyonlarının yanı sıra enolazın spesifik apoptoz mekanizmalarında da görev yaptığı belirtilmiştir [75]. α -enolazın (*Eno1*) alternatif stop kodonlarını kullanarak çok sayıda biyolojik ve patofizyolojik proseste önemli rol oynadığı gösterilmiştir. α -enolaz (*Eno1*) mRNA'sının translasyonu sonrası ilk 96 aminoasit rezidüsünden yoksun 37 kDa'luk bir protein oluşabilmektedir. C-myc promotör-bağlanma protein 1 (MBP-1) olarak adlandırılan bu protein nükleusta konumlanıp c-myc P2 promotörüne bağlanabilir ve bu durum protoonkogenlerin transkripsiyonunu negatif olarak düzenleyebilmektedir [76]. α -enolaz (*Eno1*); endotelial hücreler, B ve T hücreleri ile monositler gibi hematopoietik hücrelerin yüzeylerinde güçlü bir plazminojen reseptör olarak tespit edilmiştir ve periselüler fibrinolitik aktiviteyi düzenleme görevini üstlenmektedir [77,78].

Ayrıca α -enolaz, nörotropik faktör, ısı-şok proteini (HSP48) ve hipoksik stress proteini olarak da tanımlanmıştır [195]. Buna ek olarak, pirüvat kinaz ve fosfogliserat mutaz gibi glikolitik yolda enolaza komşu olan glikolitik enzimlere ve iskelet proteinleriyle ilişkili olan aldolaza yüksek afinitiyile bağlanabilme özelliğine sahiptir [79].

Gerçekleştirilen bir çalışmada, α -enolazın upregülasyonu sonucu glikolitik olmayan mekanizmalar yoluyla hipoksi toleransına sebep olabildiği önerilmiştir [195]. Yapılan bir başka çalışmada ise α -enolazın normalden fazla ekspresyonunun tümör gelişimi ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Bu rapor doğrultusunda enolazın çok sayıda tümörün tanısına yönelik bir belirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir [80].

Enolaz enzimatif aktivitesinin yanı sıra çok sayıda prokaryotik ve ökaryotik hücrede, α -enolaz (*Eno1*), hücre yüzeyinde eksprese olup plazminojen reseptörü olarak hareket ederek hücre göçünde ve kanser metastazında rol oynar [81,82]. *Bacillus anthracis* ile yapılan bir çalışmada bu bakterinin yüzeyinde konumlanan α -enolazın insan plazminojenine bağlandığı gösterilmiştir [83]. Buna benzer olarak 2001 yılında *Streptococcus pneumoniae* ile yapılan bir çalışmada da

bakterinin hücre yüzeyinde yer alan enolazın plazminojen bağlanma proteini olarak görev yaptığı bildirilmiştir [84].

Lactobacillus plantarum üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada ise hücre yüzeyinde konumlanmış α -enolazın, bakteri ve endotelial hücreler arasındaki etkileşimin gerçekleşmesinde görevli bir ekstraselüler matriks proteini olan fibronektin ile etkili bir bağlanma gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada α -enolazın fibronektin bağlanma proteini olarak görev yaptığı gösterilmiştir [85]. *Streptococcus sobrinus* enolazı ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise enolazın immüno-supresif protein olarak görev yaptığı rapor edilmiştir [86].

S. aureus enolazı üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada ise bu bakteriye ait olan enolazın laminin bağlanma proteini olarak görev yaptığı gösterilmiştir [87]. Gerçekleştirilen bu araştırma sonuçlarından yola çıkılarak enolazın enerji metabolizmasındaki işlevinin yanı sıra çok sayıda farklı ve önemli hücresel fonksiyonlarının olduğu, bu bilgilerden yola çıkılarak canlılar için çok önemli bir protein olduğu anlaşılmaktadır [195].

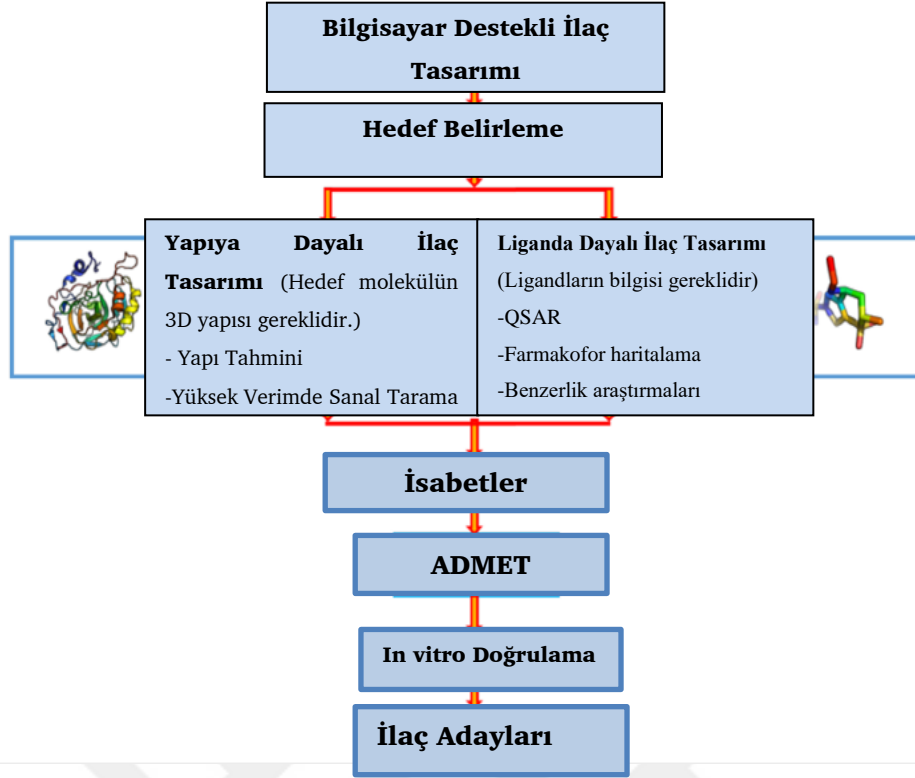
2.5 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

Yeni bir ilacın keşfini ve geliştirilmesini içeren prosesler genellikle zaman alıcı, riskli ve masraflı olarak değerlendirilmektedir. Özgün bir ilacın keşfedilmesini ve geliştirilmesini kapsayan bu döngü yaklaşık olarak 10-15 yıl gerektirmektedir [7]. Yeni keşfedilen bir ilaç, FDA onaylı bir şekilde satılabilecek duruma gelene kadar yaklaşık 0.6 milyon dolar ile 1.8 milyon dolar arasında bir maliyet gerektirmektedir [88].

Yüksek çıktılı görüntüleme teknolojisinde ve kimya alanında önemli gelişmelerin yaşanması, kısa süre içinde çok büyük bileşik kütüphanelerinin sentezlenebilmesine ve görüntülenebilmesine imkan tanıyarak ilaç keşfi prosesine çok önemli hız kazandırmıştır [89]. Yeni ilaç geliştirme alanında yapılan yatırımlar son yıllarda önemli miktarda artış göstermesine rağmen ilaç keşfindeki yüksek başarısızlık oranı ve düşük verimlilikten dolayı alınan sonuçlar yapılan yatırımla pozitif olarak orantılı değildir [8].

Bu doğrultuda, ilaç keşi için başarıszlık riskini ve maliyeti azaltan, araştırma döngüsünü kısıltan çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu amaca ulaşmak için kullanılan en etkili metotlardan biri bilgisayar destekli ilaç tasarımıdır. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı; bileşiklerin modellenmesi, analizi, yönetimi ve depolanması için gerekli kaynaklar ile hesaplama araçlarını temsil eden çok yaygın kullanılan bir yaklaşımdır [90]. Bu yaklaşım, kimyasal etkileşimlerin çalışılması için dijital depoların geliştirilmesi ve bileşiklerin dizayn edilmesi için kullanılan bilgisayar programlarını içeren ilaç keşfinin çok farklı yönlerini içinde barındırır. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı, ilaç olma potansiyeli gösteren öncü adayların toksisitelerinin ve farmakolojik etkilerinin değerlendirilmesine imkan tanıyıp, bu öncü adayların seçiciliğinin erken değerlendirilmesinin de yolunu açmaktadır. Bu sayede ilaçların keşfedilmesi için gereken maliyette tasarruf sağlayıp yeni moleküllerin daha hızlı bir şekilde geliştirilmesine olanak vermektedir. Hesaplamalı tekniklerin uygulanması yeni moleküler yapıların keşfedilmesine ve geliştirilmesine yardımcı olarak bilgisayar destekli ilaç tasarımının temelini oluşturmaktadır [90].

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı temel olarak; yeni bileşiklerin tasarımının yapılması, ADMET (metabolizma, salınım, toksisite, dağılım ve emilim) verilerini kapsayan ilaç metabolizmasının ve farmakokinetik özelliklerin optimize edilmesine aracılık etmek ve büyük bileşik kütüphanelerini deneysel metotlarla test edebilme hedefiyle öngörülen aktif bileşiklerin oluşturduğu kk boyutta setlere filtrelemek gibi amaçlar için kullanılmaktadır [91]. Yaygın olarak kullanılan bilgisayar destekli ilaç keşi yaklaşımları; yapıya dayalı ilaç tasarımı, liganda dayalı ilaç tasarımı ve dizi temelli yaklaşımlar olarak gruplandırılabilir [9]. Bilgisayar destekli ilaç tasarımını oluşturan yaklaşımların şematik gösterimi şekil 2.7'de gösterilmiştir [92].



Şekil 2.7 Bilgisayar destekli ilaç tasarım basamakları [93].

Yapıya dayalı ilaç tasarımı, hedef olarak belirlenen molekülün (enzim/reseptör) üç boyutlu yapı bilgisi kullanılarak potansiyel ligandların taranması, bu işlem sonrasında deneysel olarak biyolojik testlerin gerçekleştirilmesi ve optimizasyon basamaklarını kapsamaktadır. Moleküler yanaştırma ve *de novo* ilaç dizaynı gibi yapıya dayalı ilaç tasarımı metotları; homoloji modellerinden, NMR verilerinden ve kristal yapılardan elde edilen hedef makromolekülün yapı bilgisini kullanmaktadır [9].

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı oluşturulan bir diğer yaklaşım olan liganda dayalı ilaç tasarımı ise teorik çalışmalar sonucu tahmin edilen modelin tasarlanıp oluşturulması için, hesaplamalı modelleme yöntemlerini kullanarak çeşitli yapıları ve potansiyeli daha önceden bilinen molekülleri değerlendiren yaklaşımdır [93]. Eğer potansiyel hedeflerin 3 boyutlu (3D) yapısı mevcut değil ise; kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR), farmakofor modelleme, moleküler alan analizi, 2D ve 3D benzerlik değerlendirmesi gibi araçları içeren ligand temelli ilaç keşfi araçları kullanılır. Bu araçlar; ilaç hedefleri ve ligandlar arasındaki etkileşimlerin

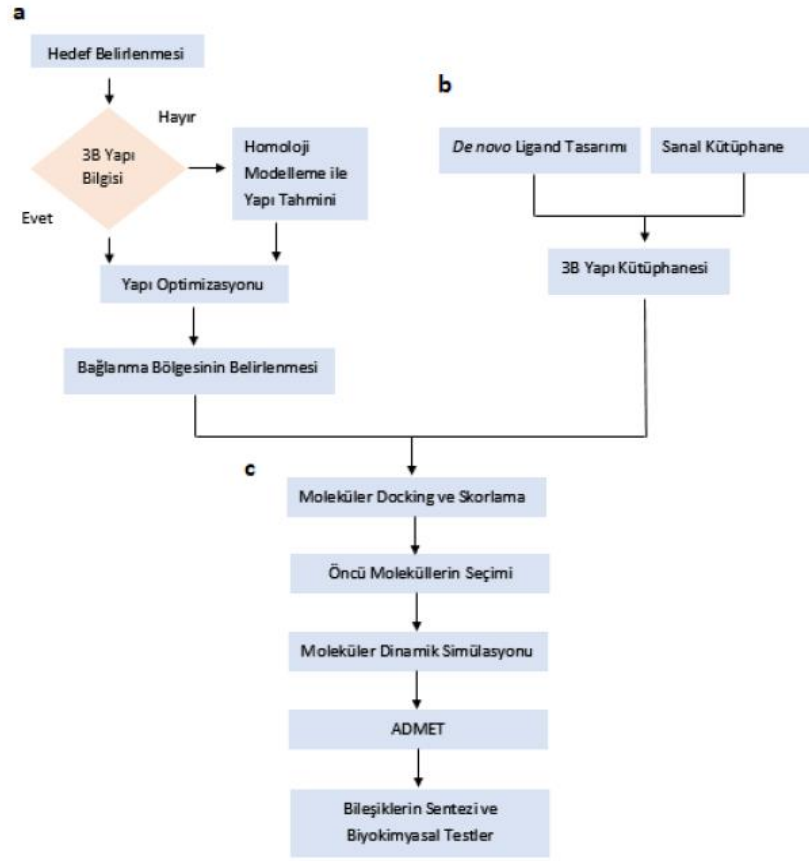
doğasının anlaşılmasında önemli katkıda bulunur. Ligand temelli bu araçlar optimizasyon ve ön ilaç keşfi için uygun olan tahmini modellerin oluşuma imkan tanımaktadır [94]. Tez kapsamında yapılan araştırmada yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımı kullanılmıştır.

Yapıya dayalı ilaç tasarımı, son yıllarda çok sayıda başarılı sonucun elde edildiği, hızlı bir şekilde büyüme gösteren bilgisayar destekli ilaç tasarımının bir alanıdır. İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla genomik ve proteomik alanında yaşanan gelişmeler ve bu gelişmeler sayesinde ulaşılabilen yapısal bilgilerin sayısındaki artış, öncü ilaç adaylarının keşfi için çok sayıda yeni hedef molekülün oluşturulmasına katkı sağlamıştır [95]. Günümüzde yapıya dayalı ilaç tasarımı çoğu endüstriyel ilaç keşfetme programının ayrılmaz bir parçasıdır ve çoğu akademik laboratuvar için ana araştırma konusudur [96].

Biyoinformatik alanında yaşanan hızlı gelişmeler sayesinde yüksek potansiyele sahip ilaç hedefleri hızlı bir şekilde belirlenebilmektedir. Bu hedefler için genler hızlı bir şekilde klonlanabilmekte ve hedef proteinler eksprese edilip saflaştırılabilmektedir. Ayrıca kristalografi alanında yaşanan gelişmeler, yapıların belirlenmesi için gerekli olan zamanı azaltmaktadır [95]. Bu gelişmelerle beraber yapıya dayalı ilaç tasarımı prosesi, optimize edilmiş öncü hedefin faz I klinik denemelere girmeden önce gerçekleşen çok sayıda döngüden oluşur. Yapıya dayalı ilaç tasarımının birinci döngüsünde; klonlama, saflaştırma ve homoloji modelleme, nükleer manyetik rezonans veya X-Ray kristalografik yöntemlerinden birini kullanarak hedef protein veya nükleik asidin yapısının belirlenmesi adımlarını içerir [95]. Bilgisayar algoritmaları kullanılarak, bir veritabanından elde edilen bileşikler veya o bileşiklerin parçaları belirlenen yapının seçili bir bölgesine konumlanır. Bu bileşikler skorlanır ve bu bileşiklerin hedef bölge ile sterik ve elektrostatik etkileşimleri temel alınarak bir sıralama yapılır. En iyi bileşikler biyokimyasal analizler yapılarak test edilir. İkinci döngüde ise; birinci döngüden elde edilen umut vadeden öncü bileşik ile kompleks halinde bulunan hedef molekülün yapısının belirlenmesini içerir. Bu döngüde, *in vitro* olarak en az mikromolar inhibisyona sahip olan bileşiğin üzerindeki olası bölgeler ortaya çıkarılmaktadır [95]. Daha sonra bileşiğin optimizasyonu gerçekleştirilmektedir.

Bu döngülere ek olarak gerçekleşen döngülerde; optimize edilmiş öncünün sentezlenmesi, öncü kompleksi ve öncü bileşiğin ileri optimizasyonlarının yapılmasını içeren yeni hedefin yapısının belirlenmesi basamaklarını içerir. İlaç dizaynı prosesi için gerçekleştirilen çok sayıda döngüden sonra elde edilen optimize edilmiş bileşikler; genellikle hedeflerine karşı belirgin bağlanma ve spesifite gösterirler [95].

Yapıya dayalı ilaç tasarımı, üç boyutlu makromolekül yapının ligand ile tahmin edilen etkileşimlerine dayanarak ligand tasarımının gerçekleştirilmesini ve bu elde edilen tasarımın değerlendirilmesi basamaklarını içerir. Yapıya dayalı ilaç tasarımının ilk adımı; enzim veya reseptör gibi ilaç hedefinin saptanması ve yapı bilgisinin elde edilmesidir [97]. Yapıya dayalı ilaç tasarımının basamaklarını özetleyen akış şeması Şekil 2.8'de sunulmuştur. Yapıya dayalı ilaç tasarımının ana hedefi ilaç olabilme potansiyeline sahip öncü moleküllerin saptanmasıdır [98]. Yapıya dayalı ilaç tasarımı, *de novo* ilaç tasarımı ve sanal tarama metodlarını kapsamaktadır [99]. Ardışık filtre basamaklarından oluşan sanal taramada saptanan ilaç hedef molekülüne karşı potansiyel biyolojik aktivite gösteren bileşikleri kapsayan bir set oluşturulur [100]. *De novo* ilaç tasarımında ise arzu edilen farmolojik özellikleri bünyesinde bulunduran, daha önce sentezi yapılamamış yeni moleküler yapıların baştan sentezlenmesine olanak sağlar [101]. Bu tezde; yukarıda belirtilen yapıya dayalı ilaç tasarımı metodlarından sanal tarama kullanılmış olup, tez kapsamında sanal tarama yöntemine değinilmiştir.



Şekil 2.8 Yapıya dayalı ilaç tasarımının basamakları. A) Hedef yapının belirlenmesi ve bağlanma bölgesinin analiz edilmesi; b) sanal kütüphanenin oluşturulması; c) hedef molekülün bağlanma bölgesi ve bileşiklerin yavaşştırma çalışmaları [98].

Yapıya dayalı ilaç tasarımının ilk basamağı hedefin belirlenmesidir. Günümüzde genom dizileme teknolojisindeki gelişmeler, sistem biyolojisinde ve biyoinformatikte yaşanan ilerlemeler biyolojik hedeflerin belirlenmesine çok önemli katkı sağlamaktadır. Tipik bir yapıya dayalı ilaç tasarımı; hedef yapının belirlenmesini ve validasyonunu içeren adımların gerçekleştirilmesiyle başlar [102]. İlaç tasarımının ilk basamağı olan hedef molekülün saptanması hedefiyle, belirlenen ligand molekülü için bütün olası hedef proteinleri tanımlamak amacıyla web sunucuları oluşturulmuştur [103]. Hedef molekül saptandıktan sonra 3B yapının elde edilmesi ilaç tasarımının ikinci basamağını oluşturmaktadır [15].

Seçilen tüm hedefler için yapısal bilgi genel olarak X-ray kristalografisinden veya nükleer manyetik rezonans yöntemi kullanılarak elde edilir. Deneysel olarak yapısı

belirlenmemiş hedeflerin seçildiği durumlarda, *ab initio* modelleme ve karşılaştırmalı modelleme gibi hesaplamalı yaklaşımlar kullanılarak üç boyutlu yapı tahmin edilebilir. Homoloji modelleme veya karşılaştırmalı modelleme, bilinen homolog protein yapıları temel alınarak bilinmeyen proteinlerin üç boyutlu yapılarını oluşturan hedef yapı tahmini için kullanılan en güvenilir yöntemlerdir (en az %40 benzerlik) [90]. Yüksek kalitede protein yapı tahmini yapabilen çok sayıda program geliştirilmiştir. Çünkü yapıya dayalı ilaç tasarımı yapabilmek için üç boyutlu yapıların kullanılması temel gerekliliktir. Hedef yapı tahmin edildiğinde, yapıya dayalı ilaç tasarımında daha ileri çalışmalar yapabilmek için tahmin edilen yapının sterokimyasal kalitesini onaylamak için validasyon işlemlerinin yapılması gereklidir. Bu kalitenin kontrolü için kullanılan yaygın yöntemlerden biri Ramachandran plot analidir. Bu analiz protein yapılarındaki tüm aminoasitlerin omurga konformasyonel açılarını gösteren bir analizdir [104]. Bu tezde; hedef molekül *A. baumannii* enolaz enzimi olup bu enzimin 3B yapısını belirlemek için homoloji modelleme yöntemi uygulanmıştır.

2.5.1 Homoloji Modelleme

Homoloji modelleme; seçilen proteinin amino asit dizi bilgisinden yararlanılarak o proteinin 3B yapısının tahmin edilmesinde kullanılan hesaplamalı yapı tahmin etme metotlarından biridir. Homoloji modellemenin hesaplamalı yapı tahmin metotları arasında en yüksek doğrulukta sonuç veren metot olduğu düşünülmektedir. Birçok basamaktan oluşan bu yöntem çeşitli araçlar ve internet sunucuları kullanılarak uygulanmaktadır [14]. Elde edilen modelin fonksiyonelliği, oluşturulan 3B protein modelin kalitesine bağlıdır. Homoloji modelleme ilaç keşfetme prosesinde birçok farklı uygulamaya sahip olduğu için, oluşturulacak homoloji modelinin kalitesini maksimum seviyede tutmak oldukça önemlidir. Bu metot kullanılarak oluşturulan proteinlerin 3B yapısı kullanılarak protein etkileşimleri açıklığa kavuşturulmaya başlanmıştır. Bu durum yeni ilaç adaylarını belirlemeye katkıda bulunmaktadır. Homoloji modelleme sayesinde yeni bir ilacın keşfi daha hızlı, daha ekonomik, daha kolay ve daha pratik hale gelmektedir [14].

Günümüzde Protein Veri Bankası (PDB), deneysel olarak belirlenmiş yaklaşık olarak 144,000 proteinin 3B yapı bilgisini içermektedir [105]. Bununla beraber; NCBI (National Center for Biotechnology Information), yaklaşık olarak 106 milyon protein dizisini içeren anote edilmiş 155 milyon dizi bilgisinden oluşmaktadır [106].

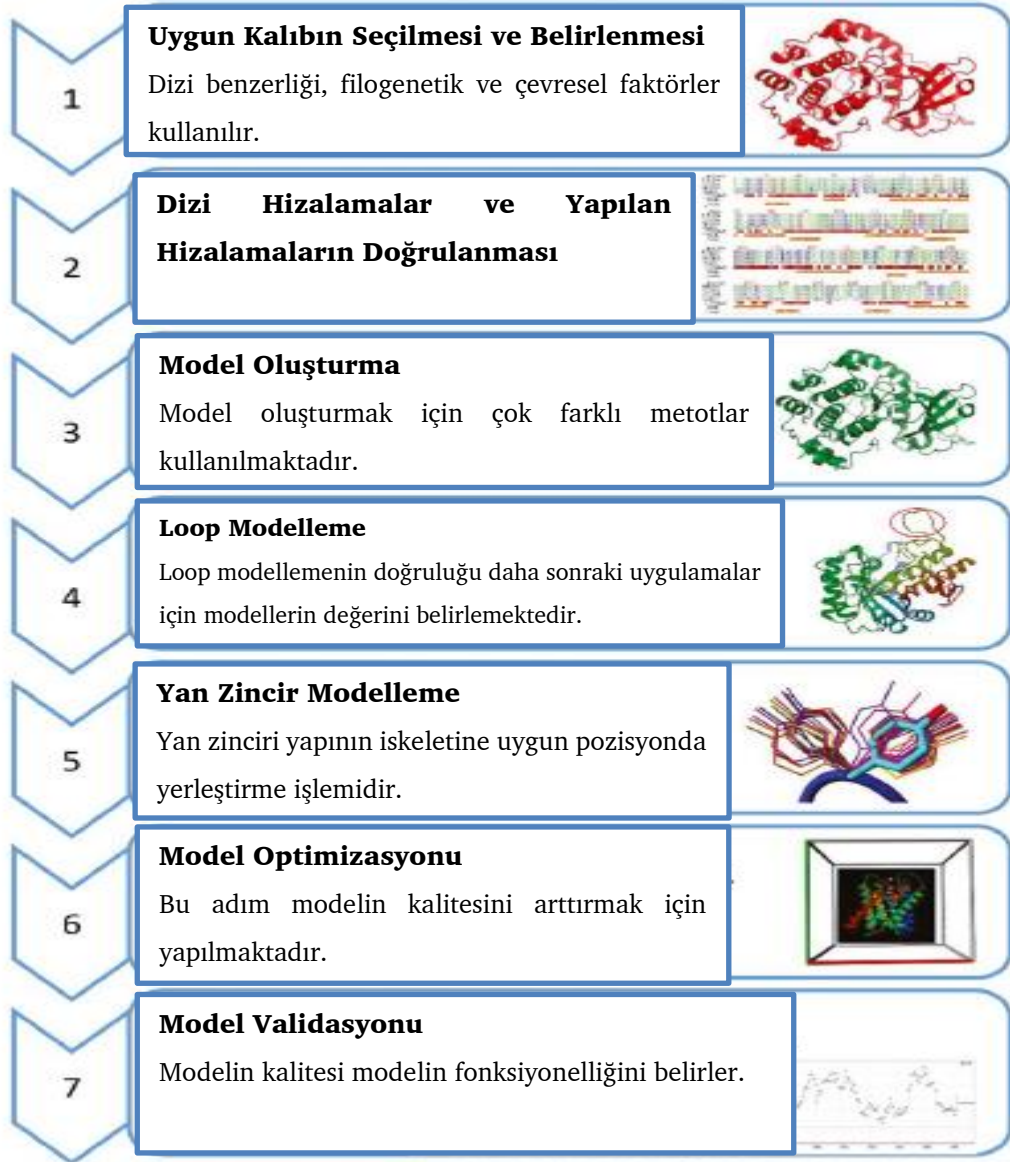
Bu veriler; PDB'teki depolanmış protein dizilerinin sayısının, 3B protein yapılarının sayısına oranla yaklaşık 736 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. 2006 yılında PDB'ta depolanmış, deneysel olarak yapısı çözülmüş 3B protein yapılarının NCBI'da anote edilmiş dizilerin sayısından yaklaşık 120 kat daha az olduğu belirtilmiştir [107]. Bu sayısal veriler; protein dizi sayısının, deneysel olarak yapısı belirlenmiş 3B protein yapılarının sayısına oranla 6 kat daha hızlı arttığını göstermektedir. 3B protein yapıları ile mevcut dizilerin sayısı arasındaki bu artan sayısal fark alarm veren bir durum olarak değerlendirilmektedir. Bu noktada homoloji modelleme gibi hesaplamalı yapısal belirleme metotları bu artan farkı azaltmak için gerekli olan yaklaşımlar olarak ortaya çıkmaktadır [14].

1960 yılında kristal yapısı çözülen ilk protein olan miyoglobinin yapısı aydınlatıldıktan sonra NMR spektroskopisi ve X-ray kristalografisi gibi deneysel metotların geliştirilmesiyle çok sayıda proteinin 3B yapısı çözümlenmiştir [108]. Bununla beraber bu deneysel metotlar her protein için kullanılamamaktadır. Örneğin NMR analizi için, protein küçük olmalı iken X-ray kristalografisinde ise proteinin kristalize olması gerekmektedir. Ayrıca bu metotlar zaman alıcı metotlardır ve bu metotlarda; membran proteinleri gibi kristalizasyonu ve saflaştırılması zor proteinlerin yüksek çözünürlüklü 3B yapılarının tanımlanmasında sorunlar yaşanmaktadır [109].

Membran proteinleri terapötik ilaç hedeflerinin önemli bir bölümünü oluşturduğu için, membran proteinlerinin 3B yapılarının belirlenmesinde yaşanacak ilerlemeler ilaç keşfetme prosesinde hızlı gelişmelerin yaşanmasını sağlayacaktır. Bu noktada hesaplamalı 3B protein yapı tahmini 3B yapıların tahmin edilmesinde çok önemli rol oynamaktadır [14]. Homoloji modelleme veya karşılaştırmalı modelleme; bir proteinin aminoasit dizisinden yararlanılarak bu proteinin 3B yapısını belirlemek için kullanılan hesaplamalı yapı tahmin metotlarından biridir.

Homoloji modellemenin temeli iki ana basamaktan oluşur. Birincisi; proteinin aminoasit dizisi kullanılarak proteinin 3B yapısının belirlenmesidir. İkincisi ise; proteinlerin yapısı daha korunumludur ve evrim süresince nükleotid dizilerine oranla protein yapılarında gözlemlenen değişiklikler daha yavaş gerçekleşmektedir. Sonuç olarak benzer diziler aynı yapılara katlanır ve diziler arasında düşük bir benzerlik olsa bile benzer protein yapılar oluşmaktadır [14].

Homoloji modelleme hesaplamalı yapı tahmin metodları arasında en güvenilir ve doğru sonuçlar veren metot olarak değerlendirilmektedir [108]. *De novo* yapı tahmin metodu gibi hesaplamalı metodlar kullanılarak gerçekleştirilen 3B protein yapı tahmini gibi yaklaşımlar; proteinlerin atomları arasındaki uzaklığı ifade eden sapmanın ortalama karekökü (RMSD) kriterini kullanan homoloji modelleme ile kıyaslandığında; homoloji modellemenin en yüksek doğrulukta 3B yapıları oluşturduğu gözlemlenmiştir [110]. Ayrıca hesaplamalı 3B yapı tahmininde kullanılan metotlar daha az maliyet, daha az zaman ve anlaşılması ile uygulanması açık işlem basamakları gerektirmektedir. Bu özelliklere sahip olan homoloji modelleme yüksek kaliteye sahip 3B protein yapılarının oluşturulmasında sıklıkla kullanılan bir metottur. Bu etkili metot; yapıya dayalı ilaç keşfetme proseslerinde kullanılan sanal görüntüleme ve moleküler yanalştırma metotlarının izlediği yolları da değiştirerek daha kaliteli protein yapılarının oluşturulmasını sağlamaktadır [111]. Homoloji modelleme birçok farklı adımdan oluşan ortak standart prosedürlerden oluşmaktadır. Homoloji modellemenin standart adımları Şekil 2.9'da gösterilmiştir [111].



Şekil 2.9 Homoloji Modellemenin temel basamakları [111] (modifiye edilmiştir).

Uygun kalıbın seçilmesi ve belirlenmesi adımda; Protein Veri Bankası (PDB) veya benzer veritabanlarında kalıp yapının belirlenmesi için hedef proteinin aminoasit dizisi kullanılır [112]. Farklı yaklaşımlarla hedef dizi için uygun kalıpların taranması için çok sayıda web tabanlı araç mevcuttur. Bunlar arasında Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ikili dizi-dizi hizalama imkanı sunan bir araçtır. Bu hizmet NCBI ve UniProt gibi veritabanlarında mevcuttur [14].

Kalıp adayları belirlendikten sonra en iyi yapıların seçilmesi gerekmektedir. Hedef yapıyla ilişkili hedef dizinin dizi benzerlik seviyesi yüksek doğrulukta 3B yapılar

oluşturmak için çok önemlidir. Bununla beraber dizi benzerliği homoloji modelleme ile oluşturulan yapıların doğruluğunu belirleyen tek faktör değildir. Kalıp ve modelin en az %25 ten fazla 3B yapı benzerliği göstermesi gerektiği belirtilmektedir [113].

Yüksek dizi benzerliğinin yanı sıra farklı faktörler de uygun bir kalıbın seçilmesi için göz önünde bulundurulmaktadır. Bu faktörler kalıp ve hedef diziler arasındaki filogenetik benzerlikleri içermektedir. Hedef diziyile aynı veya analog filogenetik ağaca sahip kalıpların seçilmesi yüksek kalite ve doğrulukta 3B yapının oluşturulmasına etki eden faktörlerden biridir [114]. Diğer faktörler ise bağlı ligandın varlığı, pH ve çözücü tipi gibi çevresel faktörlerdir. Doğru hedef bir yapıyı oluştururken en optimize koşulları sağlayan en uygun kalıbı seçmek çok önemlidir. Deneysel yapının çözünürlüğü de uygun kalıbın seçimini yaparken etkili olan bir diğer faktördür. Tüm bu faktörler değerlendirilerek en uygun kalıp seçilmelidir [115].

Dizi hizalamalar ve hizalamaların doğrulanması adımı; En uygun hizalamalar seçildikten sonra, hizalamaların doğrulanması gereklidir. Birden fazla kalıp kullanıldığında hedef-kalıp ve kalıp- kalıp arasında hizalamalar yapılır. Herhangi bir rezidünün hizalanmasındaki hata α karbonun yer değiştirmesine sebep olur ve α -heliks bölümündeki tek bir rezidü boşluğu heliks bölümünde yer alan diğer rezidülerin konumunun değişmesini tetikler. Sonuç olarak homoloji modellemede dizilerin hizalanmasının doğru şekilde yapılması çok önemlidir [116]. En yaygın olarak kullanılan hizalama metotları; CLUSTALW, T-COFFEE, 3DCOFFEE ve MUSCLE'dır [117,118,119,120].

Model Oluşturma basamağında; hedef dizinin kalıpları temel alınarak hedef dizi için 3B modeller oluşturmak amacıyla çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Model oluşturma yaklaşımları; rijit gövde birleştirme metotları, segment eşleştirme metotları ve uzaysal sınırlama (bağ) metotları olarak farklı kategorilerde sınıflandırılabilir [14]. Rijit gövde birleştirme metodunda; protein yapı çekirdek bölgelere, yan zincirlere ve ilmeklere (loop) bölünür. Bu metot; hizalanmış kalıp protein yapılarından seçilmiş rijit gövdelerin bir araya getirilmesiyle proteinin 3B yapısının oluşmasına imkan sağlayan doğal diseksiyona bağlı olan bir yaklaşımdır.

Bu yaklaşım 3D-JIGSAW, BUILDER ve SWISS-MODEL gibi araçlar kullanılarak gerçekleştirilebilir [121,122,123].

Segment eşleştirme metodunda; kalıp yapılardan elde edilen atomik pozisyonların bir kümesi öncü pozisyonlar olarak kullanılır. Segmentleri eşleştirmek için bir veri tabanında bilinen yapılardan segmentlerin seçimi; dizi benzerliği, geometri ve enerji temel alınarak yapılır. Daha sonra tüm atom modeli, öncü yapı kullanılarak oluşturulur [124].

Uzaysal sınırlama (bağ) metodunda ise kalıp yapıdan gelen bağların bir araya getirilmesiyle model oluşturulur. Bu bağlar yapılan hizalama temel alınarak hedef yapıya göre ayarlanır. Bu bağların niteliği; bağ açısı, bağ uzunluğu, dihedral açılar ve Van der Waals kontakt mesafeleri gibi özelliklere dayanan stereokimyasal özellikler tarafından belirlenir. Bu metod MODELLER kullanılarak gerçekleştirilir [125]. Model oluşturmak için kullanılan popüler araçların genel özelliklerinin özeti Tablo 2.2'de verilmiştir [14].

Araştırmacılar dizi benzerliği yüksek olduğunda, farklı paket programlar kullanılarak elde edilen modellerin birbiriyle karşılaştırılabileceğini ve birbirine yakın modeller oluşturulabileceğini rapor ederken eğer dizi benzerliği az ise sonuçlarda farklılıklar gözlemlenebileceğini ve bazı programlarla yapılan modellemenin daha doğru olacağını göstermişlerdir [126]. Modellerin kalitesi; paket programların model oluşturmada ve dizi hizalamadaki performanslarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. MODELLER homoloji modellemede en iyi araçlardan biri olarak değerlendirilmektedir [127]. Bununla beraber her aracın kendine özgü dezavantajları ve avantajları bulunmaktadır. Sonuç olarak her açıdan diğerlerine göre üstün olan sadece tek bir modelleme aracı ya da sunucusu bulunmamaktadır. Amaca yönelik sunucu seçilip model oluşturulmaktadır [14].

Tablo 2.2 Homoloji Model oluşturmak için kullanılan bazı modelleme sunucularının temel özellikleri [14]

Kullanılan Homoloji Araçları Sunucuları	Bazı Modelleme veya	URL Adresleri	Tanım
MODELLER		http://www.salilab.org/modeller/	Uzaysal bağlar metoduyla 3B protein yapısı oluşturmak için kullanılan, ücretsiz olarak erişilebilen, güvenilir sonuçlar veren güçlü bir araçtır [128].
SWISS-MODEL		http://swissmodel.expasy.org/	Proteinin aminoasit dizisi kullanılarak proteinin 3B yapısını oluşturan, kullanışlı bir web arayüzüdür [129].
Molecular Operating Environment (MOE)		https://www.chemcomp.com/MOEMolecular_Operating_Environment.htm	3B yapı tahminine ek olarak ileri loop modellemesi, ileri hizalama metodlarına sahip olan bir araçtır [130].
ICM		https://www.molsoft.com/homology.html	Hızlı model oluşturma, loop tahmini, model validasyonu yapabilen yüksek doğrulukta 3B protein modeller oluşturabilen bir araçtır [131].

Loop Modelleme basamağında; Delesyonlar veya insersiyonlar olarak adlandırılan looplar homolog proteinlerin dizilerinde bulunurlar. Evrim boyunca loopların yapıları korunumlu değildir. Delesyon veya insersiyon olmasa bile kalıpta genellikle farklı loop konformasyonları bulunur. Protein yapının fonksiyonunun spesifikliğı genellikle looplar tarafından belirlenir. Loop modellemenin doğruluğı, daha sonraki uygulamalar için oluşturulan modellerin kalitesini belirleyen önemli bir faktördür. Looplar; heliks yapılarına göre daha yüksek yapısal değişkenlik göstermektedir ve loopların yapılarının belirlenmesi heliks yapılarına göre daha zordur [132]. CONGEN ve ARCHPED gibi internet sunucuları loop modelleme için kullanılabilir [133,134].

Yan zincir modelleme genel olarak yan zincirlerin, iskelet (omurga) koordinatlarına yerleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Pratikte, yan zincir tahmini yüksek seviyelerde dizi benzerliği varken verimli şekilde yapılabilir. Protein yan zincirleri, rotamer olarak adlandırılan düşük enerjili sınırlı sayıda yapıda mevcuttur. Tanımlanmış enerji fonksiyonlarına ve araştırma stratejilerine bağlı olarak, rotamerler tercih edilen protein yapısına ve verilen omurga koordinatlarına uygun olarak seçilir. Yapılan tahminin doğruluğu genellikle hidrofobik çekirdek rezidüleri için yüksek seviyelerdedir fakat yüzeyde suya maruz kalmış rezidüleri için ise düşüktür [135]. RAMP ve SCRWL gibi araçlar yan zincir modelleme için kullanılan araçlardır [136,137].

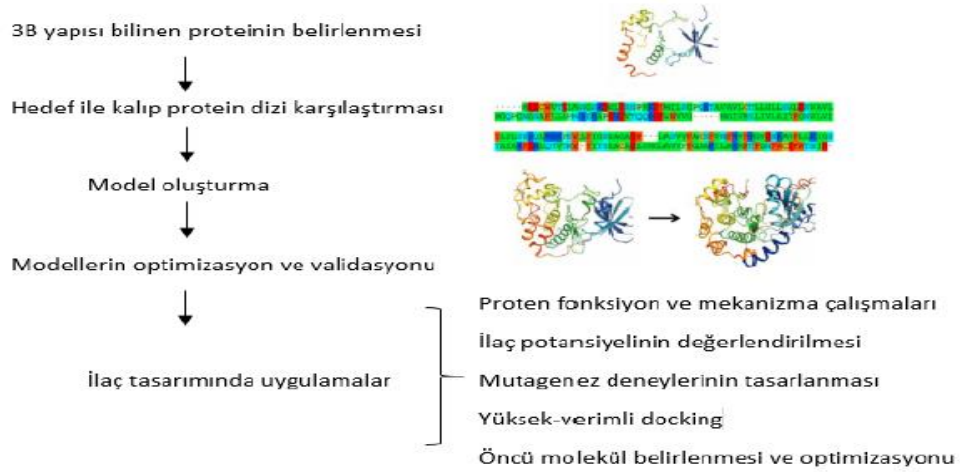
Model Optimizasyonunda; genel olarak modelin optimizasyonu enerji minimizasyonu ile başlar. Enerji minimizasyonu yapılırken moleküler mekanik kuvvet alanlarından yararlanır [138]. Her enerji minimizasyonunda birkaç büyük hata elimine edilir fakat aynı zamanda çok sayıda küçük hata tanıtılır ve bu küçük hatalar birikmeye başlar. Bu yüzden çok sayıda enerji minimizasyonu uygulayarak ve kuantum atom kuvvetleri gibi daha kesin kuvvet alanları kullanarak atom pozisyonlarını sınırlandırmak, model optimizasyonundaki hataların sayısını azaltabilmektedir. Daha ileri model optimizasyonu için Monte Carlo simülasyonları kullanılabilir [139,140] .

Model validasyonu yapılırken oluşturulan modelin doğruluğu bu modelin gelecekte çeşitli alanlardaki uygulamalarını belirleyebilmektedir. Bu noktada modelin validasyonu ve doğrulanması gereklidir. Dizi benzerliğine, çevresel faktörlere ve kalıpların kalitesine göre oluşturulan modelin doğruluğu farklılık göstermektedir. Modelin validasyonu için yapılacak işlemlerden biri modelin stereokimyasının analiz edilmesidir. Dönüş açısı, bükülme açısı ve bağ açısı gibi parametreler belirlenerek bu analiz gerçekleştirilir. WHATCHECK, PROCHECK ve MOLPROBITY homoloji modellemede modelin stereokimyasının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan araçlardan bazılarıdır [141-143].

Ramachandran eğrisi, protein yapısının kalitesini gösteren önemli bir belirleyici faktördür. Stereokimyasal olarak problemlili olan rezidüleri, Ramachandran eğrisinin kabul edilebilir bölgesinin dışına düşecektir [144]. 3B konformasyonlara

ve ortalama kuvvet istatistiksel potansiyellerine dayanan modelin uzaysal özelliklerinin belirlenmesine odaklanan araçlar da bulunmaktadır. VERIFY3D ve PROSAIL bu araçlara örneklerdir [108,145].

Homoloji veya karşılaştırmalı modelleme deneysel çalışmalar sonucunda yapısı tanımlanmış bir proteini, benzer aminoasit dizisinden oluşan farklı bir proteinin yapısını aydınlatmak için kalıp olarak kullanır [100]. Birbirini takip eden 4 farklı adım homoloji modellemenin temelini oluşturmaktadır. Şekil 2.10'da bu basamaklar özetlenmiştir Sırasıyla; kalıp olarak seçilebilecek, 3B yapısı deneysel olarak saptanmış proteinin belirlenmesi, kalıp olarak seçilen protein ile hedef proteinin dizi analizinin yapılması, kalıp proteinin sahip olduğu 3B yapı ve gerçekleştirilen aminoasit dizi analizi temel alınarak hedef protein için uygun modelin oluşturulması ve oluşturulan modelden en iyi modelin elde edilmesi için oluşturulan modelin düzeltilmesi ve validasyonu bu adımları oluşturur [108].



Şekil 2.10 Homoloji modellemenin temel basamakları ve ilaç keşfetme prosesindeki uygulamaları [100].

Homoloji modellemenin ilk aşamasında; çeşitli programlar veya sunucular kullanma yoluyla 3B yapısı tanımlanmamış protein dizisi ile Protein Veri Bankası'nda bulunan yapısı tanımlanmış protein dizisi eşleştirilerek seçilecek kalıp belirlenir [134]. Protein Veri Bankası deneysel olarak 3B yapıları tanımlanmış çok sayıda makromolekülün yapı bilgisine ücretsiz olarak erişim imkanı sunan global bir kaynaktır [92]. BLAST (Basic Local Alignment Search

Tool) kalıp proteini belirlemek için en yaygın kullanılan sunucudur. BLAST kullanılarak veritabanında gerçekleştirilen arama neticesinde, dizi ile eşleşme gösteren yapısı tanımlanmış proteinlerin listesi çıkarılır [134].

Bir sonraki adımda; aminoasit residüleri ile kalıplar arasında 3B yapı benzerliğini belirlemek için PSI-BLAST, Fasta, Multalign ve Spdviewer gibi programlar veya sunuculardan faydalanarak aminoasitler arasında dizi eşleştirmesi yapılır [146]. Yüksek doğruluğa sahip karşılaştırmalı modeller; kalıp proteine hedef proteinin %50'den daha fazla benzerlik gösterdiği modellerdir. Eğer %30-50 arasında bir dizi benzerliği söz konusu ise bu modeller orta seviyede doğruluğa sahip modeller olarak tanımlanırken eğer dizi benzerliği %30'un altında ise modellerin düşük doğruluğa sahip olduğu belirtilir [147].

Bu kabule göre %30 ve daha yüksek dizi benzerliğine sahip kalıp ve hedef protein için model oluşturma adımına geçilebilir. Uygun modelin oluşturulması için genel olarak 4 yöntemden yararlanılabilmektedir. Yapay evölüsyon, katı gövde birleştirme, segment eşleştirme ve boyutsal engellerin tamamlanması bu 4 yöntemi oluşturmaktadır [148,149]. Bütün boyutsal engeller temelli metotlarda ilgili yapı ile eşleştirme yapılırken hedef dizideki mesafe ve dihedral açı engelleri ortadan kaldırılır. Bununla beraber bağ açıları dihedral açılar ve bağ uzunlukları gibi stereokimyasal engelleri içeren kovalent topoloji tarafından engeller tamamlanır ve ortaya çıkan bütün engellerdeki ihtimaller hesaplanarak minimizasyon yapılır. Bu şekilde uygun model hesaplanır [150].

Çeşitli yazılımlar ve sunucular uygun modeli inşa etmek için geliştirilmiştir [151]. MODELLER; uygun modelin oluşturulması için kullanılan 4 yöntemden biri olan boyutsal engellerin tamamlanması metodunu kullanır. Program girdilerini, modeli oluşturulacak proteinin aminoasit dizisini, kalıp olarak seçilen proteinin yapısını ve atomik koordinatlarını kullanan bir komut dosyasıdır [152].

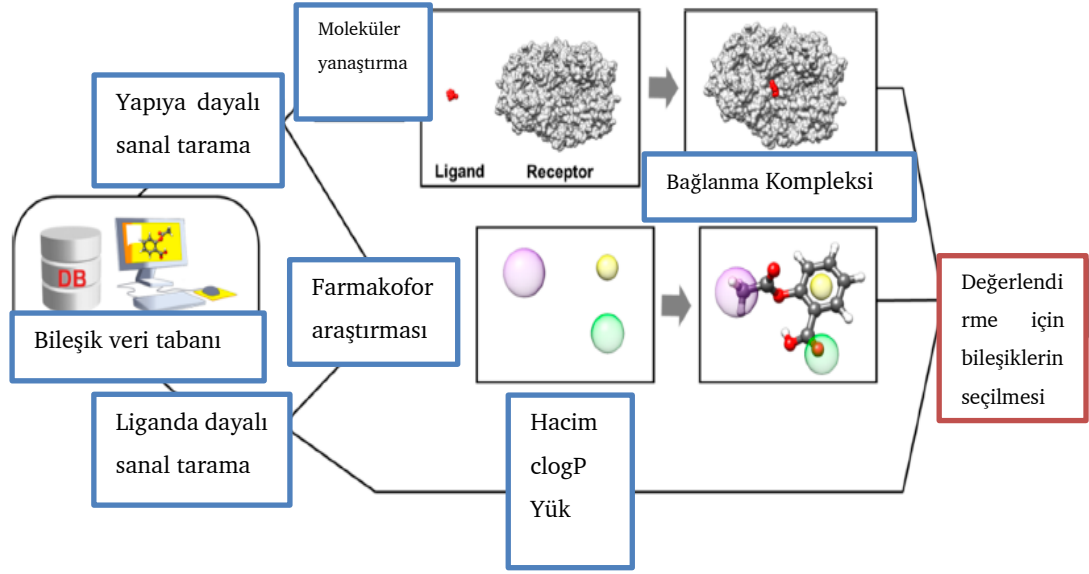
MODELLER; kullanıcı tarafından yapılacak herhangi bir müdahaleye ihtiyaç duymadan, kısa süre içinde hidrojen olmayan atomların tümünü kapsayan bir modeli otomatik bir şekilde oluşturur [148]. Bu tez çalışmasında *A. baumannii*

enolazının homoloji modelinin oluşturulması için MODELLER programı kullanılmıştır. Hedef protein için MODELLER kullanılarak çok sayıda model oluşturulduktan sonra bu modellerin yapısal olarak değerlendirilmesi için SOAP [153] veya DOPE [154] skoru uygulamak yoluyla tüm modeller arasından en iyi model belirlenir. En iyi skora sahip olan modeli deneysel hedef yapısına daha da uygun hale getirmek için, protein yapı optimizasyonu modelin çözünürlüğünü arttırmak için uygulanır. Bu amaç için uygulanan yaklaşımlar fizik-temelli ve bilgi temelli metotlar olmak üzere gruplandırılır. Fizik-temelli metotlarda CHARMM [155] ve AMBER [156] gibi moleküler kuvvet alanları kullanılarak yapının optimizasyonu yapılırken bilgi temelli metotlarda protein veri bankasında yer alan yapısı aydınlatılmış protein yapılarından yararlanarak ve istatistiksel potansiyellerden faydalanılarak yapı optimizasyonu gerçekleştirilir [157].

İnşa edilen modelin doğrulanması yapı optimizasyonu gerçekleştirildikten sonraki son adımdır. Oluşturulan modelin doğrulanması için çok sayıda program veya sunucu mevcuttur [148].

2.5.2 Yüksek Verimde Sanal Tarama ve Moleküler Yanaştırma

Sanal tarama, kimyasal veri tabanlarından umut vadeden bileşikleri seçmek için kullanılan *in silico* metotların bir uygulamasıdır [158]. Yüksek verimde sanal tarama gibi tarama metotları, deneysel biyolojik değerlendirme metotlarının hesaplamalı metotlar açısından karşılığı olarak değerlendirilebilir [159]. İlaç keşfetme prosesinde geniş ve kimyasal olarak çeşitli bileşik kütüphanelerinin, hesaplamalı ve biyolojik tarama yapabilmek amacıyla kullanılması en yaygın stratejilerden biridir [160]. Bu durum, maliyet açısından uygun ve hızlı bir metot olarak sanal taramanın çeşitli bileşik kütüphanelerinin değerlendirilmesi için kullanımını tetiklemiştir. Genel olarak sanal tarama; liganda dayalı veya yapıya dayalı sanal tarama olarak iki gruba ayrılır [161]. Yapıya dayalı ve liganda dayalı sanal taramanın şematik gösterimi Şekil 2.11'de gösterilmiştir [162].



Şekil 2.11 Yapıya dayalı sanal tarama ve liganda dayalı sanal tarama yaklaşımları [162] (modifiye edilmiştir).

Liganda dayalı sanal tarama yaklaşımları; aktif olarak bilinen bileşiklerden elde edilen moleküler tanımlayıcıların keşfedilmesine dayanır [163]. Genellikle moleküler filtreler kullanılarak, bileşik gruplarının karşılıklı özelliklerinin bir seti belirlenir. Bu veritabanı filtreleme metotları deneysel değerlendirme için bileşiklerin seçilmesi için kullanılır. Veri tabanı filtreleme için moleküler tanımlayıcıları doğru şekilde tahmin edebilen çok sayıda ücretsiz erişim sağlanabilecek yazılımlar mevcuttur. Bu programlar; moleküler hacim, protonasyon durumu ve çözünürlük gibi biyolojik aktivite ile ilişkili önemli özelliklerin tahmin edilmesinde kullanılan yararlı programlardır [164].

Molinspiration, OSIRIS Property Explorer, Molsoft ve MoKa bu konuda yaygın kullanılan programlardır [162]. Bir diğer liganda dayalı sanal tarama yaklaşımı ise farmakofor modelleri oluşturmak için bilinen ligandlardan elde edilen yapısal özelliklerin kullanımınıdır [165].

Sanal bileşik veri tabanları farklı filtreleme prosedürleri kullanırlar. Yapıya dayalı sanal tarama yaklaşımlarında; moleküler hedefin 3B yapısı, hedef bağlanma bölgesinin özellikleriyle uyumlu bileşikleri saptamak için kullanılır. Bileşik veri tabanı, önceden seçilmiş hedef bağlanma bölgesine yanaştırılır [99]. Gerçekleşen

bağlanma biçiminin tahmin edilmesiyle beraber, yapıya dayalı sanal tarama sayesinde yavaşıtılan moleküllerin sıralaması yapılır. Bu sıralama; ümit verici bileşiklerin seçilmesi için ana kriter olarak kullanılabilir veya diğer değerlendirme metotları ile birleştirilebilir. Araştırması yapılan moleküler hedef üzerinde seçilen bileşiklerin biyolojik olarak etkilerini belirlemek için bu bileşikler deneysel olarak değerlendirilir [166].

Yapıya dayalı sanal görüntüleme birbirini takip eden adımlardan oluşur. Moleküler hedef hazırlama, bileşik veritabanı seçimi, moleküler yavaşıtma ve moleküler yavaşıtma sonrası yapılan analizler bu adımları oluşturmaktadır [167]. Eğer hedef apo veya holo formda bulunabiliyorsa, bu iki form yapıya dayalı sanal tarama stratejisi içinde düşünülmelidir. Ligandlarla olan etkileşimden kaynaklanan konformasyonel değişiklikler ve yapısal çözünürlük en uygun yapının seçilmesinde dikkate alınması gereken önemli detaylardır [168].

Seçilen yapıyı moleküler yavaşıtma çalışmaları için uygun şekilde hazırlamak için çok sayıda uygun adım seçilen yapıya uygulanır. Uygun yapının hazırlanması çeşitli adımları içerir. Hidrojen atomlarının eklenmesi, önemli etkileşimleri yöneten su molekülleri hariç diğer su moleküllerinin elimine edilmesi, bağlanma bölgesindeki rezidülerin tautomerizasyon durumlarını ve protonasyonunu doğru belirlemek ve kısmi yükleri hesaplamak bu temel adımları oluşturur [169]. Bir diğer önemli adım küçük moleküllerden oluşan bileşik koleksiyonunun hazırlanmasıdır. Bu amaç için çeşitli veri tabanları kullanılmaktadır [170].

Veri tabanında bulunan bileşikler SMART, SMILES ve InChI gibi yazılımlarda satır notasyonları olarak depolanır ve daha sonra 3B moleküler yapıya dönüştürülür [171]. Zinc, PubChem, ChemSpider, ChEMBL, NuBBE DB, ChemBank, DrugBank ve Binding DB sanal taramada yaygın olarak kullanılan kimyasal veri tabanlarıdır [162]. Takip eden diğer adımda, hazır hale getirilmiş veri tabanı hedef bağlanma bölgesine yavaşıtılır. Konformasyonel arama algoritması her bir molekülün enerji durumunu keşfeder ve yüksek skora sahip olan bileşikler potansiyel ligandlar olarak seçilir [167]. Sanal tarama sonucunda milyonlarca bileşik tarandığı için hangi bileşiklere öncelik verilmesi gerektiğine karar vermek amacıyla moleküler yavaşıtma sonrası analizler yapılmaktadır. Bu amaçla tahmin edilen ligand-

reseptör komplekslerinin görselleştirilmesi yaygın kullanılan faydalı bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım; spesifik moleküller arası etkileşimler gibi çok önemli özelliklerin analiz edilmesine imkan tanır [172].

Tahmin edilmiş yapıların görselleştirme yoluyla değerlendirilebilen bir diğer özellik ise farmakofor hipotezleri gibi önceden belirlenmiş faktörlerle elde edilen çözümün eşleşme gösterip göstermediğidir. UCSF Chimera, VMD, Pymol, BALL, RasMol, Jmol, JSmol gibi programlar moleküler yanaştırma sonuçlarının ve yapıya dayalı sanal tarama sonuçlarının grafiksel gösterilmesi için yaygın olarak kullanılan programlardır [162].

Moleküler yanaştırma; uygun hedef bağlanma bölgesinde, küçük moleküllü ligandların konformasyonunu yüksek doğrulukta tahmin edebilme özelliğine sahip, yapıya dayalı ilaç tasarımında sıklıkla kullanılan bir metottur [15]. 1980'lerde ilk algoritmaların geliştirilmesiyle beraber, moleküler yanaştırma metodu ilaç keşfetme prosesinde gerekli bir araç haline gelmiştir [16]. Örneğin; ligand bağlanma şekilleriyle ilgili önemli moleküler olayların araştırılmasında, ligand-reseptör kompleksini stabilize eden moleküller arası etkileşimlerin incelenmesinde yaygın olarak bu metot kullanılmaktadır. Moleküler yanaştırma algoritmaları; ligand-reseptör kompleksinin bağlanma afinitelerini temel alarak moleküler yanaştırması yapılmış bileşikler sıralayarak bağlanma enerjilerinin tahminini kantitatif olarak yapabilmektedir [173].

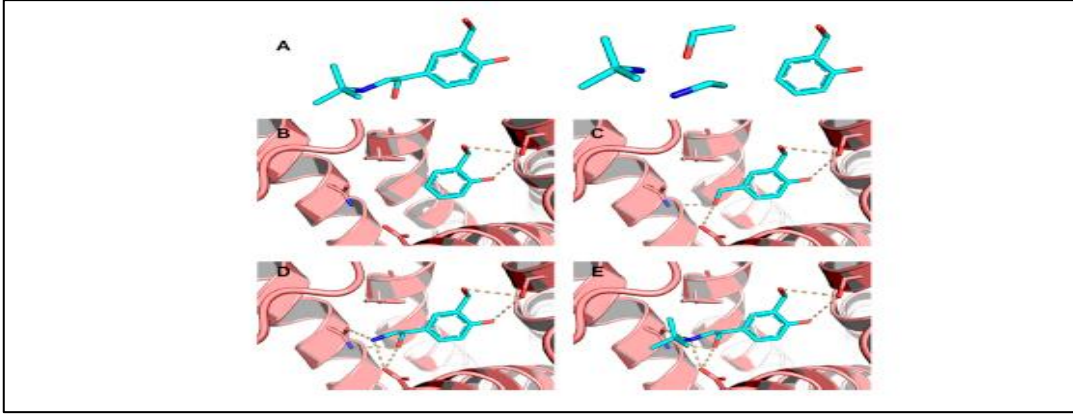
Yüksek olasılıkla bağlanmanın gerçekleştiği konformasyonların belirlenmesi iki adımdan oluşan bir prosestir. Bu iki adım; çeşitli potansiyel bağlanma biçimlerini temsil eden büyük konformasyonel bir boşluğun keşfedilmesi ve tahmin edilen bağlanma konformasyonlarının her biri ile ilişkili etkileşim enerjilerinin doğru tahmin edilmesidir [174]. Moleküler yanaştırma programları bu adımları döngüsel bir proses yoluyla gerçekleştirmektedir. Bu döngüsel proseste; ligand konformasyonları spesifik skorlama fonksiyonları tarafından değerlendirilir. Bu proses bir minimum enerji çözümüne yaklaşıncaya kadar tekrarlı bir şekilde gerçekleştirilir [175].

Konformasyonel araştırma basamağında; burulumsal (dihedral) ve serbest halde bulunmanın rotasyonel ve ötelenme dereceleri gibi ligandların yapısal

parametreleri aşamalı olarak modifiye edilir. Konformasyonel araştırma algoritmaları bu görevi sistematik ve sitotaksik araştırma metotları uygulayarak gerçekleştirir [176]. Sistematik araştırma metotları, yapısal parametrelerdeki küçük değişiklikleri düzenleyerek adım adım ligandların konformasyonunu değiştirir [177]. Bu algoritma konformasyonel boşluğun enerji durumunu inceler ve çok sayıda araştırma ve değerlendirme döngüsünden sonra yüksek olasılıkla uygun bağlanma biçimine denk gelen minimum enerji çözümünü bulur. Bu metot konformasyonel boşluğun keşfedilmesinde etkili olmasına rağmen global minimum enerjinin yerine lokal minimum enerjiyi elde etmeye yaklaşabilmektedir. Bu problem; enerji ortamının farklı noktalarından başlayarak simultane araştırmalar yapılarak çözülebilir [178].

Sitotaksik metotlar ise ligandların yapısal parametrelerini rastgele modifiye ederek konformasyonel araştırma yapar. Bunun için bu algoritma moleküler konformasyonlardan oluşan gruplar oluşturur ve bunları geniş kapsamlı bir enerji ortamına yerleştirir. Bu strateji, lokal minimum bir enerji seviyesinde yanıltıcı son çözümün elde edilmesini önler ve global minimum enerji seviyesinin bulunma olasılığını artırır. Bu algoritma; enerji ortamının geniş bir kapsamını düzenlediği için bu prosedürle ilgili masraflar, bu metodun kullanılması için önemli bir kısıtlamadır [179].

Sistematik ve stotaksik metotlar yaygın olarak kullanılan, kendi problemlerini irdeleyen spesifik yaklaşımlara sahip olan moleküler araştırma metodlarıdır [177]. Örneğin sistematik araştırma metotları yapısal parametrelerin tüm kombinasyonlarını keşfeder. Olası kombinasyonların sayısı üstsel olarak artış gösterir ve bu durum kombinasyonel patlama olarak adlandırılır. FRED, Sulfrex ve DOCK gibi moleküler araştırma metotları kullanılarak bu sorun çözümlenmektedir. Bu programlarda bağlanma bölgesinde ligand aşama aşama oluşturulur. Bu şekilde ligand oluşumu için spesifik bir yapı algoritması kullanılır (Şekil 2.12) [180].



Şekil 2.12 Kademeli yapı oluşturma metodu. (a) ligand (karbon açık mavi ile gösterilmiştir) çok sayıda parçaya bölünür; (b) bağlantı parçası, moleküler hedefin bağlanma bölgesine yanaştırılır (karbon somon renginde gösterilmiştir); (c) sonraki parça bağlantı parçasından sonra yanaştırılır; (d ve e) diğer parçalar bağlanma konformasyonundan tam bir ligand oluşturmak için sıra ile yanaştırılır. aktif bölgedeki rezidüler çubuk şeklinde gösterilmiştir (karbon somon renkte). hidrojen bağları kesik çizgilerle belirtilmiştir [180].

Bu stratejide ilk olarak kimyasal yapı parçalara ayrılır (Şekil 2.12A). Bu parçalardan biri referans parça olarak seçilir ve bu parçanın bağlanma bölgesine komplementer bir bölgeye moleküler yanaştırması yapılır (Şekil 2.12B). Aynı zamanda diğer kalan parçalar sıralı olarak bu bölgeye eklenir (Şekil 2.12C-E). Bu proses tüm ligand oluşturulana kadar devam eder [181].

Genetik algoritmalar, AutoDock ve Gold gibi moleküler yanaştırma programlarında başarıyla kullanılan stotaksik araştırmanın ilgi çeken uygulamalarındandır [182,183].

Prosedürün birinci adımı; bu algoritmanın bir vektör tarafından sunulan bir kromozomda bulunan birincil yapıların tüm yapısal parametrelerini kodlamasıdır. Bu kromozomdan başlayarak, rastgele araştırma algoritması, enerji ortamının geniş bir alanının kaplayan kromozomların ilk popülasyonunu oluşturur. Bu popülasyon değerlendirilir ve en adapte kromozomlar (en düşük enerji değerlerine sahip olanlar) bir sonraki popülasyonun oluşturulması için kalıp olarak seçilirler. Bu prosedür bir popülasyondan diğerine uygun, tercih edilen yapısal özellikleri iletme yoluyla kromozom topluluklarının ortalama enerjisini düşürmektedir. Bu sayede konformasyonel boşluklar keşfedilebilmektedir.

Genetik algoritma rutini tekrarlı bir şekilde uygulanıp, çok sayıda konformasyonel araştırma ve değerlendirme döngüsünün ardından global minimum enerji seviyesine karşılık gelen bir kromozom konformasyonuna yaklaşılmış olur [184].

Herhangi bir konformasyonel araştırma algoritması, çok fazla zaman almadan uygun bir sürede geniş kapsamlı bir enerji ortamı keşfedebilmelidir. Yaygın kullanılan moleküler yanaştırma algoritmaları konformasyonel araştırma metodolojisine göre gruplandırılmıştır. FRED, DOCK, GLIDE, EUDOC, SLIDE gibi konformasyonel araştırma algoritmaları yaygın kullanılan sistematik araştırma algoritmaları iken AutoDock, Gold, MolDock, PLANTS, ICM ise yaygın kullanılan stokastik araştırma algoritmalarıdır [162].

Bağlanma enerjisinin değerlendirilmesi aşamasında; moleküler yanaştırma programları, tahmin edilen ligand-reseptör komplekslerinin bağlanma enerjilerini değerlendirmek amacıyla skorlama fonksiyonlarını kullanırlar. Ligand-reseptör yapısının oluşumundan kaynaklanan enerji farklılığı, bağlanma sabiti (K_d) ve Gibbs Serbest Enerjisi (ΔG_L) ile açıklanır [185].

Bağlanma enerjisinin tahmin edilmesi, entropik etkileri ve moleküller arası etkileşimlerin dahil olduğu ligand-reseptör bağlanmasını içeren fiziksel ve kimyasal etkenlerin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilir. İdeal olarak büyük ligand setleri ile çalışıldığında, verimli skorlama fonksiyonları hız ve doğruluk arasında bir denge kurmalıdır. Skorlama fonksiyonları; kuvvet-alan temelli, ampirik ve bilgi temelli fonksiyonlar olarak kategorize edilir [186].

Kuvvet-alan temelli skorlama fonksiyonları; elektrostatik ve Van der Waals etkileşimleri, dihedral varyasyon, açı bükülmesi ve bağ gerilmesini değerlendirerek bağlanma enerjisini tahmin eder [187]. Bu metodun ana kısıtlaması, entropik katkıların tahmin edilmesindeki başarısızlığıdır. Bu durumu tanımlayabilecek fiziksel bir modelin bulunmayışı bu konuda başarısızlığa neden olmaktadır [188]. Çoğu moleküler yanaştırma programı hedef bağlanma bölgesinde ligandın konformasyonunu doğru bir şekilde tahmin edebilmektedir. Bununla beraber çoğu program ligand-reseptör kompleksinin etkileşim enerjisini kesin bir şekilde oluşturamamaktadır. Örneğin entropik etkilerde yaşanan sorunlar şuan ki moleküler yanaştırma algoritmalarının çözmesi gereken

sorunlardan biri olarak değerlendirilmektedir [189]. DOCK, AutoDock, Goldscore ve ICM kuvvet alanı temelli, GlideScore, ChemScore, LUDI ve Hyde ampirik; DrugScore, SMOG, ve PoseScore ise bilgi temelli skorlama fonksiyonları olup moleküler yanaştırma programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [162].

Moleküler yanaştırmada kovalent bağlar kovalent ilaçların oluşumunda görev alır. Kovalent ilaçlar; kanser ve diyabet gibi çok sayıda terapötik alanda tedavi için uygun alternatifler sunan ilaçlardır. Son dönemdeki raporlar satışa sunulan enzim modülatörlerinin yaklaşık üçte birinin kovalent inhibitörler olduğunu belirtmektedir [190]. Kovalent ligandlar hedeflerini geri dönüşümsüz olarak inaktive ederler ve bunun sonucu olarak inhibe edilen biyolojik fonksiyonun geri kazanılması ancak hedeflenmiş proteinin yeniden sentezlenmesiyle gerçekleşir. Genellikle kovalent inhibitörler kendi moleküler hedeflerine yüksek afinitiyile bağlanırlar ve bu durum uzun süreli farmakolojik cevaplara neden olur [191]. Bunun sonucu olarak küçük molekül inhibitörlerinin kovalent bağlanmasına ilişkin çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Kovalent yanaştırma algoritmaları ligand reseptörüne kovalent olarak bağlandığında ligandın var olan enerji düzeyini keşfetmeyi amaçlar. Aynı zamanda etkileşimin bağlanma enerjettiğini değerlendirir [192]. DOCK, AutoDock ve Gold kovalent bağların modellenmesi için yaygın olarak kullanılan moleküler yanaştırma programlarıdır [162].

Moleküler yanaştırmada yapısal su faktörü çok önemlidir. Kristal su yapıya dayalı ilaç tasarımında ve moleküler yanaştırmadaki temel zorluktur. Bu moleküller kuvvetli bir şekilde reseptöre bağlanırlar ve belirli bir proteinin yapısında çok sayıda kristalografik yapı gözlemlenir [193]. Kristalografik protein-ligand komplekslerinin yaklaşık %65'i ligand reseptör tanınmasında en az bir su molekülü içerir [194]. Genel olarak yapısal su reseptör yapının derin ceplerinde konumlanır ve protein bağlanma bölgesi ve ligand arasındaki çoklu hidrojen bağlarına aracılık eder [195].

Yapıya dayalı ilaç tasarımında ve moleküler yanaştırmada; hedef yapının bir parçası olarak düşünülerek veya tasarlanmış ligandlar yoluyla yapısal su moleküllerinin yerleri değiştirilebilir. Kristalografik su moleküllerinin bağlandıkları bölgeden salınması entropik olarak uygundur. Bununla beraber bu

proses rastgele entalpinin kaybedilmesine neden olur. Bu kaybı telafi etmek için proteinle eşdeğer hidrojen bağlarının oluşturulması yoluyla yer değiştirilmiş suyun etkileşim ağlarını taklit edecek, ligandın spesifik bir parçası dizayn edilir. Alternatif olarak yapısal su molekülü moleküler yanaştırma deneylerine dahil edilebilir. Bu durum ligand ve hedef bağlanma bölgesi arasında yüksek uygunlukta hidrojen bağlanma ağlarının oluşumuna imkan tanır. Bu durumda hangi su moleküllerinin güçlü bir şekilde bağlandığını değerlendirebilecek çeşitli yöntemler mevcuttur [193]. Bu yöntemlerden biri Monte Carlo istatistiksel simülasyonlarını kullanarak enerjide meydana gelen düzensizliği açığa kavuşturabilmektedir. Bu simülasyonlar verilen bir su molekülünün bağlanma serbest enerjisini tahmin ederek yeri değiştirilebilir ve kuvvetli şekilde bağlanmış yapısal su molekülleri arasındaki ayrımın yapılmasına imkan sağlar [196].

Küçük moleküllerin oluşturduğu kütüphaneler kullanılarak öncü ligandların saptanması için sanal tarama alanında en yaygın kullanılan yapıya dayalı ilaç tasarım metodu; çeşitli moleküllerin, hedef olarak belirlenen reseptörün aktif bölgesine yanaştırılmasıdır [197,198]. Moleküler yanaştırma yaklaşımı; kararlı bir yapının oluşumu için ligand afinitesini belirler ve hedef alınan molekül ile ligand arasındaki etkileşimi saptar [199].

Moleküler yanaştırma 3 farklı şekilde gruplandırılabilir. Anahtar ve kilit yanaştırma, esnek yanaştırma ve toplu yanaştırma bu grupları oluşturur. Anahtar ve kilit yanaştırmada; reseptör ve ligand rijit bir yapı oluşturup sıkı bağlanma sergilerler. İndüklenmiş fit yanaştırma olarak da adlandırılan esnek yanaştırmada reseptör ve ligand esnek bir yapıya sahiptir ve ligand reseptörün sahip olduğu aktif bölgeye esnek bir şekilde bağlanma gösterir. Toplu yanaştırmada ise çoklu protein yapılarından ligandın reseptöre yanaştırılması için faydalanılır [200].

Moleküler yanaştırma programları genellikle iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde; ligand ve hedef protein arasında bağlanma gerçekleşebilmesi için uygun konformasyon belirlenir. İkinci bölümde ise serbest bağlanma enerjisi skor fonksiyonu uygulanarak saptanır [201]. GOLD [202], DOCK [203], Surflex [204], GLIDE [205] gibi skor fonksiyonuna ve çeşitli algoritmalara sahip program veya sunucular bu amacı gerçekleştirmek için geliştirilmiştir. Bu tezde esnek

Yanaştırma metodunu kullanan Schrödinger tarafından sunulan GLIDE programından faydalanılarak moleküler yanaştırma temelli sanal tarama yapılmıştır. GLIDE esnek yanaştırma metodundan faydalanmasına karşın reseptörün rijit, ligandın esnek olduğu, yanaştırma sırasında reseptör koordinatlarının değişmediği yöntemi kullanır [205]. Rijit reseptör metodu, ligand yanaştırma prosesinin hızlıca değerlendirilmesine imkan tanıyan bir metottur [206]. Glide reseptörün aktif bölgesinde ligandın bağlanabileceği muhtemel alanları araştırmak için bir dizi filtreden yararlanır [205]. GLIDE sahip olduğu standart hassasiyet modu (SP-standart precision), ekstra hassasiyet modu (XP-extra precision) ve yüksek verimli sanal tarama (HTVs-high-throughput virtual screening) modu ile sanal tarama yapmak amacıyla rasyonel bir iş akışı oluşturur. Yüksek verimli sanal tarama modu sayesinde büyük moleköl kütüphanelerini küçöltmek için bağlanmaya elverişli ligandlar taranır ve bu sayede bir filtreleme yapılır. Bu filtrelemeyi takiben daha verimli ve doğru yanaştırma hesaplamaları yapılabilmesi için standart hassasiyet modu ve ekstra hassasiyet modu kullanılır [100]. Standart hassasiyet modu ligandların sahip olduğu serbest enerjilerden faydalanarak, ligand pozlarını diğer ligandlar ile kıyaslayarak bağlanmaya elverişli olan ligandları saptar [205]. SP skorumla işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra, protein – ligand etkileşimlerinin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesini temel alan XP GlideScore hesaplanır. SP modunda gerçekleştirilen skorumla sonrası en yüksek skora sahip olan ligandlar XP modunda yanaştırma basamağına tabi tutulurlar [207].

3.1. Materyaller

3.1.1 Enzimler, Kitler ve Diğer Materyaller

A. baumannii enolaz geninin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR), Thermo Scientific (ABD) marka Long PCR Enzim Mix, Thermo Scientific (ABD) marka Phusion High Fidelity DNA Polimeraz, Fermentas (Litvanya) marka Phusion High Fidelity ve Sigma-Aldrich (ABD) marka REDTaq DNA Polimeraz enzimi ile beraber her bir enzime özgü tamponlar kullanılmıştır.

A. baumannii enolaz geninin pGEM®-T Easy Vektör sistemine klonlanması işlemi esnasında kullanılan T4 DNA Ligaz enzimi ve bu enzime ait tamponlar Promega (ABD)'dan temin edilmiştir. Enolaz geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu sonrası elde edilen ürünlerin saflaştırılması işleminin gerçekleştirilmesi için kullanılan Wizard SV Gel ve PCR Clean-up sistem Promega (ABD)'dan ve EcoPURE PCR/Gel Purification Kit ECOTECH Biotechnology (Türkiye)'den temin edilmiştir. Plazmid DNA izolasyonu Promega (ABD) tarafından tedariki sağlanan Wizard Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Klonlama vektörü olarak kullanılan pGEM®-T Easy Vektör Sistemi Promega (ABD)'dan tedarik edilmiştir. Protein ekspresyonunun gerçekleştirilmesi için kullanılan pLATE 31 vektör sistemi ve bu vektörün içerisinde bulunduğu aLICator LIC Cloning ve Expression Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi Thermo Scientific (ABD)'ten tedarik edilmiştir. Novel Juice DNA Stainin Reagent GeneDireX (Çin) agaroz jel elektroforezinde yürütülen DNA'yı görüntülemek için kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde DNA'nın baz çifti (bç) uzunluğunu belirlemek için Fermentas (Litvanya) tarafından üretilen O'GeneRuler DNA Ladder Mix

3.1.2 Deneylerin Gerçekleştirilmesinde Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1 Deneyler gerçekleştirilirken kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Su Banyosu	Kerman
Mikrosantrifüj	Sigma
Dikey Elektroforez Sistem	BioRad
UV Visible Spektrofotometre	Shimadzu ve Thermo Scientific
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Termal Döndürücü	Eppendorf
Vorteks	Heidolph
Çalkalamalı İnkübatör	GFL
pH Metre	CyberScan
Ultrasonikasyon	Bandelin
Mikrodalga Fırın	Beko
Etüv	Binder
Yatay Elektroforez Sistem	BioRad ve Peqlab
Bilgisayar	LG
Buz Makinası	Optic Ivymen System
Distile Su Cihazı	GFL
-80 °C Buzdolabı	Heto
+4 °C Buzdolabı	Beko
Otoklav	Systec
Hassas Terazı	Ohaus
Jel Görüntüleme sistemi	Biorad

Tablo 3.1 Deneyler Gerçekleştirilirken Kullanılan Cihazlar ve Markaları (devamı)

Mikropipet seti	Eppendorf
Şarjlı Pipet Ünitesi	Hirschmann
Sonikatör	Bandelin
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
PCR Çalışma Kabini	Esco
-20 °C Buzdolabı	Beko

3.1.3 Besiyerleri ve Çözücüler

Tablo 3.2 Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri

Tripton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Maya Ekstraktı	5 g/l

Tablo 3.2'deki bileşenleri içeren besiyeri otoklav ile sterilizasyon işlemine tabi tutularak hazırlanmıştır.

Tablo 3.3 Luria-Bertani (LB) Agar

Tripton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Maya Ekstraktı	5 g/l
Agar	15 g/l

Bileşenler eklendikten sonra otoklav ile sterilizasyon yapılır.

Nutrient Sıvı Besiyeri

1 litre nutrient sıvı besiyeri hazırlamak için 8 gram nutrient broth tartılır. Üzeri 1 litreye distile su ile tamamlanır (8g/l). Besiyerinin kullanıma hazır hale gelmesi için otoklav ile sterilize edilir.

Nutrient Agar

1 litre nutrient agar hazırlamak için 8 gram nutrient broth ve 28 gram agar tartılır. Tartılan bileşenlerin üzeri 1 litreye distile su ile tamamlanır. Otoklav kullanılarak sterilize edilir.

Tablo 3.4 SOC Medium (25 ml) bileşenleri

Tripton	0,125 g
Maya Ekstraktı	0,5 g
1 M NaCl	0,25 ml
1 M KCl	0,0625 ml
2 M Glikoz	0,25 ml
2 M Mg ⁺² Çözeltisi	0,25 ml

2 M glikoz çözeltisi ve 2 M Mg⁺² çözeltisinin sterilizasyonu filtre kullanımı ile gerçekleştirilir. 1 M NaCl, 1 M KCl, tripton, maya ekstraktı karışımına gerekli miktarda su ilave edilerek 24,5 ml'ye tamamlanır ve pH 7'ye ayarlanır. Sterilizasyon işlemi otoklav kullanılarak yapılır. Otoklav ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra karışımın oda sıcaklığına soğuması beklenir ve karışım oda sıcaklığına ulaştığında 2 M glikoz çözeltisi ve 2 M Mg⁺² çözeltisi uygun miktarlarda karışıma ilave edilerek 25 ml SOC mediyum hazırlanır.

Tablo 3.5 Mavi-Beyaz koloni seçimi için LB Agar (Amp/IPTG/X-Gal) (BSA)

Amfisilin (stok 100 mg/ml)	100 μ l
IPTG (stok 20 mg/ml)	160 μ l
X-Gal (stok 20 mg/ml)	160 μ l

Sterilizasyonu otoklav ile gerçekleştirilmiş olan 100 ml Luria-Bertani agara yukarıda miktarlarıyla belirtilmiş olan kimyasal maddelerin eklenmesiyle mavi seçim agarının hazırlığı tamamlanır ve kullanıma hazır hale gelir.

3.1.4 Tamponlar ve Stok Çözeltiler

Tablo 3.6 CaCl₂ çözeltisi

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

Gerekli bileşenler eklenip 100 ml'ye distile su ile tamamlanan çözeltinin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla 121 °C'de 15 dakika otoklav ile sterilizasyon işlemi uygulanır.

Tablo 3.7 50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tampon çözeltisi (100 ml)

Asetik Asit	5,71 ml
Trizma Base	24,2 g
1 M EDTA (pH 8.0)	50 ml

Her bir malzemenin ilave edilmesiyle hazırlanan karışım distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanır. Çalışma esnasında distile su eklenerek 1 X TAE'ye seyreltme işlemi gerçekleştirilir.

Tablo 3.8 Mg⁺² stok çözeltisi (100 ml)

MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 g

Yukarıda belirtilen kimyasallara distile su ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyon filtre ile yapılır. Daha sonra çözeltinin muhafaza edilmesi için +4 °C'de sabitlenmiş buzdolabına kaldırılır.

Tablo 3.9 EtBr-Agaroz Jel için Örnek Uygulama Tamponu (EtBr-SAB) (10 ml)

Sükroz	4 g
0.5 M EDTA	2 ml
Bromfenol mavisi	4 mg
2 M Tris-HCl	0,5 ml

Amfisilin (100 mg/ml)

Sulandırma işlemi stok amfisilin kullanılarak 1 ml'ye 100 mg olacak şekilde gerçekleştirilir. Hazırlanan karışımın sterilizasyonu filtre ile yapılır.

Kristal Viyole (CV) Stok Solüsyonu

Distile su ilavesiyle 5 mg/ml konsantrasyonda stok çözelti hazırlanır. Stok çözeltinin muhafazası karanlık ortamda tutularak sağlanır. Bir interkalatör olan CV, uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma durumunda organlarda hasara sebep olabileceğinden dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır.

Tablo 3.10 Kristal Viyole Jel için Örnek Uygulama Tamponu (CV-SAB)

Gliserol	500 μ l/ml
1X TAE	500 μ l/ml
Kristal viyole (stok 5 mg/ml)	10 μ l/ml

Yukarıda belirtilen kimyasallarla, belirtilen konsantrasyonlara uyularak hazırlanan tampon karanlık ortamda muhafaza edilir.

IPTG (İzopropil- β -D- tiyogaltopiranosid)

100 mM 1,5 ml stok IPTG hazırlamak için; 35,74 mg IPTG tartılır ve distile su ile 1,5 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

X-GAL (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid)

20 mg/ml stok X-Gal çözeltisi hazırlamak için; 0,02 g X-Gal, 1 ml N,N-dimetilformamid (DMF) içerisinde çözülür ve filtre ile sterilize edilir.

%10 Amonyum Persülfat Çözeltisi

%10 Amonyum Persülfat çözeltisi 30 mg amonyum persülfat üzerine 300 μ l distile su eklenerak hazırlanır.

Tablo 3.11 %30 Akrilamid/Bis Çalışma Çözeltisi (30 ml)

Akrilamid	8,7 g
N, N'-Metilen-Bis-Akrilamid	0,3 g

Tablo 3.12 SDS-PAGE Ayırma Jeli (%12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
%10 SDS	100 µl
%30 Akrilamid/Bis	4 ml
%10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

Tablo 3.13 SDS-PAGE Yükleme Jeli (%4)

dH ₂ O	3,05 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
%10 SDS	50 µl
%30 Akrilamid/Bis	0,65 ml
% 10 Amonyum Persülfat	30 µl
TEMED	6 µl

Tablo 3.14 SDS-PAGE Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB) (10 ml)

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

Tablo 3.15 5X SDS-PAGE Tank Tamponu

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

Hazırlanan 5X SDS-PAGE tank tamponu distile su ile 1X'e seyreltilerek kullanılır.

Tablo 3.16 Protein Boyama Çözeltisi

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

Bileşenlerin ilave edilmesinin ardından 100 ml'ye tamamlanır.

Tablo 3.17 Boya Uzaklaştırıcı Çözelti

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

Boya uzaklaştırıcı çözelti kullanımının ardından aktif karbon ile muamele işlemi uygulanır. Filtre kağıdı veya peçete yardımıyla çözelti süzülerek tekrar kullanılabilir.

3.1.5 Primerler

Acinetobacter baumannii Enolaz (*AbENO*) enzimini kodlayan genin vektörlere klonlanması için 3 farklı primer tasarımı gerçekleştirildi.

AbENO LIC F: 5'-AGAAGGAGATATAACTATGAGCCAAATCG-3'

GC Yüzdesi: %37.93

Tm: 61.8 °C

AbENO LIC R1: 5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTTTAAACCTTTG-3'

GC Yüzdesi: %50

Tm: 71.7 °C

AbENO R2: 5'-GTTTAAACCTTTGAATTCAGC-3'

GC Yüzdesi: %33.33

Tm: 53 °C

Tasarlanan primerler Sentromer DNA Teknolojileri firmasından temin edilmiştir. Sentezlenen primerler polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) ve DNA dizileme sırasında kullanılmıştır. DNA dizileme işlemleri Iontek ve Triogen Biyoteknoloji firmaları tarafından gerçekleştirilmiştir.

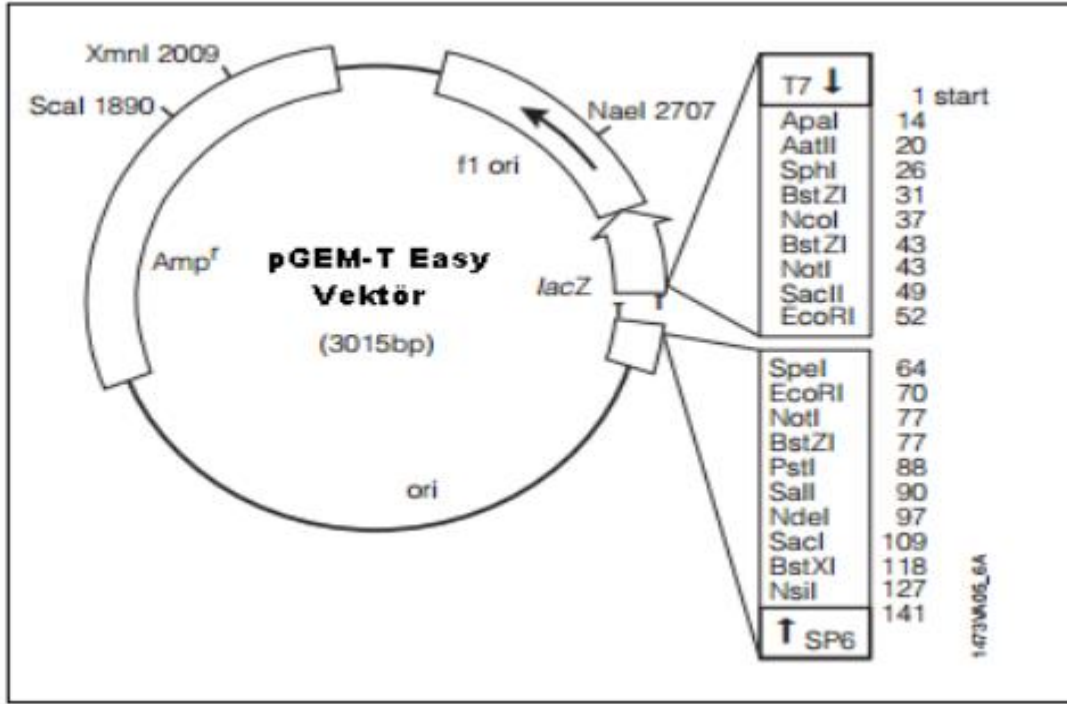
3.1.6 Bakteriyel Suş Temini

Acinetobacter baumannii RSKK 02026 bakteriyel suşu, Refik Saydam Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir.

3.1.7 Klonlama ve Ekspresyon Vektörleri

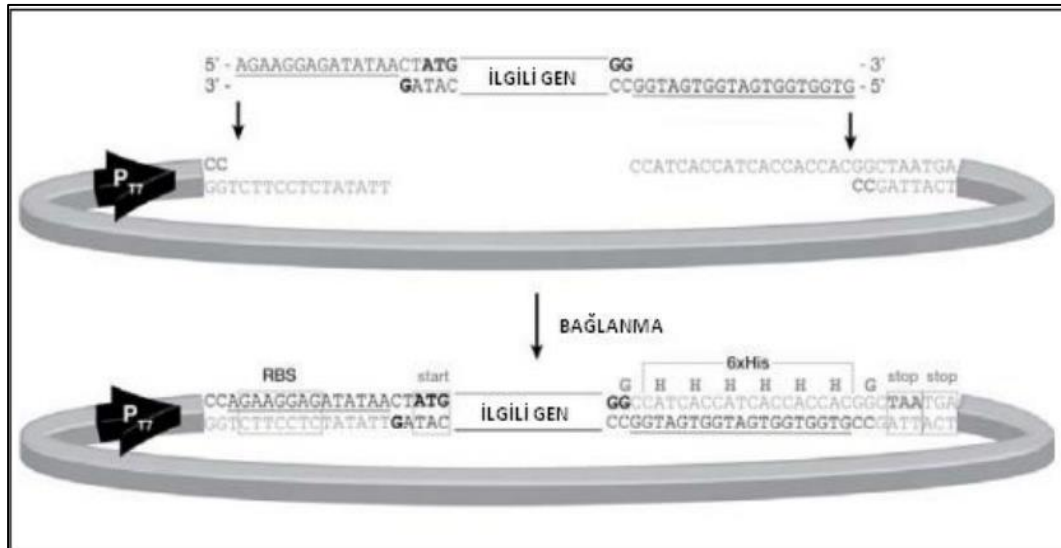
Tez kapsamında pGEM®-T Easy Vektör Sistemi klonlama vektörü olarak, pLATE 31 Vektör sistemi ise ifade vektörü olarak kullanılmıştır.

Lineer bir vektör olan pGEM®-T Easy Vektör Sistemi her iki ucunda da 3' terminal timidin bölgeleri bulundurur. Bu özelliği sayesinde vektörün kendi üzerine kapanabilme olasılığı ortadan kalkmıştır. Bu vektör 3' terminal bölgelerine uyumlu kuyruğa sahip olan genlerin ligasyon etkinliğini arttırmaktadır (Şekil 3.2). Klonlama vektörü olarak kullanılan pGEM®-T Easy Vektör Sistemi, Promega (ABD)'dan sağlanmıştır [208].



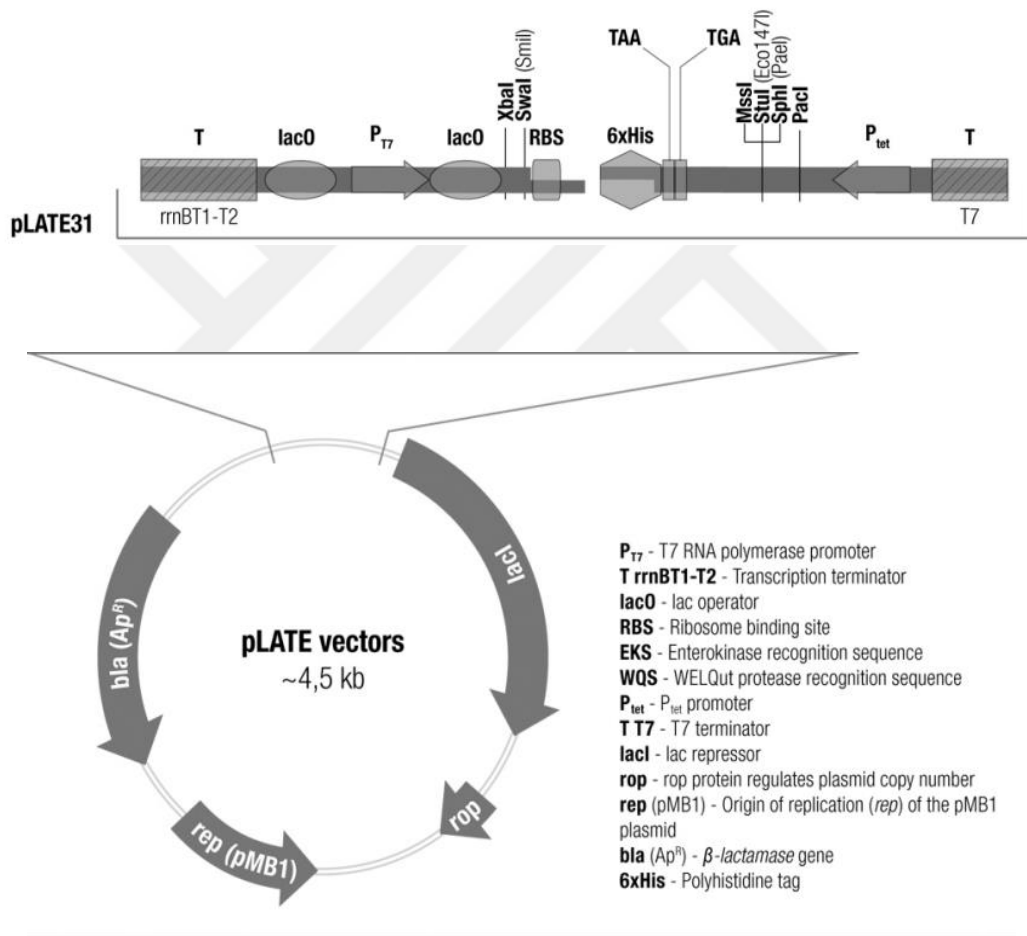
Şekil 3.2 pGEM®-T Easy Vektör Sistemi [208].

pLATE31 ekspresyon vektörünün C- terminal bölgesinde, 6xHis-tag dizisi yer almaktadır. Bu dizi; proteinin saflaştırılması basamağında proteinin kolon ile affinitesinin oluşmasını sağlar. Vektörde bu dizinin yanı sıra T7 promotor bölgesi ve yapışkan uç bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 3.3) [209].



Şekil 3.3 pLATE 31 ekspresyon vektörü [209].

T7 promotor bölgesi IPTG indüklemesi ile transkripsiyonu sağlayan bölgedir. Yapışkan uç bölgeleri ise vektör ile genin verimli ligasyonunu sağlar. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak olan primerlerin tasarımı bu yapışkan uç bölgelerine göre dizayn edilir. pLATE 31 ekspresyon vektörü üzerinde bulunan elementler ve bu vektör üzerindeki konumları Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Bu ifade vektörü Thermo Scientific (ABD)'ten tedarik edilmiştir [209].



Şekil 3.4 pLATE 31 vektör elementleri [209].

3.1.8 *Escherichia coli* Soyları

DH5 α : F- endAI hsdRJ7 (r-, mit) supE44 thi-J ArcAl gyrA96 relAI deoR Δ (lacZYA-argF)- U169 480dlacZAM15

BL21 (DE3): fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS

Bu *E. coli* soyları transformasyon için kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Klonlama Vektörü pGEM®-T Easy Vektör Sistemi'ne *Acinetobacter baumannii* Enolaz Enzimini Kodlayan Genin Klonlanması

Tez kapsamında *A.baumannii* enolaz genini ilgili vektöre klonlamak için yararlanılan tüm metotlar Sambrook, J. ve Russell, D.W. moleküler klonlama laboratuvar metotlarına uygun olarak tasarlanmıştır [210].

3.2.1.1 AbENO Geni için Uygun Primerlerin Tasarlanması

Klonlama vektörüne enolaz enzimini kodlayan genin klonlanabilmesi için ilk olarak bu genin genomik DNA'dan amplifiye edilmesi gerekmektedir. Temin edilen *A. baumannii* RSKK 02026 suşunun nükleotid dizisi National Center for Biotechnology Information (NCBI)'da bulunmamaktadır. Bu noktadan yola çıkılarak *A. baumannii*'nin 2 farklı suşuna (AB030 ve AB0057) ait enolaz genlerinin nükleotid dizisi eşleştirilmiştir [211]. Yapılan eşleştirme (alignment) sonrası bu iki farklı suşun enolaz genlerinin nükleotid dizileri %99 benzerlik içerdiği gözlemlenmiştir. %1'e denk gelen bu nükleotid farklılıkları (3 nükleotid) incelendiğinde, bu farklılıkların genin 5' ve 3' kısmına yakın bölgelerde bulunmadığı ve bu suşlar referans alınarak primer tasarlanmasına bir engel olmadığı gözlemlenip, primerler bu suşların nükleotid dizisi temel alınarak tasarlanmıştır. Primerlerin nükleotid dizileri aşağıdaki gibidir:

AbENO LIC F: 5'-AGAAGGAGATATAACTATGAGCCAAATCG-3'

GC Yüzdesi: %37.93

Tm: 61.8 °C

AbENO R2: 5'-GTTTAAACCTTTGAATTCAGC-3'

GC Yüzdesi: %33.33

Tm: 53 °C

3.2.1.2 Liyofilize Şekilde Temin Edilen *A. baumannii* RSKK 02026 Suşunun Açılması ve Genomik DNA'sının İzolasyonu

A. baumannii RSKK 02026 Suşu Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'ndan liyofilize şekilde temin edilmiştir. Bu şekilde temin edilen suşun açılma işlemi steril koşullar altında kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı tarafından tavsiye edilen suş açma protokolüne uyularak bakteriyel suşun açılması gerçekleştirilmiştir [212].

0.5-1 cc Nutrient Broth ile suş hemen ve 4 saat sonrası Nutrient Agar'a ekilmiştir. 30 °C'de 24-28 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra steril kürdan ile uygun koloniler seçilerek Nutrient sıvı besiyerinde bir gece boyunca gelişimi sağlanmıştır. Son olarak ise *A. baumannii* -80 °C kültür stoku gliserol ve sıvı azot kullanılarak oluşturulmuştur.

A. baumannii genomik DNA'sı kaynatma metodu uygulanarak izole edilmiştir. Bu metotta ilk olarak; *A. baumannii* sıvı kültürü oluşturulmuştur. Oluşturulan sıvı kültürden 100 µl alınarak 13000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantları atıldıktan sonra pelletler 100 µl dH₂O'da çözülmüştür. 10 dk kaynar suda bu örnekler bekletilmiştir. Tekrar 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir ve pipet ile pellete temas edilmeden süpernatant 1.5 mililitrelik yeni bir tüpe alınıp genomik DNA elde edilmiştir.

3.2.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

A. baumannii enolaz geninin amplifikasyonun gerçekleştirmek için yapılan Polimeraz zincir reaksiyonları; Long PCR enzim mix, Thermo Scientific (ABD) marka Phusion High Fidelity DNA Polimeraz ve Fermentas (Litvanya) marka Phusion High Fidelity (*Pfu*) DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.18, Tablo 3.19, Tablo 3.20, Tablo 3.21 ve Tablo 3.22'deki koşullar takip edilerek, 1290 bç büyüklüğündeki gen amplifiye edilmiştir. PCR koşulları şu şekildedir; 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 55 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ile 30 döngü ve 72 °C'de 10 dakika son uzama basamağı olmak üzere PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.18 *AbENO* geninin genomik DNA'dan *Pfu* DNAPolimeraz (Fermentas) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> PCR tamponu +MgSO ₄	5 µl
dNTP karışımı (2mM)	5 µl
5'primer (<i>AbENO</i> LIC F), stok 20 pmol/ µl	2.5 µl
3'primer (<i>AbENO</i> R1 veya <i>AbENO</i> R2) stok 20 pmol/ µl	2.5 µl
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz (2,5 U/µl stoktan)	1 µl
Steril dH ₂ O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

Tablo 3. 19 *AbENO* geninin genomik DNA'dan *Pfu* DNAPolimeraz (Fermentas) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar				
	1. örnek	2. örnek	3. örnek	4. örnek	5. örnek
Steril distile su	32 μ l	31 μ l	30 μ l	29 μ l	28 μ l
10X <i>Pfu</i> Tampon	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
MgSO₄ (25mM)	1 μ l	2 μ l	3 μ l	4 μ l	5 μ l
2 mM dNTP mix	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
5'primer (<i>AbENO</i> LIC F), stok 20 pmol/ μl	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
3'primer (<i>AbENO</i> R2), stok 20 pmol/ μl	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
Kalıp DNA	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l

Tablo 3.20 *AbENO* geninin genomik DNA'dan *Pfu* DNAPolimeraz (Fermentas) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> PCR tamponu + MgSO₄	5 μ l
2mM dNTP karışımı	5 μ l
5'primer (<i>AbENO</i> LIC F), stok 20 pmol/ μl	2.5 μ l
3'primer (<i>AbENO</i> R1 veya <i>AbENO</i> R2) stok 20 pmol/ μl	2.5 μ l
Kalıp DNA	10 μ l
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz (2,5 U/μl stoktan)	1 μ l
Steril dH₂O	24 μ l (Son hacim 50 μ l olacak şekilde)
Toplam hacim	50 μ l

Tablo 3.21 *AbENO* geninin genomik DNA'dan Long PCR Enzim Mix ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X Long PCR tamponu + MgCl₂	5 µl
2 mM dNTP karışımı	5 µl
5'primer (<i>AbENO</i> LIC F), stok 20 pmol/ µl	2.5 µl
3'primer (<i>AbENO</i> R1 veya <i>AbENO</i> R2) stok 20 pmol/ µl	2.5 µl
Kalıp DNA	10 µl
Long PCR Enzyme Mix	1 µl
Steril dH₂O	24 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 3. 22 *AbENO* geninin genomik DNA'dan Phusion High Fidelity DNA Polimeraz (Thermo Scientific) ile amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
5X Phusion GC Tamponu	10 µl
2 mM dNTP karışımı	5 µl
10 µM 5'primer (<i>AbENO</i> LIC F)	2,5 µl
10 µM 3'primer (<i>AbENO</i> R1 veya <i>AbENO</i> R2)	2,5 µl
Kalıp DNA	10 µl
Phusion High Fidelity DNA Polimeraz	0,5 µl
DMSO	1,5 µl
Steril dH₂O	18 µl
Toplam hacim	50 µl

3.2.1.4 Etidyum Bromür ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez işlemi için ilk olarak, hazırlanmış 50X TAE, 1X TAE'ye uygun miktarda distile su kullanımıyla seyreltilmiştir. Daha sonra %1'lik agaroz içeren 1X TAE mikrodalga fırında yaklaşık 5 dakika süreyle kaynatılmıştır. Oda sıcaklığında hazırlanan jelin soğuması beklenmiştir. 5 μ l etidyum bromür, soğuması tamamlanmış jele ilave edilmiştir ve karıştırılarak jel ve etidyum bromürün homojen karışımı sağlanmıştır. Jelin döküleceği jel tepsiyi uygun şekilde hazırlanmış ve taraklar yerleştirilmiştir. Hazırlanan tepsiye jel yavaş bir şekilde dökülmüştür ve jel donana kadar yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Bekleme işleminin ardından tank tamponu olan 1X TAE ilave edilmiş ve taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Daha sonra DNA'nın belirlenmesi için 7 μ l dH₂O, 2 μ l EtBr için sab, 1 μ l DNA karışımı hazırlanarak oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir. 40-60 mA'de yaklaşık 1-1.5 saat elektroforez gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrası jelde oluşan DNA bantları 254-312 nm dalga boyunda ultraviyole transilluminatöründe görüntülenmiştir [210].

3.2.1.5 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Wizard® SV Gel PCR Clean-Up System (Promega) ve EcoPURE PCR/Gel Purification Kit ECOTECH Biotechnology (Türkiye) kullanılarak elde edilen PCR ürünleri saflaştırılmıştır [213,214].

3.2.1.6 AbENO Geninin Klonlanması için Adenin (A) Kuyruğunun Eklenmesi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen AbENO genin 5' ve 3' ucuna protokole uygun adenin kuyruğu eklenmesi AbENO geninin pGEM®-T Easy vektör sistemine aktarılması için gereklidir. pGEM®-T Easy vektör sisteminde yer alan protokole uygun olarak adenin kuyruğu eklenmiştir [208]. Adenin kuyruğu ekleme reaksiyonu şu şekildedir:

Tablo 3. 23 Adenin kuyruğu ekleme reaksiyonu

Bileşen				Miktar
10x Taq DNA Polimeraz	Taq	DNA	Polimeraz	1 μ l
10x Taq DNA Polimeraz Tamponu				
dATP (10 mM)				2 μ l
MgCl₂ (25 mM)				0,8 μ l
PCR Ürünü				5,2 μ l
Taq DNA Polimeraz (stok; 2,5 U/μl)				1 μ l

Yukarıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlanan bileşenler 70 °C'de 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Elde edilen karışım ligasyonda, kit sisteminin prosedürüne uygun şekilde istenilen miktarda kullanılmıştır [208].

3.2.1.7 Ligasyon

pGEM®-T Easy Vektör sistemine Adenin kuyruğu eklenmiş olan enolaz geninin ligasyonu T4 DNA Ligaz enzimi kullanımı ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.24).

Tablo 3.24 Ligasyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar
2 x Rapid Ligasyon Tamponu	5 μ l
pGEM®-T Easy Vektör	1 μ l
T4 DNA Ligaz (3 ünite/ μl)	1 μ l
PCR Ürünü	2 μ l
Steril dH₂O	1 μ l
Toplam	10 μ l

Ligasyon reaksiyonu 4 °C'de 16 saatte yukarıda belirtilen ligasyon bileşenleri ile gerçekleştirilmiştir [215].

3.2.1.8 Kompetant *E. coli* Hücrelerinin Kalsiyum Klorür (CaCl₂) Muamelesi ile Hazırlanması

İlk olarak LB Agar'lı petrilere hazırlanmıştır. Daha sonra -80 °C'deki buzdolabında bulunan stoktan *E. coli* DH5α hücreleri alınarak LB Agar'lı petrilere sürme ekimi gerçekleştirilmiştir. Sürme ekimi gerçekleştirilen petriden tek koloni seçimi steril kürdan yardımıyla yapılmıştır. Seçilen tek koloninin 5 ml'lik LB sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Bu kültürün, çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca 37 °C'de 180 devirde inkübasyonu sağlanmıştır. Daha sonra 50 ml'lik LB sıvı besiyerine elde edilen kültürden 500 µl pipet yardımıyla çekilerek eklenmiştir. UV spektrofotometrede 600 nm'de ölçülen optik yoğunluk (OD) absorbans değeri 0.3-0.4 aralığında bir değer alana kadar 37 °C'de 180 devirde bu kültürün inkübasyonuna devam edilmiştir. 600 nm'de ölçülen optik yoğunluk (OD) absorbans değeri 0.3-0.4 arasında bir değere ulaştıktan sonra bu kültüre 5 dakika 4 °C'de 5000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bu işlemden sonra süpernatant ve pellet elde edilmiş olup süpernatant atılmıştır. 25 ml kalsiyum klorür (CaCl₂) çözeltisinde pelletler çözdürülmüştür. Daha sonrasında 30 dakika hücreler buzda tutulmuştur. Bu işlem sonrasında 5 dakika 4 °C'de 5000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant atılmıştır. 1 ml CaCl₂ çözeltisinde pelletler çözdürülmüştür. Daha sonra hücreler 2 saat süreyle buzda tutulmuştur. Bu işlemler sonucunda kompetan hale getirilen hücreler direkt olarak transformasyonda kullanılmıştır [210].

3.2.1.9 *E. coli* DH5α Hücrelerine Rekombinant Plazmid DNA'nın Transformasyonu

Yapılan ligasyon işlemi sonrası elde edilen örneklere 200 µl kompetan hücre ilave edilmiştir. Bu karışım 30 dakika boyunca buzda tutulmuştur ve 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 90 saniye bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır. Daha sonra 2 dakika buzda tutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin üzerine 800 µl SOC mediyum ilave edilmiştir ve 30 dk 37 °C'de etüvde tutulmuştur. Daha sonra amfisilin ilave edilmiş olan BSA'lı petrilere hazırlanan hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Bir gece süresince 37 °C'de etüvde bekletilmiştir [210]. Bu deney basamakları gerçekleştirildikten sonra koloniler BSA petrilere seçilmiştir.

Koloniler mavi-beyaz koloni seçimi mantığına dayanılarak seçilmiştir. Transforme olmuş hücreler (rekombinant moleküle sahip olan hücreler) BSA petrilerinin içinde bulunan X-Gal bileşeni sayesinde beyaz renkte görülürken, transforme olmamış hücreler mavi renkte görülür. Bu hücrelerden beyaz ve açık mavi renkte olan hücreler seçilmiştir ve ardından DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.1.10 Klonlanan AbENO Geninin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü

Petrilerde görülen beyaz ve açık mavi renkteki koloniler alınıp koloni PCR yapılarak transformasyonun kontrolü yapılmıştır. Öncelikle koloniler seçilerek 5 ml'lik amfisilinli LB sıvı besiyerinde kültürleri yapılmıştır. Bu kültürlerden 100 μ l alınarak 13000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantları atıldıktan sonra 100 μ l dH₂O'da çözülmüştür. 10 dk kaynar suda bu örnekler bekletilmiştir. Tekrar 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir ve hazırlanan örneklerden 10 μ l çekilerek PCR yapılmıştır (Tablo 3.25).

Tablo 3.25 Koloni PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Distile Su	24 μ l
10X Pfu Tampon + MgSO₄	5 μ l
2 mM dNTP mix	5 μ l
5'primer (AbENO LIC F), stok 20 pmol/ μl	2.5 μ l
3'primer (AbENO R2) stok 20 pmol/ μl	2.5 μ l
Kalıp DNA	10 μ l
Pfu DNA Polimeraz	1 μ l
Toplam	50 μ l

Koloni PCR koşulları şu şekildedir; 95 °C'de 5 dk ön denatürasyon, 94 °C'de 1,5 dk denatürasyon basamağı, 55 °C'de 2 dk bağlanma basamağı, 72 °C'de 2 dk uzama basamağı. Bu reaksiyon koşulları 30 döngü olacak şekilde tekrar edilmiştir.

Son olarak 72 °C'de 10 dk son uzama basamağı gerçekleştirilmiştir. Kontrolü yapılan hücrelere gliserol ilavesi ile sıvı azotta dondurma işlemi yapılarak -80 °C stoku hazırlanmıştır.

3.2.1.11 Rekombinant Plazmid DNA İzolasyonu

Koloni PCR sonucu pozitif olan koloni seçilerek kürdan ile alınıp amfisilin içeren 5 ml'lik besiyerinde bir gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. 1,4 ml sıvı bakteri kültürü 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındıktan sonra Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) kiti kullanılarak plazmid DNA izole edilmiştir [216]. Kit ile plazmid DNA izolasyon basamakları şu şekildedir; koloni PCR sonucu agaroz jelde doğru büyüklükte banda sahip olduğu gözlemlenen koloniden ateş başında steril koşullar altında 1.4 ml sıvı kültür, 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne alınır. 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve pellet elde edilir. 250 mikrolitre Cell Resuspension solüsyonu ile pellet tekrar çözülür. 250 mikrolitre Cell Lysis solüsyonu eklenir. Tüp 4 kez ters düz edilerek karıştırılır. 10 mikrolitre Alkaline Protease solüsyonu eklenir. 4 kere ters düz edilerek karıştırılır. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 350 mikrolitre Neutralization solüsyonu eklenir. 4 kere ters düz edilerek karıştırılır. 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilir. Spin kolonu toplama tüpüne yerleştirilir. Elde edilen lizat spin kolonunun içine dökülür. Oda sıcaklığında 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilir. Flowthrough dökülür. Kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirilir. 700 mikrolitre yıkama solüsyonu eklenir. 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilir. Altta kalan flow through atılır ve kolon tekrar toplama tüpüne konur. Aynı adım 250 mikrolitre yıkama solüsyonu eklenerek tekrarlanır. Oda sıcaklığında 2 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilir. Spin kolonu 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılır. 40-50 mikrolitre Nuclease-free water eklenir. 1 dakika oda sıcaklığında 12000 rpm'de santrifüj edilir. Spin kolonu atılır ve plazmid DNA -20 derecede muhafaza edilir [216].

3.2.2 *Acinetobacter baumannii* Enolaz Enzimini Kodlayan Genin pLATE 31 Vektörüne Klonlanması

Thermo Scientific aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi; restriksiyon enzim kesimi ve ligasyon basamaklarından bağımsız, istenilen genin ekspresyon vektörüne hızlı ve etkili şekilde klonlanmasına ve *E. coli*'de gen ekspresyonunun düzenlenmesine imkan sağlayan bir sistemdir [209]. Polimeraz zincir reaksiyonu ile istenilen genin amplifiye edilmesi için kullanılacak olan primerlerin tasarımı, ticari olarak temin edilen kitin kitapçığında önerildiği üzere pLATE 31 ifade vektörüne uygun olacak biçimde tasarlanır [209].

Bu vektöre uygun şekilde tasarlanan primerler yardımıyla PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. Reaksiyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri saflaştırılır. Saflaştırılan PCR ürünleri kitte tavsiye edilen konsantrasyon değerlerine uygun olacak şekilde (reaksiyona girmesi gereken insert DNA miktarı, gen büyüklüğüne göre hesaplama tablosu temel alınarak 1290 bç'lik AbENO saflaştırılmış ürünün konsantrasyonu 65 ng olacak şekilde ayarlanarak) LIC klonlama basamağında kullanılır [209].

T4 DNA polimeraz, LIC sistemi içerisinde kullanılan ve sahip olduğu 5'→3' polimeraz aktivitesi ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi sayesinde pLATE 31 vektörü ve elde edilen PCR ürünlerinin birleşmesine imkan tanıyan yapışkan uçların oluşmasını sağlar. Sistemin önerdiği ligasyon protokolüne göre gen ve vektörün uygun koşullarda birleşmesi sağlanır. Gen ve vektörün birleşmesi sonucu oluşan rekombinant DNA'lar *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edilerek klonlamanın son basamağı gerçekleştirilmiş olur [209].

3.2.2.1 aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) Sistemine Uygun Primerlerin Tasarlanması

Thermo Scientific aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) Sistemi'nde, pLATE 31 vektörüne özel olacak biçimde primer tasarımı açık bir şekilde belirtilmiştir. Primer tasarım çalışması kit sisteminde belirtilen kurallara uyularak gerçekleştirilmiştir [209].

Kit sistemi içerisinde belirtilen 5' primer dizaynı şu şekilde olmalıdır:

5'- AGAAGGAGATATAACTATG– **ilgili gene spesifik dizi** 3'

5' primer (*AbENO F*): 5'AGAAGGAGATATAACTATGAGCCAAATCG 3'

Kit sistemi içerisinde belirtilen 3' primer dizaynı şu şekilde yapılmalıdır:

5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCC– **ilgili gene spesifik dizi** 3'

3' primer (*AbENO R1*): 5' GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTTTAAACCTTTG 3'

3.2.2.2 pGEM®-T Easy Klonlama Vektöründen *Acinetobacter baumannii* Enolaz Geninin Amplifikasyonu

pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü'nden *Acinetobacter baumannii* enolaz geninin amplifikasyonunun gerçekleştirilebilmesi için, *AbENO* genini içeren pGEM®-T Easy vektör sistemine sahip olan uygun *E.coli* suşu -80 °C stoku yapıldığı buzdolabından alınmıştır. PCR'da kalıp DNA olarak kullanılacak DNA'nın elde edileceği hücreler bu rekombinant molekülü içinde barındıran *E. coli* hücreleridir. Bu *E. coli* hücrelerinin amfisilin içeren LB Agar'lı petrilere sürme ekimi gerçekleştirilmiştir.

Vektör sistemi amfisilin direnç geni içerdiği için, bu amfisilin içeren petrilere yaşamlarını sürdürecekler fakat ortamda sürme ekimi yaparken olası gelişebilecek kontaminasyon riski kullanılan amfisilin antibiyotği sayesinde ortadan kaldırılacaktır. Amfisiline direnç geliştirmemiş bakteriler amfisilin içeren LB Agar'lı petrilere elimine olacaktırlar. Sürme ekimi gerçekleştirilen petrilere bir gece boyunca 37 °C'de bekletildikten sonra tek koloni seçimi yapılarak 5 ml olarak hazırlanmış 5 µl amfisilin içeren LB sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Tek koloni ekimi yapılan bu sıvı hücre kültürü, 37 °C'de 180 rpm'de 16 saat süresince (bir gece boyunca) çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen sıvı kültürden 1,4 ml örnek pipet yardımıyla alınmıştır ve 3.2.1.11'deki metot kullanılarak Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma sistemi yardımıyla rekombinant plazmid DNA'lar elde edilmiştir [216].

AbENO geninin PCR ile amplifiye edilmesinde Phusion High Fidelity DNA Polimeraz enzimi kullanılmıştır (Tablo 3.26). Polimeraz zincir reaksiyonu aşağıda verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir: 95 °C'de 5 dk ön denatürasyon, 94 °C'de 1,5 dk denatürasyon basamağı, 55 °C'de 2 dk bağlanma basamağı, 72 °C'de 2 dk uzama basamağı. Bu reaksiyon koşulları 44 döngü olacak şekilde tekrar edilmiştir. Son olarak 72 °C'de 10 dk son uzama basamağı gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.26 AbENO geninin Phusion High Fidelity DNA Polimeraz ile rekombinant plazmid DNA'dan amplifikasyonunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşen	Miktar
Distile su	27 μ l
5X Phusion GC Tamponu	10 μ l
2 mM dNTP mix	5 μ l
5'primer (AbENO LIC F), stok 10 pmol/ μ l	2,5 μ l
3'primer (AbENO LIC R1) stok 10 pmol/ μ l	2,5 μ l
Kalıp DNA (Rekombinant Plazmid DNA)	1 μ l
DMSO	1,5 μ l
Phusion High Fidelity DNA Polimeraz (2U/ μ L)	0,5 μ l

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek *A. baumannii* enolazını kodlayan genin amplifikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir.

3.2.2.3 PCR ürünlerinin Kristal-Viyole (CV) Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması

AbENO geninin Phusion High Fidelity DNA polimeraz ile yapılan amplifikasyonlarından sonra Etidyum Bromür ile boyanmış agaroz jelde yürütüldüğünde, enolaz geninin nükleotid uzunluğunu gösteren bandın yanı sıra istenmeyen bir bandın oluştuğu ve enolaz geninin yanı sıra başka bir nükleotid dizisinin de amplifiye edildiği gözlemlendi. Bunun üzerine kristalviyole (CV) jel elektroforezi işleminin yapılmasına karar verildi ve bu yöntemle saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

CV jel hazırlamak için; öncelikle 50X TAE tamponu 1X TAE tamponuna seyreltilmiştir. Daha sonra 1X TAE tamponuna %1'lik olacak şekilde agaroz ilavesi yapılarak mikrodalga fırında kaynatma işlemi gerçekleştirildi. CV jel elde etmek için, kaynatma sonucu elde edilen karışıma son konsantrasyonu 2 µg/ml olacak şekilde kristal-viyole eklenmiştir. Jel tepsinde kuyucukların düzgün şekilde oluşmasını sağlayan taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanması tamamlanan jel dökülmüştür. Jelin donması tamamlandıktan sonra tanka uygun şekilde yerleştirilmiştir ve taraklar hassas bir şekilde, kuyucukların parçalanmamasına dikkat edilerek çıkarılmıştır. PCR örneklerinin içerisine 2 µl CV için sab ilave edilerek kuyucuklara yükleme işlemi yapılmıştır. Elektroforezde yaklaşık 10 dakika 30 mA'de yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir [15]. Kristalviyole jel beyaz ışık altında görüntülenmiştir. Uygun bant seçilerek neşter yardımıyla dikkatli bir şekilde kesme işlemi uygulanmıştır. Daha sonrasında uygun bir santrifüj tüpüne bu jel parçası koyulmuştur. EcoPURE PCR/Gel Purification Kit kullanılarak DNA örnekleri saflaştırılmıştır [214].

3.2.2.4 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant Plazmid DNA'ların *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu

ALICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sisteminde ligasyon işlemi için belirtilen protokole göre; *AbENO* geninin nükleotid dizisi uzunluğu temel alınarak ligasyonda kullanılacak miktarın hesaplanması gerçekleştirilmiştir [209]. Enolaz geninde 5' ve 3' yapışkan uçlarının oluşmasının

sağlanması için Tablo 3.27’de belirtilen oranlarda reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.27 AbENO gende 5’ ve 3’ yapışkan uçları oluşturmak için gerekli olan reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
5X LIC Tamponu	2 μ l
Saflaştırılmış PCR Ürünü	5 μ l (0,1 pmol)
Nükleaz içermeyen steril distile su	2 μ l
T4 DNA Polimeraz (1u/μl)	1 μ l
Toplam	10 μ l

Yukarıda belirtilen bileşenler ve miktarlar eklendikten sonra santrifüj işlemi 3-5 saniye süresince gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra oda sıcaklığında bekleme süresi 5 dakikayı geçmeyecek şekilde karışım bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra, 1 μ l pLATE 31 vektör (60 ng, 0,02 pmol DNA) ve 0,6 μ l 0,5 M EDTA ilavesi yapılmıştır. Bu işlemden sonra 3-5 saniye santrifüj yapılmıştır. Son deney basamağı olarak ise 2 saati geçmeyecek şekilde oda sıcaklığında bekletme gerçekleştirilerek reaksiyon tamamlanmıştır. Bu işlemler sonucu elde edilen rekombinant plazmid DNA’lar *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon için kompetant *E. coli* BL21(DE3) hücreleri 3.2.1.8’deki protokole göre hazırlanmıştır.

Daha sonra transformasyon aşamasında aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal Histag) sisteminde belirtilen protokole uygun değerlere uygun olacak şekilde hesaplamalar yapılarak transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir [209]. Hücrelerin petrilere ekiminin yapılmasıyla başlayan ve sonrasındaki adımlar 3.2.1.9’de verilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Transformasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen hücrelerin amfisilin içeren LB agar’lı petrilere ekimi yapılmıştır ve daha sonrasında ekimi tamamlanan petrilere 37 °C’de gece boyunca etüvde inkübe edilmiştir.

3.2.2.5 Koloni PCR Metodu ile Klonlanan AbENO Geninin Kontrol Edilmesi

Yapılan transformasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü koloni PCR metodu ile yapılır. Petriler incelendiğinde birbirinden bağımsız, uygun büyüklükte gelişim göstermiş beyaz koloniler seçilip koloni PCR'da kullanılır.

Uygun büyüklük ve şekildeki koloniler steril kürdan yardımıyla düzgün bir şekilde kolonilere temas etmek suretiyle seçilmiştir ve ardından 5 mikrolitre amfisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerinde kültürleri yapılmıştır. Bir gece boyunca 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde gelişimi sağlanan kültürlerden mikropipet yardımıyla 100 µl çekilerek 7 dk 13000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantlar atıldıktan sonra 100 µl distile suda pelletlerin çözünmesi sağlanmıştır. Pelletler çözüldükten sonra bu örnekler 10 dk kaynar suda bekletilmiştir. Bu işlemden sonra 15 dk 13000 rpm'de santrifüj yapılmıştır ve santrifüj sonrası elde edilen örnekten pellete temas etmeden süpernatant uygun bir pipet yardımıyla alınarak steril bir santrifüj tüpüne koyulmuştur. Bu şekilde elde edilen kolonilerin DNA'sından 10 µl çekilerek koloni PCR metodu uygulanmıştır (Tablo 3.28).

Tablo 3.28 Koloni PCR metodunda kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Steril Distile Su	24,5 µl
10X REDTaq Tamponu	5 µl
2 mM dNTP mix	5 µl
5'primer (AbENO LIC F), stok 10 pmol/ µl	2,5 µl
3'primer (AbENO LIC R1) stok 10 pmol/ µl	2,5 µl
Kalıp DNA	10 µl
25 Mm Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	1 µl
REDTaq DNA Polimeraz (1 U/µL)	0,5 µl
Toplam	50 µl

Koloni PCR sonrası oluşan PCR ürünlerinin kontrolü Etidyum Bromür ile boyanmış agaroz jel ile yapılmıştır. Agaroz jelde doğru bant büyüklüğünde olduğu gözlemlenen koloni seçilip gliserol ve sıvı azot yardımıyla -80 °C stoku hazırlanmıştır.

3.2.2.6 DNA Dizi Analizi

3.2.1.11 de belirtilen Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma sistem protokolü, elektroforez sonrası pozitif sonuç veren koloninin sıvı hücre kültürüne uygulanarak rekombinant plazmid DNA'lar elde edilmiştir [216]. Dizi analizi Triogen Biyoteknoloji tarafından T7 universal primeri forward primer olarak ve PQE-FP universal primeri reverse primer olarak kullanılarak çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.7 AbENO Dizisinin Aminoasit Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi

A. baumannii'nin konağı olan *Homo sapiens*'in kas hücrelerinin enolaz aminoasit dizisi ile *Acinetobacter haemolyticus* MTCC 9819, *Acinetobacter indicus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin enolaz aminoasit dizileri NCBI veri tabanından elde edilmiştir [211]. Bu aminoasit dizileri ClustalW programı kullanılarak *A. baumannii* Enolaz aminoasit dizisi ile eşleştirilmiştir [217]. Bu tez kapsamında *AbENO*'nun katalitik rezidüleri *Fusobacterium nucleatum* enolaz enziminin aminoasit dizisi referans alınarak yapılan hizalama neticesinde belirlenmiştir [218].

3.2.2.8 Acinetobacter baumannii Enolaz Enziminin İfade Edilmesi

A. baumannii enolazının ifade edilmesi Cayir vd. tarafından yayımlanan protokol temel alınarak yapılmıştır [219]. *AbENO* genini bulunduran, pLATE 31 ekspresyon vektörünü içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerini ve negatif kontrolü sağlamak amacıyla *AbENO* genine sahip olmayan *E. coli* BL21(DE3) hücreleri -80 °C stokundan alınarak bu iki hücrenin LB agara sürme ekimi gerçekleştirilmiştir. 1 gün sonra 5 ml'lik LB sıvı besiyerine bu hücrelerin kültürü yapılmıştır. *AbENO* genini içeren hücrelerin ekiminde besiyerlerine amfisilin ilave edilmiştir. 2 adet 100 ml LB sıvı besiyeri her iki örnek için kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 100 µl amfisilin hazırlanan besiyerlerinden birine ilave edilmiştir ve 1 ml *AbENO* genini

bulunduran *E. coli* BL21(DE3) hücrelerin ekimi bu besiyerine yapılmıştır. 1 ml *AbENO* genini içermeyen *E. coli* BL21(DE3) hücreleri diğer besiyerine ekilmiştir. 37 °C'de 180 devirde bu iki örneğin inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. 600 nm'de optik yoğunluk (OD) ölçümü UV spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. OD600 değeri 0,5-0,6 arasında bir değere ulaştığında hücreler, uygun konsantrasyona sahip oldukları için IPTG indüklemesine hazır halde bulunmaktadırlar. Bu değerde ölçüm alınmasının ardından örnekler 50 ml'lik olacak şekilde iki erlene bölünmüştür. 50 ml'lik *AbENO* genini bulunduran *E. coli* BL21(DE3) hücre kültürüne ve 50 ml'lik negatif kontrol *E. coli* BL21(DE3) hücre kültürüne, IPTG indüklemesi son konsantrasyonları 0,5 mM olacak şekilde yapılmıştır. İndükleme işlemi yapılmış hücre kültürleri ile indüklenmemiş hücre kültürlerinin aynı zamanda 180 devirde 30 °C'de inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. 3 saat, 5 saat ve gece boyunca bekletmek suretiyle inkübe edilen kültürlerden 3 ml'lik örnekler alınmıştır.

Alınan örneklere 20 dk boyunca 5000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sonunda örneklerden süpernatantlar atılarak uzaklaştırılmıştır ve geriye kalan hücre pelletleri kullanılmıştır. 500'er µl Tris-HCl (pH 7.4) tamponu kullanılarak elde edilen tüm hücre pelletleri çözdürülmüştür. 10 sn sonikasyon 20 sn bekleme olacak şekilde 6 döngülük %20'lik güç kullanılarak hazırlanan pelletlere ultrasonikasyon işlemi uygulanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi uygulanan örnekler 14000 rpm'de 20 dk boyunca 40 °C'de santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrası elde edilen örneklerin pelletleri ve süpernatantları ayrı ayrı hazırlanmıştır [220].

3.2.2.9 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Cell jel elektrofrez sistemi kullanılarak Sodyum Dodesil Sülfat poliakrilamid jel elektrofrez gerçekleştirilmiştir. Ayırma ve yükleme jeli olarak hazırlanan jeller SDS-PAGE'de kullanılan jeli oluşturmaktadır. SDS-PAGE örnek uygulama tamponu hazırlanan örneklere aynı miktarda ilave edilmiştir ve hazırlanan örnekler kaynar suyun buharında 5 dakika bekletilmiştir. Bu örnekler jelde oluşturulan kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir.

Elektroforez tamponu olarak 1X SDS-PAGE tank tamponu kullanılmıştır. Örnekler bromfenol mavisi jelin son kısmına ulaşıncaya kadar 85 voltta yürütülmüştür. Ardından jelin protein boyama çözeltisi içerisinde bir gece boyunca oda sıcaklığında boyanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra, jel üzerindeki protein bantları net bir şekilde gözlemlenene kadar boya uzaklaştırıcı çözelti içerisinde bekletilmiştir. Elde edilen SDS-PAGE jel örnekleri uygun koşullar sağlanarak muhafaza edilmiştir [221].

3.2.2.10 *Acinetobacter baumannii* Enolazının Molar Absorblama Katsayısının ve Molekül Ağırlığının Hesaplanması

Acinetobacter baumannii Enolaz'ının molar absorblama katsayısı ve molekül ağırlığı web tabanlı bir program olan ExpASY ProtParam [222] programına AbENO aminosit dizisinin girilmesiyle hesaplanmıştır.

3.2.2.11 *Acinetobacter baumannii* Enolaz Enziminin Homoloji Modellemesi

Yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımında; 3 boyutlu makromolekül yapının bağlanma bölgesi belirlenir ve sonrasında 3B makromolekülün bağlanma bölgesinin ligand ile öngörülen etkileşimleri esas alınarak ligand tasarımı ve değerlendirilmesi gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle; yapıya dayalı ilaç tasarımının ilk adımını reseptör, enzim gibi ilaç hedeflerinin 3B yapı bilgisinin elde edilmesi oluşturmaktadır [93,95]. Tez çalışması kapsamında homoloji modelleme uygulanarak *Acinetobacter baumannii* Enolaz proteininin açık ve kapalı konformasyonunun 3B yapıları öngörülmüştür. Homoloji modelleme 5 temel basamaktan oluşmaktadır. Uygun kalıbın seçilmesi, dizi eşleştirmesinin yapılması, modelin oluşturulması, yapı düzeltilmesi ve validasyon bu basamakları oluşturmaktadır.

İlk olarak; PSI-BLAST (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool) web sunucusuna AbENO amino asit dizisi yüklenmiştir. PDB (Protein Data Bank)'de bulunan proteinler ile dizi eşleştirme sonucu temel alınarak en yüksek benzerlik oranı gösteren protein kalıp olarak seçilmiştir. Ardından kalıp protein ile AbENO amino asit dizi eşleştirmesi MUSCLE sunucusu kullanılarak gerçekleştirilmiştir [223]. *Acinetobacter baumannii* enolazının açık ve kapalı

konformasyonuna ait protein modellemesi, MODELLER v9.15 programı ve SWISS-MODEL kullanılarak gerçekleştirilmiştir [148,224].

Homoloji modelleme işlemi *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için ayrı ayrı uygulanmış olup 2 tane model MODELLER v9.15 programı kullanılarak, 2 tane model de SWISS-MODEL kullanılarak toplamda 4 model oluşturulmuştur. Bu iki programa temel girdiler, *AbENO* amino asit dizisi ile açık ve kapalı form için seçilen kalıp protein 3B yapılarıdır. MODELLER v9.15 programı kullanılarak *AbENO*'nun açık ve kapalı konformasyonu için ayrı ayrı 100 farklı protein modeli oluşturulmuştur. *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için ayrı ayrı oluşturulan 100 farklı modelden en düşük DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) skoruna sahip olan modeller seçilmiştir. SWISS-MODEL kullanılarak *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için modellerin oluşturulması için ilk olarak *AbENO* aminoasit dizisi programa yüklenmiştir. Daha sonra yüzde benzerlik oranına göre ve *A. baumannii* enolazının konformasyonun açık veya kapalı olması durumu göz önünde bulundurularak kalıp proteinler seçilmiştir. Ardından seçilen kalıplara göre açık konformasyon için 1 model ve kapalı konformasyon için 1 model olacak şekilde 3B protein modeller oluşturulmuştur.

Oluşturulan modellerin validasyonunu gerçekleştirmek için süperimpozisyon çalışmaları yapılmıştır ve RMSD (Root mean square deviation) değerlerini belirlemek için Chimera v1.13.1 programı kullanılmıştır. Chimera v1.13.1 programı kullanılarak 2000 adımda ve AMBER 14SB kuvvet alanı uygulanarak seçilen modelleri deneysel hedef yapısına yakınlaştırmak amacıyla enerji optimizasyonu gerçekleştirilmiştir [225].

Oluşturulan modellerin enerji optimizasyonlarının gerçekleştirilmesinden sonraki adım modellerin validasyonudur. 6 farklı web sunucusu validasyon işlemi gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır. Validasyon için ilk yararlanılan web sunucu ERRAT'tır. Bu sunucu ile atomik etkileşime dayalı oluşturulan 3B protein yapılarının doğru ve yanlış tanımlanmış bölgeleri istatistiksel olarak tanımlanmıştır [226].

ProSa validasyonu gerçekleştirmek için kullanılan ikinci programdır. Bu program oluşturulan model proteinler ile X-ray kristalografisi ve NMR metodları aracılığıyla

3B yapısı saptanan proteinlerin eşleştirilmesine dayanarak elde edilen enerji skoru ile oluşturulmuş konformasyonları değerlendirir [145].

LGscore belirlenerek oluşturulan protein modellerinin kalitesini değerlendiren ProQ ise model validasyonu amacıyla kullanılan bir diğer programdır [227].

Model validasyonu için kullanılan bir diğer program ise RAMPAGE programı olup bu program yardımıyla Ramachadran diagramı oluşturulmuştur [228]. Bu programlara ek olarak oluşturulan protein modellerinin kalitesini belirlemek için VERIFY3D ve QMEAN kullanılmıştır. VERIFY3D protein modellerinin 3B profillerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır [229].

Oluşturulan modelin kalitesinin değerlendirilmesi için kullanılan, geniş kapsamlı skortama fonksiyonu veren bir diğer program ise QMEAN'dir. Oluşturulan protein modellerinin geometrik açılarını skorlayan bu program uygulanarak QMEAN Z-skor elde edilmiştir. Bu skor oluşturulan 3B protein modellerinin X-ray kristalografisi ve NMR metotları aracılığıyla 3B yapısı saptanan kalıp proteinlerine benzerlik derecesini gösteren ölçüdür [230].

3.2.2.12 Moleküler Yanaştırma Temelli Sanal Tarama ile Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi

Moleküler yanaştırma çalışmaları; AbENO açık ve kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL programı yardımıyla oluşturulan modeller kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AbENO açık ve kapalı konformasyon için oluşturulan homoloji modeller; DoGSiteScorer programına yüklenmiştir. DoGSiteScorer; otomatik olarak, hedef protein yapı üzerinde yer alan ilaç bağlanma bölgelerini tespit edebilen bir web sunucudur. Bu program, hedef proteinin potansiyel bağlanma ceplerini belirlemek için fonksiyonellik sağlar. Bu ceplerin fizikokimyasal ve geometrik özelliklerini analiz eder ve bu bölgelerin ilaçlanabilirliğini tahmin eder [231]. DoGSiteScorer prosedürünün ilk aşaması; ilgili proteinin ağır atom koordinatlarına dayanarak bu proteinin yüzeyinde bulunan potansiyel ceplerin tahmin edilmesidir [232]. AbENO açık ve kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan modellerin bu sunucuya yüklenmesi sonucunda hedef protein yapı üzerinde potansiyel ilaç bağlanma bölgeleri ve bu bölgelerin ilaç skorları hesaplanır [231].

Bu tez kapsamında; DoGSiteScorer ilaç skoru verileri dikkate alınarak *AbENO* açık ve kapalı konformasyon için ilaç bağlanabilir iki bölge belirlenerek toplamda 4 farklı moleküler yanaştırma çalışması gerçekleştirilmiştir. *AbENO* açık konformasyon için oluşturulan modelin aktif bölgesi ve bu bölge dışında DoGSiteScorer web sunucunda en yüksek ilaç skoruna sahip bölge moleküler yanaştırma çalışması için seçilmiştir. *AbENO* kapalı konformasyon için oluşturulan modelde ise oluşturulan 3B protein modelin aktif bölgesi seçilmemiştir. Bunun sebebi; kapalı konformasyonda enzimin substratıyla etkileşim halinde bulunmasıdır. DoGSiteScorer programında en yüksek ilaç skoruna sahip bölge ile *AbENO* enzimin aktif bölgesine en yakın olan bölge moleküler yanaştırma çalışmaları için seçilmiştir.

Çeşitli moleküllerin hedef enzim/reseptör aktif bölgesine yanaştırılması, küçük moleküllerin oluşturduğu kütüphanelerden öncü inhibitörlerin saptanması amacıyla sanal taramada en yaygın kullanılan yapıya dayalı ilaç tasarım metodudur [197]. Moleküler yanaştırma, Schrödinger Small - Molecule Drug Discovery yazılımı ile Maestro 2017.1 programı (Schrödinger Release 2017-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) kullanılarak yapılmıştır. Sanal tarama gerçekleştirmek amacıyla biyolojik aktivitesi çeşitli çalışmalarda tespit edilen bioassay aktif 25093 bileşiği içeren ligand kütüphanesi PubChem [233] veri bankasından indirilmiştir. Bu işlemi gerçekleştirmek için Lipinski's Rule of Five [234] uygulanmıştır.

Belirlenen 25093 bioassay aktif bileşik ligand olarak Maestro'ya yüklenmiştir ve ligadlar LigPrep programı (Schrödinger Release 2017-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) kullanılarak hazırlanmıştır. LigPrep programı, ligand preparasyonu yapmak amacıyla kullanılmıştır. Oluşturulan kütüphanede bulunan her bir bileşik için 3B yapı öngörülmüştür. Minimizasyon işlemi ise OPLS3 kuvvet alanı uygulanarak yapılmıştır [235,236]. Glide Receptor Grid Generation programı kullanılarak *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan modellerin ligand bağlanma bölgesi belirlenmiştir [237]. Protein Prep Wizard programı ile protein preparasyonu yapmak amacıyla eksik hidrojen atomlarının

ilave edilmesi ve yapı minimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PROPKA kullanılarak pH 7'de protonasyon durum belirlenmesi yapılmıştır [238].

Ligand ve protein preparasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesinden sonra, ilk olarak AbENO açık formu için oluşturulan modelin hazırlanan kütüphane bileşenleri ile yavaşlaştırılması GLIDE programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [237]. Sanal tarama; GLIDE HTVs (High throughput screening), SP (Standard precision) ile XP (Extra precision) yavaşlaştırma metodolojisi sırayla uygulanarak gerçekleştirilmiştir [205,207]. 25093 yavaşlaştırılmış bileşiklerin en iyi %30'u HTVs ile belirlenmiştir. Bir sonraki adımda SP skorumla fonksiyonuna göre bu bileşiklerin en iyi %20'si seçilmiştir. Son basamakta ise bu bileşiklerin XP skorumla fonksiyonu uygulanarak en iyi %10'u belirlenmiştir. XP GlideScore uygulanarak öncü ligandlar sıralanmıştır Belirlenen ligandlar ile AbENO proteinin açık formu için oluşturulan modelin yavaşlaştırılması yapılmıştır. Aynı işlem basamakları AbENO proteinin kapalı formu için oluşturulan modelin moleküler yavaşlaştırması için de aynı sırayla uygulanmıştır. XP GlideScore skorumla fonksiyonunu hesaplamak için şu formül kullanılmaktadır:

$$\mathbf{XP\ GlideScore} = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bind} + E_{penalty}$$

$$\mathbf{E_{bind}} = E_{hyd_enclosure} + E_{hb_nn_motif} + E_{hb_cc_motif} + E_{PI} + E_{hb_pair} + E_{phobic_pair}$$

$$\mathbf{E_{penalty}} = E_{desolv} + E_{ligand_strain}$$

E_{coul}: Reseptör ve ligand arasında oluşan elektrostatik etkileşimlerin sebep olduğu enerji;

E_{vdW}: Ligand ve reseptör arasında bulunan Van der Waals etkileşimlerden türeyen enerji;

E_{hyd_enclosure} (Hidrofobik muhafaza): Lipofilik ligand atomlarını puanlar. Puanlama; bir ligand atomu ile komşu lipofilik protein atomu arasındaki mesafe temel alınarak yapılır.

E_{hb_nn_motif} (Nötr-nötr hidrojen-bağ motifleri): nötr-nötr hidrojen bağlama motiflerini temsil eder.

Ehb_cc_motif (Yüklü-yüklü hidrojen bağ motifleri): Hem ampirik hem de teorik hususlar esas alınarak yüklü-yüklü hidrojen bağlama motiflerini temsil eder.

EPI: pi-kasyon ve pi istifleme etkileşimlerini ifade eden terimdir. Hidrofobik bölgelere konumlandırılan halojen atomlarını ifade eder.

Ehb_pair: çift hidrojen bağının oluşturduğu enerjiyi ifade eder.

Ephobic_pair: hidrofobik etkileşimler sebebiyle oluşan enerjiyi gösterir.

Eligand_strain: Proteinin, ligandın veya her ikisinin gerilme enerjisini ifade eder.

Edesolv: Protein ve ligandta entropi kaybını ve ligand veya proteinin çözültiden uzaklaştırılmasını temsil eden ifadedir.

Epenalty: Bağlanmaya karşı gelen en önemli fiziksel etkileri gösterir. Eligand_strain ve Edesolv etkenlerini kapsayan bu engelleri penalize etmek amacıyla geliştirilen terimdir.

Prime programı ile MM-GBSA (Moleküler Mekanik / Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı) metodolojisi [239] kullanılarak, belirlenen ligandların serbest bağlanma enerjileri şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\Delta G = E_{\text{Kompleks}} - (E_{\text{ligand}} + E_{\text{reseptör}})$$

ΔG : Sahip olunan toplam serbest bağlanma enerjisini ifade eder.

E_Kompleks: Ligand ile proteinin oluşturduğu kompleks yapının serbest bağlanma enerjisini gösterir.

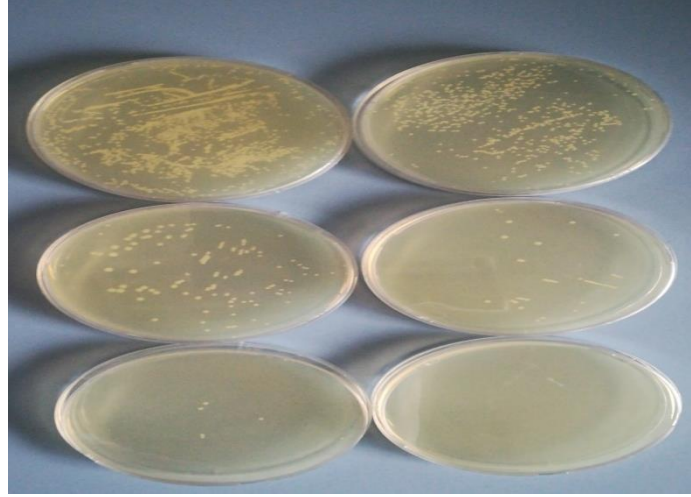
E_ligand: Ligandın sahip olduğu serbest bağlanma enerjisini temsil eder.

E_reseptör: Reseptörün sahip olduğu serbest bağlanma enerjisidir.

4.1 Sonuçlar

4.1.1 *Acinetobacter baumannii* RSKK 02026 Suşunun Açılması

A. baumannii RSKK 02026 suşu Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'ndan liyofilize şekilde temin edilmiştir. Bu şekilde temin edilen suşun açılma işlemi steril koşullar altında kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı tarafından tavsiye edilen suş açma protokolüne uyularak bakteriyel suşun canlandırılması gerçekleştirilmiştir. 0.5-1 cc Nutrient Broth ile suş hemen ve 4 saat sonrası Nutrient Agar'a ekilmiştir. 30 °C'de 24-28 saat inkübe edilmiştir [212]. Liyofilize suşun açılması sonrası Nutrient Agar petriplerde gelişim gösteren koloniler Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Nutrient Agar üzerinde liyofilize *Acinetobacter baumannii* RSKK 02026 suşunun açılması sonucu gelişen kolonilerin petri görüntüsü.

Daha sonra steril kürdan ile uygun koloniler seçilerek Nutrient sıvı besiyerinde bir gece gelişimi sağlanmıştır ve son olarak *Acinetobacter baumannii* -80 °C kültür stoku gliserol ve sıvı azot kullanılarak oluşturulmuştur.

4.1.2 *Acinetobacter baumannii* Enolaz Enzimini Kodlayan Genin pGEM®-T Easy Vektör Sistemine Klonlanması

4.1.2.1 *Acinetobacter baumannii* Enolaz Geninin Amplifikasyonu için Uygun Primerlerin Dizayn Edilmesi

Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen *A. baumannii* RSKK 02026 suşuna ait enolazın nükleotid dizisinin ilk aşamada bilinmemesinden dolayı amplifikasyonun doğru bir şekilde sağlanması amacıyla uygun primerlerin dizayn edilmesi için NCBI'dan dizileri [211] belirlenen *A. baumannii*'nin iki alt türünün enolaz dizileri eşleştirilmiştir. *A. baumannii* strain AB0057 ve *A. baumannii* strain AB030 türlerinin enolaz dizileri alınarak Clustal Omega programı yardımıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilen eşleştirme gerçekleştirilmiştir [217] .

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
AB0057/1-1290   ATGAGCCAAATCGTTGACATTCGTGCACGTGAAATTTGGACTCTCGTGGTAACCCAACC 60
AB030/1-1290   ATGAGCCAAATCGTTGACATTCGTGCACGTGAAATTTGGACTCTCGTGGTAACCCAACC 60
*****
```

Şekil 4.2 *A. baumannii* iki alt türünün enolazı kodlayan gen dizilerinin eşleştirmesi sonucundaki 5' ucu nükleotid dizisi.

```
AB0057/1-1290   CGTGTTTCTAAATATAACCAATTGCTTCGTATTGAAGAGTTAACTAAAGCGGTTTACCGC 1260
AB030/1-1290   CGTGTTTCTAAATATAACCAATTGCTTCGTATTGAAGAGTTAACTAAAGCGGTTTACCGC 1260
*****

AB0057/1-1290   GGTAAAGCTGAATTCAAAGGTTTAACTAA 1290
AB030/1-1290   GGTAAAGCTGAATTCAAAGGTTTAACTAA 1290
*****
```

Şekil 4.3 *A. baumannii* iki alt türünün enolazı kodlayan gen dizilerinin eşleştirmesi sonucundaki 3' ucu nükleotid dizisi.

Eşleştirme sonucuna göre 5' ucunda bütün nükleotidlerin aynı olduğu görülmüştür ve aynı diziler temel alınarak 5' primeri tasarlanmıştır. Buna benzer olarak 3' ucunda yer alan bütün nükleotidlerinde aynı olduğu gözlemlenmiştir. Aynı diziler temel alınarak 3' primeri dizayn edilmiştir.

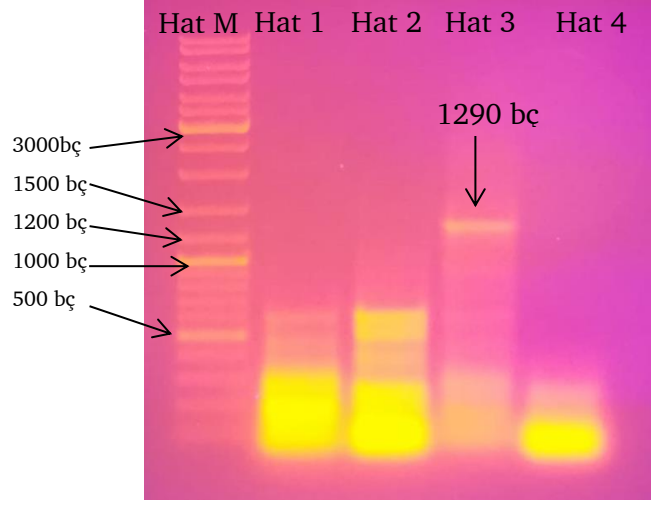
5' primeri (AbENO F): 5'-AGAAGGAGATATAACTATGAGCCAAATCG-3'

3' primeri (AbENO R2): 5'-GTTTAAACCTTTGAATTCAGC-3'

4.1.2.2 AbENO Geninin Amplifikasyonu ve *E. coli DH5α* Hücrelerine Transformasyonu

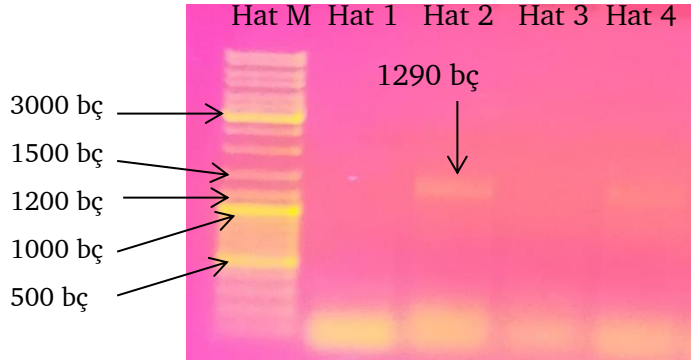
A. baumannii genomik DNA'sından enolaz geninin amplifikasyonu, tasarlanan primerler yardımıyla 3 farklı DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 5'→3' polimeraz ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi bulunan, yüksek verimlilikte amplifikasyon yeteneğine sahip termostabil bir enzim olan *Pfu* DNA Polimeraz (Fermentas), Phusion High Fidelity DNA polimeraz (Termo Scientific) ve Long PCR Enzim Mix (Thermo Scientific, #K0181, ABD) enolaz genini amplifiye etmek için kullanılmıştır. Doğru amplifikasyonun gerçekleştirilmesi için çok sayıda PCR reaksiyonu ve optimizasyonlar yapılmıştır.

İlk olarak Tablo 3.18'deki reaksiyon koşulları takip edilerek 4 reaksiyon PCR yapılmıştır. Gerçekleştirilen PCR sonrası elde edilen PCR örneklerinin 5 mikrolitresi, 3 mikrolitre sab ve 2 mikrolitre distile su ilavesiyle toplam 10 mikrolitre olacak şekilde etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmiştir. Şekil 4.4'teki agaroz jel elektroforezi görüntüsü incelendiğinde *Pfu* DNA Polimeraz enziminin sadece hat 3'de AbENO geninin doğru büyüklükte amplifikasyonunu gerçekleştirmiş olduğu gözlenmiş fakat PCR ürününün konsantrasyonu çok düşük olduğu için verimli bir PCR yapılamadığına karar verilmiştir.



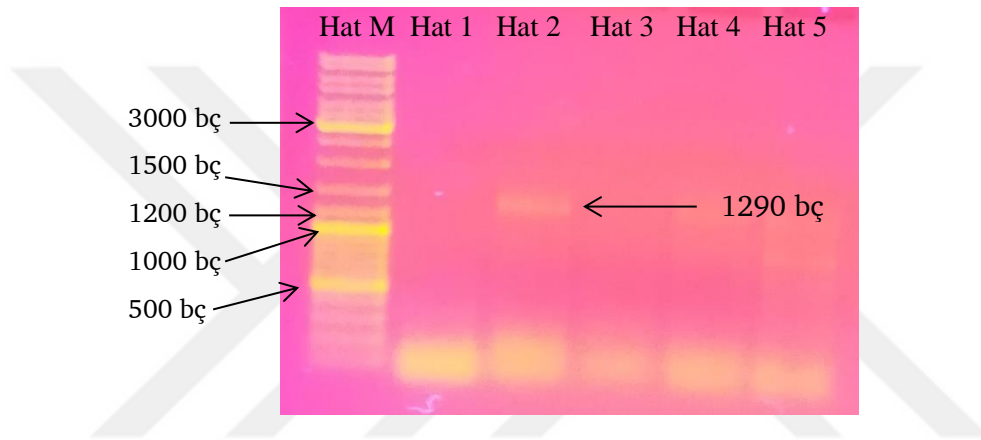
Şekil 4.4 *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: Pfu DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri.

AbENO geninin PCR ile amplifikasyonu, *Pfu* DNA Polimeraz enzimi kullanılarak Tablo 3.18’de belirtilen reaksiyon koşulları tekrar edilerek 44 döngü olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5’ de amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü incelendiğinde verimli bir PCR gerçekleştirilemediği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5 *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: Pfu DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri.

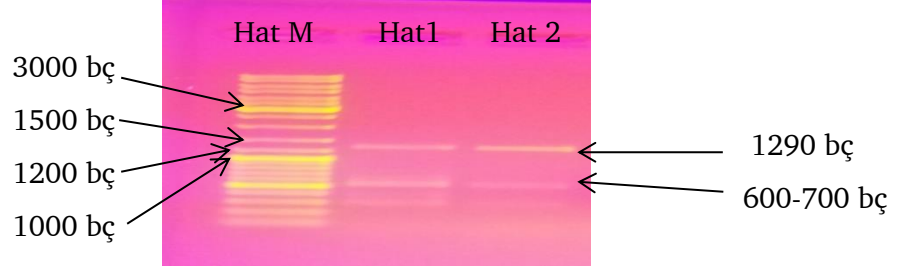
A. baumannii enolaz geninin uygun konsantrasyon ve doğru uzunlukta amplifikasyonunun gerçekleştirilememesi üzerine Tablo 3.18’de belirtilen reaksiyon bileşenleri ve miktarlarında optimizasyon yapılmıştır. Optimize edilmiş reaksiyon koşulları Tablo 3.19’da gösterilmiştir. Bu reaksiyon koşullarına uyularak 5 reaksiyon, 44 döngü olarak PCR gerçekleştirilmiştir. PCR sonucu elde edilen ürünlerin etidyum bromürle boyanmış agaroz jel görüntüsü Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Jel görüntüsü değerlendirildiğinde verimli bir PCR gerçekleşmediği anlaşılmıştır.



Şekil 4.6 *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-5: Farklı $MgSO_4$ konsantrasyonlarında, *Pfu* DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünleri.

AbENO geninin *Pfu* DNA Polimeraz ile amplifikasyonunun verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi için Tablo 3.20’de verilen koşullarda tekrar PCR gerçekleştirilmiştir.

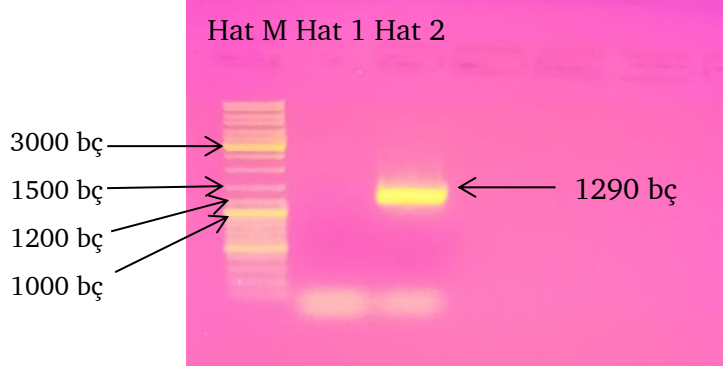
Bu koşullara uyularak gerçekleştirilen PCR sonrası elde edilen ürünlerin 5 mikrolitresi etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez sonucu Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Oluşan jel görüntüsü incelendiğinde *AbENO* geninin doğru büyüklükte amplifikasyonunun gerçekleştirildiği fakat ekstra bandların varlığı gözlemlenmiştir. PCR ürünlerini saflaştırmak için Wizard SV Gel ve PCR Clean-up sistem Promega (ABD) kullanılmıştır fakat saflaştırma sonrası örnekler kaybedilmiştir.



Şekil 4.7 *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-2: *Pfu* DNA Polimeraz kullanılarak yapılan PCR ürünü

AbENO geninin verimli bir şekilde amplifikasyonu için, *Pfu* DNA Polimeraz ve Long PCR Enzim Mix (Thermo Scientific, #K0181, ABD) kullanılarak PCR 44 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. *Pfu* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 3.20'de verilmiştir. Long PCR Enzim Mix ile gerçekleştirilen reaksiyon koşulları Tablo 3.21'de belirtildiği gibi PCR reaksiyonunda kullanılmıştır.

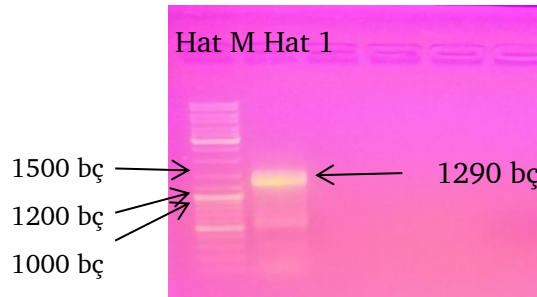
Gerçekleştirilen PCR sonrası elde edilen ürünlerin tamamı (50 mikrolitresi) 5 mikrolitre sab ilavesi ile etidyum bromürle boyanmış jele yüklenmiştir. Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.8'de sunulmuştur. Elektroforez sonrası agaroz jel görüntüsü değerlendirildiğinde Long PCR Enzim Mix'in *AbENO* geninin doğru büyüklükte amplifikasyonunu gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8 *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin 50 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: *Pfu* DNA Polimeraz kullanılarak elde edilen PCR ürünü, Hat 2: Long PCR Enzim Mix kullanılarak amplifiye edilen PCR ürünü.

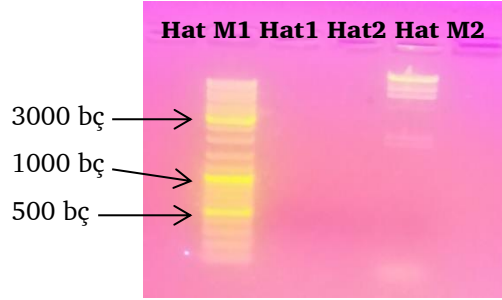
Elde edilen tüm PCR örnekleri etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklendiği için; *Acinetobacter baumannii* genomik DNA'sından enolaz geninin amplifikasyonu, tasarlanan primerler yardımıyla 5'→3' polimeraz ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi bulunan, yüksek verimlilikte amplifikasyon yeteneğine sahip termostabil bir enzim olan Long PCR Enzim Mix (Thermo Scientific, #K0181, ABD) kullanılarak tekrardan gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.21'de belirtilen PCR koşullarında gerçekleştirilen amplifikasyon neticesinde Şekil 4.9'daki agaroz jel elektroforezi görüntüsü incelendiğinde Long PCR Enzim Mix'in *AbENO* geninin doğru büyüklükte amplifikasyonunu gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir.



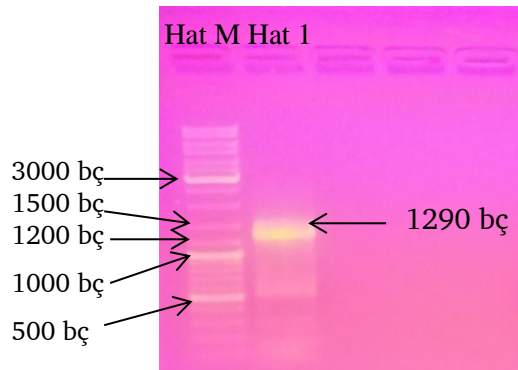
Şekil 4.9 *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5 mikrolitresinin, etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürünü.

Wizard SV Gel ve PCR Clean-up sistem Promega (ABD) [213] kullanılarak PCR ürünü saflaştırılmak istenmiştir fakat yapılan saflaştırma denemeleri sonrası PCR ürünü her saflaştırma denemesinde kaybedilmiştir. Başarısız olan saflaştırma sonrası elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10 *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün saflaştırılması sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü Hat M1: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürününün saflaştırma sonrası görüntüsü Hat 2: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürününün saflaştırma sonrası görüntüsü Hat M2: Lambda Markır.

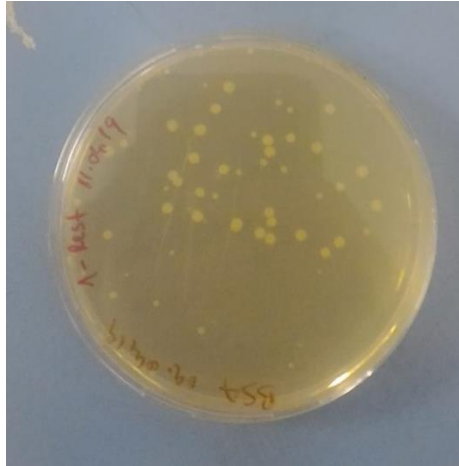
Saflaştırma denemelerinde PCR ürünlerinin her defasında kaybedilmesinden sonra bir reaksiyon daha Tablo 3.21'de belirtilen PCR koşullarında PCR yapılmıştır. Şekil 4.11'de yeniden aynı PCR koşullarında doğru büyüklükte amplifiye edilen PCR ürününün agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.11 Saflaştırma işlemi sonrası kaybedilen PCR ürünü yerine aynı koşullarda *AbENO* geninin PCR ile amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün 5mikrolitresinin etidyum bromürle boyanmış agaroz jele yüklenmesi sonucu oluşan jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Long PCR Enzim Mix kullanılarak yapılan PCR ürünü.

Agaroz jelde doğru büyüklükte olduğu onaylanan PCR ürünü, saflaştırılmadan doğrudan 3.2.1.6 da belirtilen yöntemle bu PCR ürününe Adenin kuruğu eklenmiştir. pGEM®-T Easy Vektörüne ilgili genin ligasyon işlemi 3.2.1.7'de belirtilen yöntemle yapılmıştır ve 3.2.1.8'de belirtilen metotla *E.coli* DH5 α kompetan hücreleri oluşturulmuştur. Bu işlemin devamında 3.2.1.9'da belirtilen yöntem takip edilerek transformasyon basamakları gerçekleştirilmiştir ve elde edilen rekombinant DNA molekülünün *E. coli* DH5 α hücrelerine aktarımı gerçekleştirilmiştir.

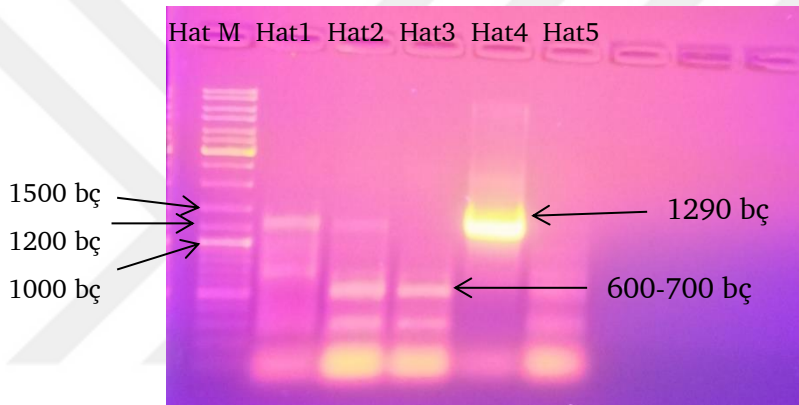
Transformasyon sonrasında mavi beyaz koloni seçimi yapılamamıştır. Bunun nedeni amfisilin içeren LB-BSA petrilerinin hazırlanması aşamasında uygulanan protokole belirtilen X-gal bileşeni 200 mikrolitre koyulması gerekirken 100 mikrolitre ilave edilmesidir. Bu durumdan dolayı mavi beyaz koloni seçilimi gerçekleştirilememiştir. pGEM®-T Easy Vektör Sistemi kullanılarak gerçekleştirilen klonlama sonrası yapılan transformasyon sonucunda LB-BSA petrilerinde oluşan kolonilerin görüntüsü Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Uygun şekil ve büyüklükte olan tüm kolonilerin taraması koloni PCR yöntemi ile yapılmıştır.



Şekil 4. 12 pGEM®-T Easy Vektör Sistemi kullanılarak gerçekleştirilen klonlama sonrası yapılan transformasyon sonucunda LB-BSA petrilerinde oluşan kolonilerin görüntüsü.

4.1.2.3 Klonlanan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü

Uygun büyüklükte, gelişimini sağlamış kolonilerin steril kürdan ile seçimi yapıldıktan sonra bu koloniler 5 mikrolitre amfisilin içeren LB sıvı besiyerlerinde bir gece boyunca geliştirilmiştir. Daha sonra 3.2.1.2’de belirtildiği şekilde koloni PCR’da kalıp olarak kullanılacak DNA izolasyonu kaynatma metoduyla gerçekleştirilmiştir. Ardından Tablo 3.18’deki koloni PCR metodu uygulanarak 5’ ile 3’ primerleri kullanılarak koloni PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Mavi beyaz koloni seçilimi yapılamadığı için beyaz kolonilerin tümü taranıp bir koloninin pozitif olduğu agaroz jel elektroforezinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Klonlanan genin PCR ile yapılan kontrolünün jel görüntüsü. Hat M:GeneRuler DNA Markır, Hat 1-5: Seçilen kolonilerden elde edilen plazmid DNA’lar ile yapılan PCR sonucu Hat 4:Pozitif Koloni.

4.1.3 *Acinetobacter baumannii* Enolaz Enzimini Kodlayan Genin pLATE 31 Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

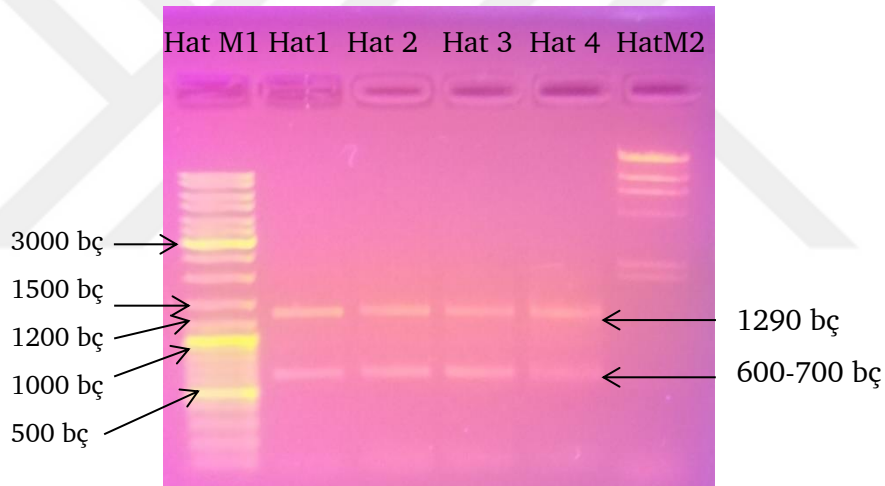
4.1.3.1 *AbENO* Geninin Amplifikasyonu ve *E. coli* DH5 α Hücrelerine Transformasyonu

-80°C’deki buzdolabında stoklanan *AbENO* genine sahip *E. coli* DH5 α hücre kültüründen steril öze kullanılarak yeterli miktarda örnek alınmış ve amfisilin ilave edilmiş LB agarlı besiyerine sürme ekim gerçekleştirilmiştir. Bir gece boyunca 37 °C’de inkübe edilmiştir. Uygun şartlar altında gelişim gösteren kolonileri içeren petriden steril kürdan ile tek koloni seçimi yapılarak 5 mikrolitre amfisilin içeren 5 mililitrelik LB sıvı besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemin ardından bir gece boyunca 37 °C'de inkübasyon yapılmıştır. Bu deney basamakları sonrası elde edilen kültürden rekombinant plazmid DNA'ların izolasyonu Promega (ABD) tarafından tedarigi sağlanan Wizard Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma kiti ile gerçekleştirilmiştir [216].

aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi [209] protokolüne uygun bir biçimde tasarlanmış primerlerin yardımıyla (*AbENO F* ve *AbENO R1*) Tablo 3.26'da belirtilen koşullarda Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

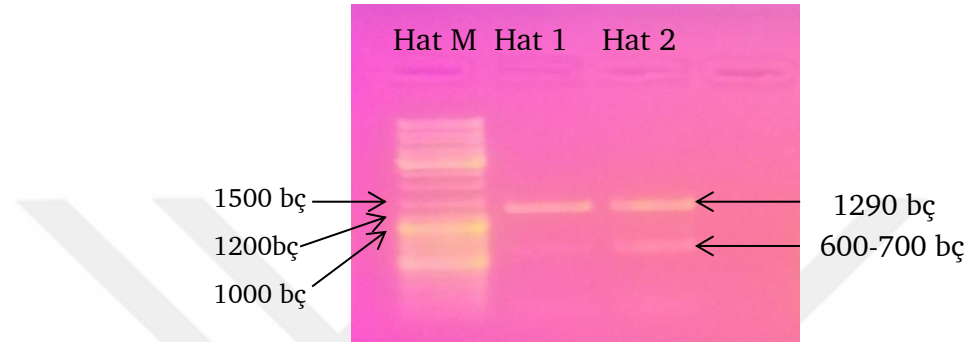
Agaroz jelde *AbENO* geninin doğru büyüklükte amplifiye edildiği gözlemlenmiştir fakat amplifiye edilen genin yanı sıra spesifik olmayan bağlanmalarda gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 *AbENO* geninin Phusion High Fidelity DNA Polimeraz enzimi kullanılarak yapılan amplifikasyonunun agaroz jel görüntüsü. Hat M1: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilen PCR ürünü, Hat M2: Lambda Markır.

Agaroz jelde gözlemlenen spesifik olmayan bağlanmaları yok edip ilgili PCR ürününü saflaştırmak için kristal viyole agaroz jel hazırlanıp örnekler bu jelde yürütülmüştür. PCR sonucu elde edilen ürün jelden hassas bir şekilde neşter kullanılarak kesilip alınmıştır ve Wizard SV Gel ve PCR Clean-up sistem ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma sonrası istenilen PCR ürünün saflaştırılıp saflaştırılmadığı görmek için etidyum bromürle boyanmış agaroz jelde yürütülmüştür.

Sonuç incelendiğinde tüm ürünlerin saflaştırma sonrası kaybedildiği gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkılarak aynı PCR koşullarında Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak 2 tüp PCR reaksiyonu yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinden hat 1’de gösterilen PCR ürünü saflaştırma yapılmadan doğrudan klonlama basamağı için kalıp olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonu sonucunda oluşan agaroz jel görüntüsü Şekil 4.15’te gösterilmiştir.



Şekil 4.15 *AbENO* geninin Phusion High Fidelity DNA Polimeraz enzimi kullanılarak yapılan amplifikasyonun agaroz jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-2: Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları.

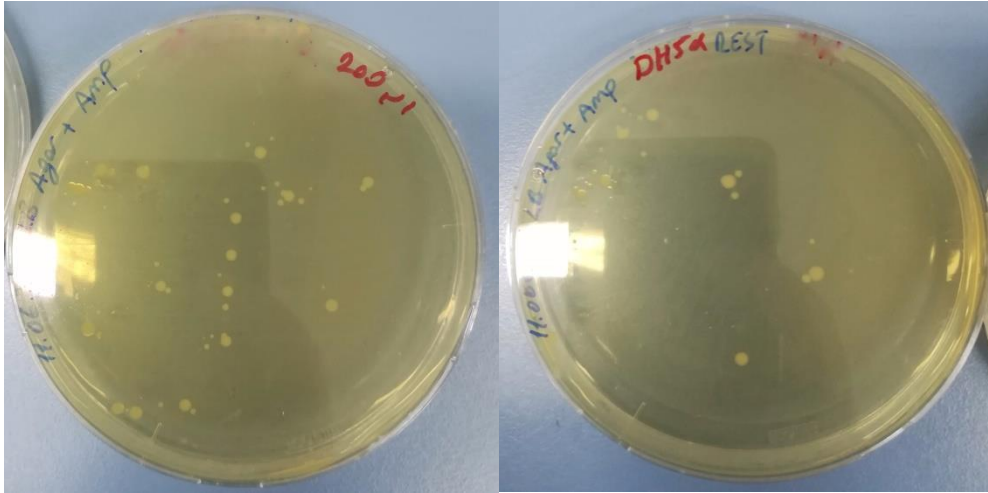
aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi protokolü incelendiğinde; gen büyüklüğüne göre reaksiyona girmesi gereken insert DNA miktarı hesaplama tablosu temel alınarak 1290 baz çifti büyüklüğündeki *AbENO* saflaştırılmış ürününün konsantrasyonunun 65 ng olarak ayarlanması gerekmektedir. Bu durumda genin vektör DNA’ya ligasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi sağlanır [209]. Şekil 4. 15’de görülen DNA bandının konsantrasyonu GeneRuler markır ile karşılaştırılarak 1 µl’de yaklaşık 20 ng olarak belirlenmiştir. *AbENO* geninin pLATE 31 vektörüne ligasyonu kit sisteminin protokolüne uygun şekilde yapılmıştır (Tablo 3.27).

Reaksiyon karışımının oda sıcaklığında 5 dk inkübasyonu yapılmıştır. Reaksiyonu durdurmak amacıyla reaksiyon karışımı 0,6 µl 0,5 M EDTA ile düzgün bir şekilde karıştırılır. Vektör ile birleşimin sağlandığı aşamada ise; T4 DNA polimeraz ile muamele edilmiş PCR ürünü içeren reaksiyon karışımına lineer pLATE31 vektöründen 1 µl (60 ng) ilave edilir ve hafifçe vortekslenir ardından 3-5 saniye santrifüj edilir. Elde edilen birleştirme reaksiyon karışımının oda sıcaklığında 5

dakika inkübasyonu gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda birleştirilen karışım transformasyona hazır duruma gelir.

T4 DNA polimeraz 5'→3' polimeraz ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitelerine sahip bir enzimdir. Ligasyonunun gerçekleşmesi için aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi içerisinde bulunan temel bileşenlerden biridir. pLATE 31 vektörü T7 promotorunu kullanmaktadır. Bu özellikten yola çıkarak vektörle genin birleşmesi sonucu oluşan rekombinant plazmid DNA'lar, IPTG ile indüklenebilen *lacUV5* promotörünün kontrolü altında T7 RNA polimeraz genini içeren BL21(DE3) ve DH5 α gibi bir *E. coli* suşuna transforme edilebilmektedir [209].

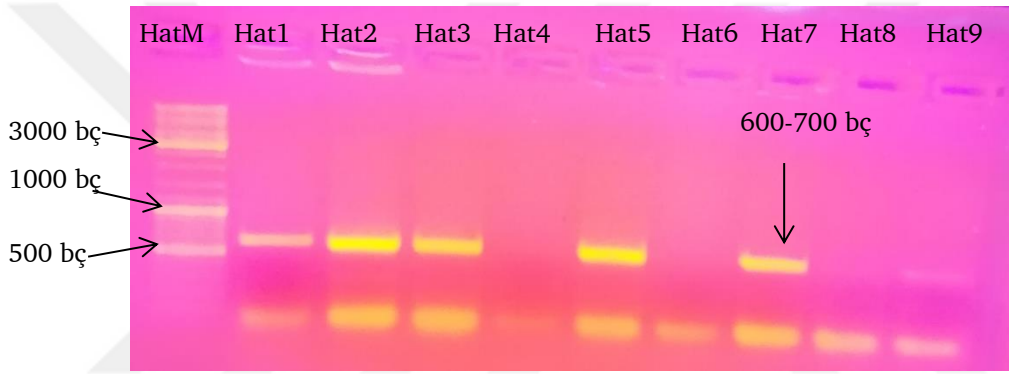
Ligasyon işlem basamağı tamamlandıktan sonra transformasyon işlemi daha önce 3.2.1.9'da belirtildiği gibi yapılmıştır. Transformasyon yapıldıktan sonra hücreler amfisilin ilave edilmiş LB agarlı petrilere sürme ekimi yapılmıştır. 37 °C'de bir gece boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası düzgün şekil ve büyüklükte koloniler gözlemlenmiştir. Şekil 4.16'da kolonileri içeren petrilere gösterilmiştir.



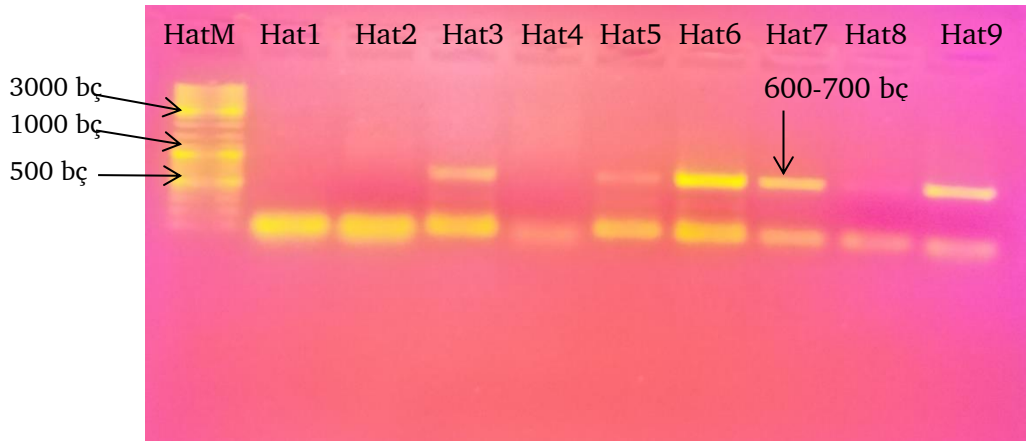
Şekil 4.16 Plate31 vektör sistemi kullanılarak gerçekleştirilen klonlama sonrası yapılan transformasyon sonucunda LB agar petrilinde oluşan kolonilerin görüntüsü.

4.1.3.2 Klonlanan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü ve Dizi Analizinin Yapılması

Uygun şartlarda gelişimini sağlamış kolonilerin steril kürdan kullanılarak seçiminin gerçekleştirilmesinin ardından, bu koloniler amfisilin ilave edilmiş 5 mililitrelik LB sıvı besiyerlerinde bir gece süresince geliştirilmiştir. Bu aşamada 18 tane koloni seçilmiştir. Bu işlemin ardından Tablo 2.28’ de gösterildiği PCR koşullarında, REDTaq DNA Polimeraz enzimi kullanılarak 5’ ile 3’ primerler yardımıyla koloni PCR gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.17 Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-9: Negatif PCR Sonucu.



Şekil 4.18 Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 1-9: Negatif PCR Sonucu.

Yukarıdaki agaroz jel görüntüleri incelendiğinde pozitif sonuç elde edilemediği gözlemlenmiştir. Elde edilen PCR ürünü saflaştırılmadan klonlama işlemi gerçekleştirildiği için, spesifik olmayan 600-700 bp uzunluğundaki nükleotid parçasının, seçilen 18 koloninin 10 tanesinde vektöre ligasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve kompetan hücrelere başarılı bir şekilde aktarıldığı gözlemlenmiştir. Bu negatif sonuçlardan yola çıkılarak enolaz yerine vektörle birleşen diğer spesifik olmayan DNA parçasının nükleotid dizisinin belirlenmesi amacıyla bu parçanın dizilenmesine karar verilmiştir. Şekil 4.17’de hat 2 de gösterilen koloninin plazmid DNA’sı izole edilip aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi içerisinde hazır olarak bulunan pLATE 31 ekspresyon vektörüne uygun primerler [209] ile çift yönlü dizileme için İontek firmasına gönderilmiştir. Şekil 4.19’da dizileme sonucu ile referans dizinin karşılaştırılması gösterilmiştir.

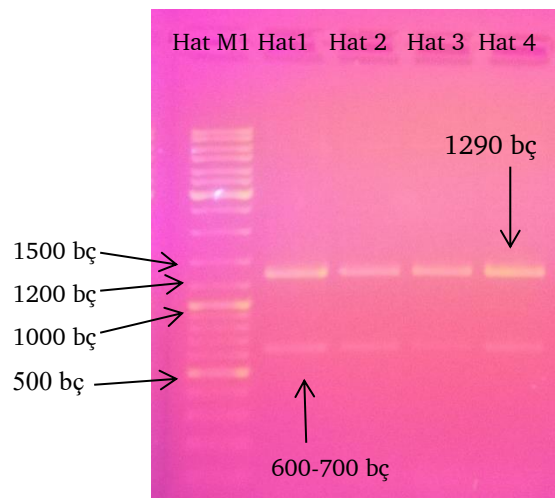
600-700bcKlon.LICF/1-1827	1	- ATGAG	10	20	30	40	50	51
Referans/1-1290	1	ATGAGC	CAATCGTTGACATT	CGTGCACGTGAAATTTTGGACTCTCGTGGTA				52
600-700bcKlon.LICF/1-1827	52		60	70	80	90	100	103
Referans/1-1290	53		ACCCAACCATCGAAGCAGACGTCATCTTAGAATCTGGGTTGGTCTGGTGC					104
600-700bcKlon.LICF/1-1827	104		110	120	130	140	150	155
Referans/1-1290	105		ATGTGCACCATCTGGTGCCTTCAACTGGTTCTCGTGAAGCTTTAGAAGCTTCGT					156
600-700bcKlon.LICF/1-1827	156		160	170	180	190	200	207
Referans/1-1290	157		GACGGCGACAAATCTCGTTACTTAGGTAAAGGCGTTCCGTACTGCTGTTCCAGA					208
600-700bcKlon.LICF/1-1827	208		210	220	230	240	250	259
Referans/1-1290	209		ATGTAATAGCTCAATTCATGAATTGCTTGTGGTCAAAGTGTTTTTGAACA					260
600-700bcKlon.LICF/1-1827	260		270	280	290	300	310	311
Referans/1-1290	261		AAAAGCGCTTGATGAAAAAATGATTGCTTTTGATGGCACTGAAAAACAAATCT					312
600-700bcKlon.LICF/1-1827	312		320	330	340	350	360	363
Referans/1-1290	313		AAACTTAGGTGCTAATGCAACTTTGGCGGTATCCTTAGCAGCAGCTCACGCAG					364
600-700bcKlon.LICF/1-1827	364		370	380	390	400	410	415
Referans/1-1290	365		CAGCAGCTGAAACAAAACTTCCATTGTTTCAATACATTGCTAACTTACGTGG					416
600-700bcKlon.LICF/1-1827	416		420	430	440	450	460	467
Referans/1-1290	417		TCAAACACTTTTACTATGCTGTACCAATGATGAACATTTTGAACGGTGGT					468
600-700bcKlon.LICF/1-1827	468		470	480	490	500	510	519
Referans/1-1290	469		GCTCAGCGAGATAACACTGTTGATATTCAAGAGTTCATGATTGAGCCAGTTG					520
600-700bcKlon.LICF/1-1827	520		530	540	550	560	570	571
Referans/1-1290	521		GTTTCACTTTCATTGCTGAAAGCATTACGTGCTGGTGCAGAAAGTATTCATTTC					572
600-700bcKlon.LICF/1-1827	572		580	590	600	610	620	623
Referans/1-1290	573		TTTGAATCACTTCTTAAGAAACAAGGTTTGAACACAGCTGTAGGTGATGAG					624
600-700bcKlon.LICF/1-1827	624		630	640	650	660	670	675
Referans/1-1290	625		GGTGGTTTTGCGCCTAACCTTGGTTCAAATGAAGAAAGCGATACAGTAATTC					676
600-700bcKlon.LICF/1-1827	676		680	690	700	710	720	727
Referans/1-1290	677		TTCAAGCAATTGAGCAAACCTGGTTATAAAGCTGGTTTCAGATATTATGCTTGC					728

Şekil 4.19 600-700 bp uzunluğundaki nükleotid parçasının pLATE 31 ekspresyon vektörüne uygun olarak dizayn edilmiş forward primerle yapılan dizileme sonucu.

Elde edilen bu sonucun ardından *AbENO* genini doğru büyüklükte ve yüksek konsantrasyonda üretmek için uygulanan klonlama metotları tekrar edilmiştir.

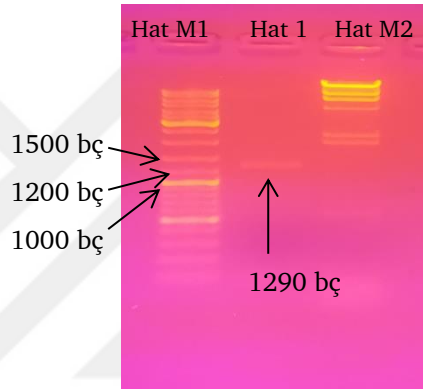
-80 °C' stoku yapılan *AbENO* genine bulunduran *E. coli* DH5 α hücre kültüründen steril öze yardımıyla yeterli miktarda örnek alınmıştır. Alınan bu örneğin 5 mikrolitre amfisilin eklenmiş LB agarlı besiyerine sürme ekimi yapılmıştır. Bir gece süresince 37 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Uygun şartlar altında gelişim sağlayan kolonileri içeren petriden steril kürdan kullanılarak tek koloni seçimi yapılmıştır. Seçilen tek koloninin 5 mikrolitre amfisilin içeren 5 mililitrelik LB sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır.

Sıvı besiyerine ekim işlemin ardından 16 saat boyunca 37 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu deney basamaklarının ardından, Promega Wizard Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma kiti [216] kullanılarak elde edilen sıvı kültürden rekombinant plazmid DNA'lar izole edilmiştir. aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi [209] protokolü temel alınarak tasarlanmış primerleri olan *AbENO* F ve *AbENO* R1 primerleriyle Tablo 3.19'da belirtilen reaksiyon koşullarında Phusion High Fidelity DNA Polimeraz ile PCR yapılmıştır. Etidyum bromürle boyanmış agaroz jelde *AbENO* geninin doğru büyüklükte amplifiye edildiği gözlemlenmiştir. Bununla beraber amplifiye edilen genin yanı sıra spesifik olmayan, 600-700 bç aralığında büyüklüğe sahip olan bir PCR ürününün de oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 *AbENO* geninin Phusion High Fidelity DNA Polimeraz enzimi kullanılarak yapılan amplifikasyonunun agaroz jel görüntüsü. Hat M1:GeneRuler DNA Markır, Hat 1-4: Phusion High Fidelity DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilen PCR ürünleri.

Etidyum bromürle boyanmış agaroz jelde gözlemlenen spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırarak PCR ürünlerini saflaştırmak için kristal viyole agaroz jel hazırlanıp hat 3 ve hat 4'te yer alan PCR örnekleri bu jelde yürütülmüştür. PCR sonucu elde edilen ürünler jelden dikkatli bir şekilde neşter ile kesilip alınmıştır ve bu iki PCR ürünü bir tüpte birleştirilerek EcoPURE PCR/Gel Purification Kit ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir [214]. Yapılan saflaştırma işlemi sonrası PCR ürünü etidyum bromürle boyanmış agaroz jelde yürütülmüştür. Sonuç incelendiğinde PCR ürünün başarılı bir şekilde saflaştırıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).

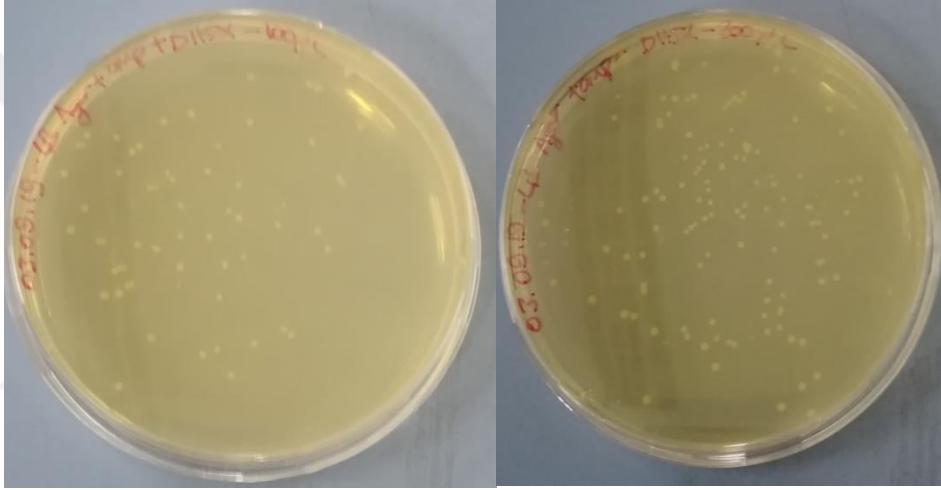


Şekil 4.21 *AbENO* geninin EcoPURE PCR/Gel Purification Kit Kullanılarak Saflaştırılması Sonrası Etidyum Bromürle Boyanmış Agaroz Jelde Görüntüsü. Hat M1:GeneRuler DNA Markır, Hat 1: Saflaştırılmış *AbENO* geni Hat M2: Lambda DNA/HindIII Markır.

Hat 1'de elde edilen saf PCR ürünü doğrudan klonlama basamağı için kalıp olarak kullanılmıştır. Şekil 4.21'de görülen DNA bandının konsantrasyonu Lambda DNA/Hind III markır ile karşılaştırılarak 1 μ l'de yaklaşık 20 ng olarak belirlenmiştir. *AbENO* geninin pLATE 31 vektörüne ligasyonu kit sisteminin protokolüne uyularak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.27).

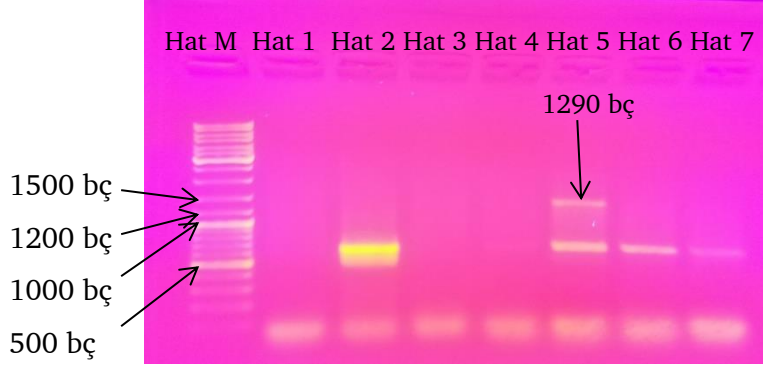
Saflaştırılmış PCR ürünü ile pLATE31 vektörünün ligasyonu Tablo 3.27'deki koşullar takip edilerek oda sıcaklığında yapılmıştır. Ardında reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 0,6 μ l 0,5 M EDTA ile reaksiyon karışımı düzgün bir şekilde karıştırılır. Vektör ile birleşimin sağlandığı aşamasında ise; T4 DNA polimeraz ile muamele edilmiş PCR ürünü içeren reaksiyon karışımına lineer pLATE31 vektöründen 1 μ l (60 ng) eklenir ve

hafifçe vorteks işlemi uygulanır. Ardından 3-5 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Elde edilen birleştirme reaksiyon karışımının oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyonu gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda birleştirilen karışım transformasyona hazır duruma gelmiştir. Ligasyon işlem basamağı tamamlandıktan sonra transformasyon işlemi daha önce 3.2.1.9'da ifade edildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Transformasyon gerçekleştirildikten sonra hücrelerin amfisilin eklenmiş LB agarlı petrilere sürme ekimi yapılmıştır. 37 °C'de bir gece süresince inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası düzgün şekil ve büyüklüğe sahip koloniler gözlemlenmiştir. Şekil 4.22'de kolonileri içeren petrilere sunulmuştur.



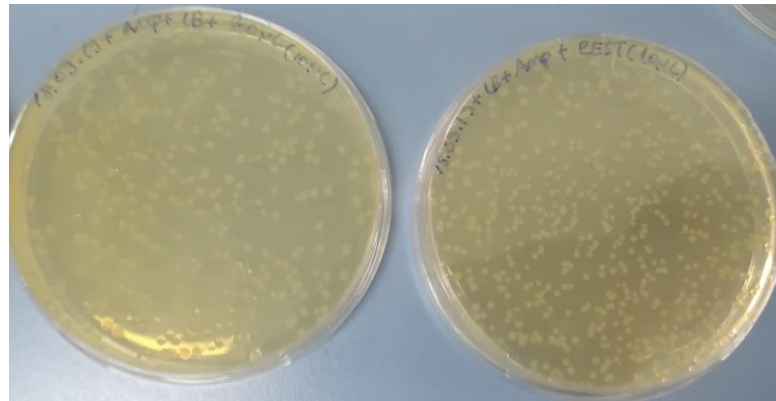
Şekil 4.22 Plate31 vektör sistemi kullanılarak yapılan klonlama sonrası gerçekleştirilen transformasyon sonucu LB agar petrilinde oluşan pozitif olduğu düşünülen kolonilerin görüntüsü.

Uygun şartlar altında gelişimini düzgün bir şekilde sağlamış koloniler steril kürdan ile ateş başında seçilmiştir. Bu aşamada 8 tane koloni seçilmiştir. Seçilen bu kolonilerin 5 mikrolitre amfisilin ilave edilmiş 5 mililitrelik LB sıvı besiyerlerinde çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca 37 °C'de 180 devirde inkübasyonu sağlanmıştır. Bu işlemin ardından kaynatma metoduyla kolonilerin DNA'ları izole edilmiştir. Tablo 3.28' de gösterildiği PCR koşullarında, REDTaq DNA Polimeraz enzimi kullanılarak *AbENO F* 5' primeri ve *AbENO R1* 3' primeri kullanılarak koloni PCR gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.23'de koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin etidyum bromürle boyanmış agaroz jel görüntüsü gösterilmiştir.



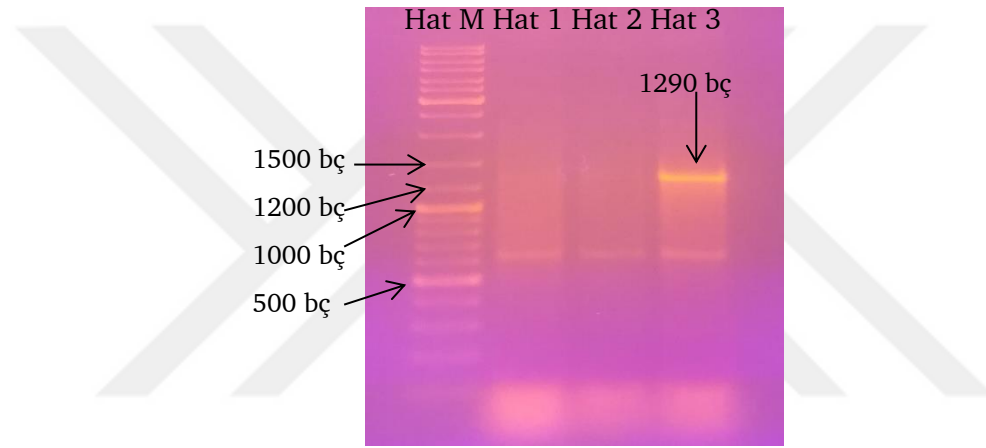
Şekil 4.23 Koloni PCR sonrasında elde edilen etidyum bromürle boyanmış agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır, Hat 5: Pozitif koloni PCR sonucu

Etidyum bromürle boyanmış agaroz jel görüntüsü değerlendirildiğinde Hat 5’de yer alan koloninin PCR sonucunun pozitif olduğu gözlemlenmiştir. İlk aşamada *AbENO* geni ve pLATE31 vektörünün birleşmesi sonucu oluşan rekombiant DNA molekülünün *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. *E. coli* DH5 α hücrelerinde ekspresyon işlemi gerçekleştirilemediği için ekspresyon aşamasına geçilebilmesi için; *AbENO* genini içeren kolonin plazmid DNA’sı Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) kiti kullanılarak izole edilmiştir [216]. Daha sonra izole edilen plazmid DNA’nın 10 mikrolitresi alınıp 3.2.1.9’daki yöntem takip edilerek *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü Şekil 4.24’te gösterilmiştir.



Şekil 4.24 *E. coli* DH5 α hücrelerinden izole edilen *AbENO* genini içeren plazmid DNA’ların *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu sonrası oluşan petri görüntüleri.

Uygun şartlar altında düzgün büyüklük ve şekilde gelişim göstermiş koloniler steril kürdan ile ateş başında seçilmiştir. Bu aşamada 3 tane koloni seçilmiştir. Seçilen bu kolonilerin 5 mikrolitre amfisilin içeren 5 mililitrelik LB sıvı besiyerlerinde çalkalamalı inkübatörde 16 saat boyunca 37 °C’de 180 devirde inkübasyonu sağlanmıştır. Bu işlemin ardından 3.2.1.2’de belirtilen kaynatma metoduyla kolonilerin DNA’ları izole edilmiştir. Tablo 3.21’de gösterildiği PCR koşullarında, REDTaq DNA Polimeraz enzimi kullanılarak *AbENO F* ve *AbENO R1* primerleri kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. Şekil 4.25’de koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin etidyum bromürle boyanmış agaroz jel görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.25 Koloni PCR sonrasında elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Markır; Hat 1,2: Negatif PCR sonucu, Hat 3: Pozitif PCR sonucu.

Pozitif çıkan hat 3’teki koloni seçilerek 5 ml’lik sıvı besiyerindeki kültür %50 gliserol ve sıvı azot ile muamele edilmiştir ve -80 °C’de saklanmak üzere stok kültür hazırlanmıştır. Stok kültür oluşturmanın yanı sıra bu kültürden plazmid DNA’lar izole edilmiştir. İzole edilen bu plazmid DNA’lar Triogen firması tarafından T7 universal primeri forward primer ve PQE-FP universal primeri de revers primer olarak kullanılarak çift yönlü dizilenmiştir. Firma tarafından iletilen dizileme sonucu Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de gösterilmiştir.

<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	1	- ATGAG	10	20	30	40	50	52
<i>Referans/1-1290</i>	1	ATGAGC	CAAATCGTTGACATTGCGTGCACGTGAAATTTTGGACTCTCGTGGTAA	53				
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	53	CCCAACCATCGAAGCAGACGTCATCTTAGAATCTGGGGTGGTTGGTGGTGCAT	105					
<i>Referans/1-1290</i>	54	CCCAACCATCGAAGCAGACGTCATCTTAGAATCTGGGGTGGTTGGTGGTGCAT	106					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	106	GTGCACCATCTGGTGCCTTCAACTGGTTCTCGTGAAGCTTTAGAACTTCGTGAC	158					
<i>Referans/1-1290</i>	107	GTGCACCATCTGGTGCCTTCAACTGGTTCTCGTGAAGCTTTAGAACTTCGTGAC	159					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	159	GGCGACAAATCTCGTTACTTAGGTAAAGGCGTTCTACTGCTGTTTCAGAATGT	211					
<i>Referans/1-1290</i>	160	GGCGACAAATCTCGTTACTTAGGTAAAGGCGTTCTACTGCTGTTTCAGAATGT	212					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	212	AAATAGCTCAATTCATGAATTGCTTGTGGTCAAAGTGTTTTGAACAAAAAG	264					
<i>Referans/1-1290</i>	213	AAATAGCTCAATTCATGAATTGCTTGTGGTCAAAGTGTTTTGAACAAAAAG	265					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	265	CGCTTGATGAAAAAATGATTGCTTTTGTGATGGCACTGAAAAACAAATCTAAACTA	317					
<i>Referans/1-1290</i>	266	CGCTTGATGAAAAAATGATTGCTTTTGTGATGGCACTGAAAAACAAATCTAAACTA	318					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	318	GGTGCTAATGCAACTTTGGCGGTATCTTTAGCAGCAGCTCACGCAGCAGCAGC	370					
<i>Referans/1-1290</i>	319	GGTGCTAATGCAACTTTGGCGGTATCTTTAGCAGCAGCTCACGCAGCAGCAGC	371					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	371	TGAACAAAAACTTCCATTGTTTCAATACATTGCTAACTTACGTGGTCAAACATA	423					
<i>Referans/1-1290</i>	372	TGAACAAAAACTTCCATTGTTTCAATACATTGCTAACTTACGTGGTCAAACATA	424					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	424	CTTTGACTATGCCTGTACCAATGATGAACATTTTGAACGGTGGTGCCTCACGCA	476					
<i>Referans/1-1290</i>	425	CTTTGACTATGCCTGTACCAATGATGAACATTTTGAACGGTGGTGCCTCACGCA	477					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	477	GATAACACTGTTGATATTC AAGAGTTTCATGATTGAGCCAGTTGGTTTCACTTC	529					
<i>Referans/1-1290</i>	478	GATAACACTGTTGATATTC AAGAGTTTCATGATTGAGCCAGTTGGTTTCACTTC	530					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	530	ATTGGCTGAAGCATTACGTGCTGGTGCAGAAATATTCATTCTTTGAAATCAG	582					
<i>Referans/1-1290</i>	531	ATTGGCTGAAGCATTACGTGCTGGTGCAGAAATATTCATTCTTTGAAATCAG	583					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	583	TTCTTAAGAAACAAGGTTTGAACACAGCTGTAGGTGATGAGGGTGGTTTTGCG	635					
<i>Referans/1-1290</i>	584	TTCTTAAGAAACAAGGTTTGAACACAGCTGTAGGTGATGAGGGTGGTTTTGCG	636					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	636	CCTAACCTTCGTTCAAATGAAGAAGCGACTACAGTAATTCTTCAAGCAATTGA	688					
<i>Referans/1-1290</i>	637	CCTAACCTTCGTTCAAATGAAGAAGCGACTACAGTAATTCTTCAAGCAATTGA	689					
<i>AbENOWonLICF/1-1009</i>	689	GCAAACCTGGTTATAAAGCTGGTTTCAGATATTATGCTTGCACCTTACTGTGCAT	741					
<i>Referans/1-1290</i>	690	GCAAACCTGGTTATAAAGCTGGTTTCAGATATTATGCTTGCACCTTACTGTGCAT	742					

Şekil 4.26 T7 universal primeri kullanılarak dizilenen; LIC 5' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile *A. baumannii* ENO'nun referans dizisinin eşleştirme sonucu. 1. sıra: Klonlanan DNA'nın gen dizisi; 2. sıra: *A. baumannii* enolaz enzimini kodlayan referans gen dizisi.

<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	1	GT T T A A A C C T T T G A A T T C A G C T T T A C C G C G G T A A A C C G C T T T A G T T A A C T C T T	53
<i>Referans/1-1287</i>	1	GT T T A A A C C T T T G A A T T C A G C T T T A C C G C G G T A A A C C G C T T T A G T T A A C T C T T	53
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	54	C A A T A C G A A G C A A T T G G T T A T A T T T A G A A A C A C G G T C A G A A C G G C A A A G T G A A	106
<i>Referans/1-1287</i>	54	C A A T A C G A A G C A A T T G G T T A T A T T T A G A A A C A C G G T C A G A A C G G C A A A G T G A A	106
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	107	C C A G T C T T A A T T T G A C C T G C T G T A C C T A C T G C T A A A T C A G C A A T A G T T G A	159
<i>Referans/1-1287</i>	107	C C A G T C T T A A T T T G A C C T G C T G T A C C T A C T G C T A A A T C A G C A A T A G T T G A	159
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	160	A T C T T C T G T T T C A C C A G A A C G G T G A G A A A T A A C A G T A G T G T A A C C A T T T G C T T	212
<i>Referans/1-1287</i>	160	A T C T T C T G T T T C A C C A G A A C G G T G A G A A A T A A C A G T A G T G T A A C C A T T T G C T T	212
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	213	T A G C A A G G T A G A C T G C A T C T A A A G T T T C A G T C A A T G T A C C A A T C T G G T T A T A T	265
<i>Referans/1-1287</i>	213	T A G C A A G G T A G A T T G C A T C T A A A G T T T C A G T C A A T G T A C C A A T C T G G T T A T A T	265
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	266	T T G A T C A A A A T T G A G T T A C C A A C T T T T T C A T C A A T A C C A C G T T G T A A A A T C T T	318
<i>Referans/1-1287</i>	266	T T G A T C A A A A T T G A G T T A C C A A C T T T T T C A T C A A T A C C A C G T T G T A A A A T C T T	318
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	319	A G G A T T A G T T A C G A A T A A A T C G T C A C C A A C C A A T T G G A T T T T A T C A C C A A G A A	371
<i>Referans/1-1287</i>	319	A G G A T T A G T T A C G A A T A A A T C G T C A C C A A C C A A T T G G A T T T T A T C A C C A A G A A	371
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	372	T T G A A G T T A A G T A A C T C C A G C C T T C C C A G T C A G A C T C A T C C A A A C C A T C T T C A	424
<i>Referans/1-1287</i>	372	T T G A A G T T A A G T A A C T C C A G C C T T C C C A G T C A G A C T C A T C C A A A C C A T C T T C A	424
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	425	A T A G A G A T A A T T G G A T A C T G C T T A A C A A G A C C A G C T A A G T A A T C A G C A A A T T G	477
<i>Referans/1-1287</i>	425	A T A G A G A T A A T T G G A T A C T G C T T A A C A A G A C C A G C T A A G T A A T C A G C A A A T T G	477
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	478	A T T G C T T G T A A A A G A C T T G T T G C C T T C A C C T T C A A G A A T A T A T T G A C C A T T C T	530
<i>Referans/1-1287</i>	478	A T T G C T T G T A A A A G A C T T G T T G C C T T C A C C T T C A A G A A T A T A T T G A C C A T T C T	530
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	531	T G T A G A A T T C T G A A G A T G C A C A G T C A A G T G C A A G C A T A A T A T C T G A A C C A G C T	583
<i>Referans/1-1287</i>	531	T G T A G A A T T C T G A A G A T G C A C A G T C A A G T G C A A G C A T A A T A T C T G A A C C A G C T	583
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	584	T T A T A A C C A G T T T G C T C A A T T G C T T G A A G A A T T A C T G T A A T C G C T T C T T C A T T	636
<i>Referans/1-1287</i>	584	T T A T A A C C A G T T T G C T C A A T T G C T T G A A G A A T T A C T G T A A T C G C T T C T T C A T T	636
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	637	T G A A C G A A G G T T A G G C G C A A A A C C A C C T C A T C A C C T A C A G C T G T G T T C A A A C	689
<i>Referans/1-1287</i>	637	T G A A C G A A G G T T A G G C G C A A A A C C A C C T C A T C A C C T A C A G C T G T G T T C A A A C	689
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	690	C T T G T T T C T T A A G A A C T G A T T T C A A A G A A T G G A A T A C T T C T G C A C C A G C A C G T	742
<i>Referans/1-1287</i>	690	C T T G T T T C T T A A G A A C T G A T T T C A A A G A A T G G A A T A C T T C T G C A C C A G C A C G T	742
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	743	A A T G C T T C A G C G A A T G A A G T G A A C C C A A C T G G C T C A A T C A T G A A C T C T T G A A T	795
<i>Referans/1-1287</i>	743	A A T G C T T C A G C G A A T G A A G T G A A C C C A A C T G G C T C A A T C A T G A A C T C T T G A A T	795
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	796	A T C A A C A G T G T T A T C T G C G T G A G C A C C A C C G T T C A A A A T G T T C A T C A T T G G T A	848
<i>Referans/1-1287</i>	796	A T C A A C A G T G T T A T C T G C G T G A G C A C C A C C G T T C A A A A T G T T C A T C A T T G G T A	848
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	849	C A G G C A T A G T C A A A G T A G T T T G A C C A C C G T A A G T T A G C A A T G T A T T G A A A C A A T	901
<i>Referans/1-1287</i>	849	C A G G C A T A G T C A A A G T A G T T T G A C C A C C G T A A G T T A G C A A T G T A T T G A A A C A A T	901
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	902	G G A A G T T T T T G T T C A G C T G C T G C T G C G T G A G C T G C T G C T A A A G A T A C C G C C A A	954
<i>Referans/1-1287</i>	902	G G A A G T T T T T G T T C A G C T G C T G C T G C G T G A G C T G C T G C T A A A G A T A C C G C C A A	954
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	955	A G T T G C A T T A G C A C C T A G T T T A G A T T T G T T T T C A G T G C C A T C A A A A G C A A T C A	1007
<i>Referans/1-1287</i>	955	A G T T G C A T T A G C A C C T A A T T T A G A T T T G T T T T C A G T G C C A T C A A A A G C A A T C A	1007
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	1008	T T T T T T C A T C A A G C G C T T T T T G T T C A A A A A C A C T T T G A C C A A C A A G C A A T T C A	1060
<i>Referans/1-1287</i>	1008	T T T T T T C A T C A A G C G C T T T T T G T T C A A A A A C A C T T T G A C C A A C A A G C A A T T C A	1060
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	1061	T G A A T T G A G C T A T T T A C A T T C T G A A C A G C A G T A C G A A C G C C T T T A C C T A A G T A	1113
<i>Referans/1-1287</i>	1061	T G A A T T G A G C T A T T T A C A T T C T G A A C A G C A G T A C G A A C G C C T T T A C C T A A G T A	1113
<i>AbENOMklonLICR/1-1135</i>	1114	A C G A G A T T T N T C G C C G T C A N A A	1135
<i>Referans/1-1287</i>	1114	A C G A G A T T T G T C G C C G T C A C G A A G T T C T A A A G C T T C A C G A G A A C C A G T T G A A G	1166

Şekil 4.27 PQE-FP universal primeri revers primer olarak kullanılarak dizilenen; LIC 3' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile *A. baumannii* ENO'nun referans dizisinin eşleştirme sonucu. 1. sıra: Klonlanan DNA'nın gen dizisi; 2. sıra: *A. baumannii* enolaz enzimini kodlayan referans gen dizisi.

Yapılan çift yönlü dizileme sonucu elde edilen kromatogramlar Ek A1 ve Ek A2'de verilmiştir.

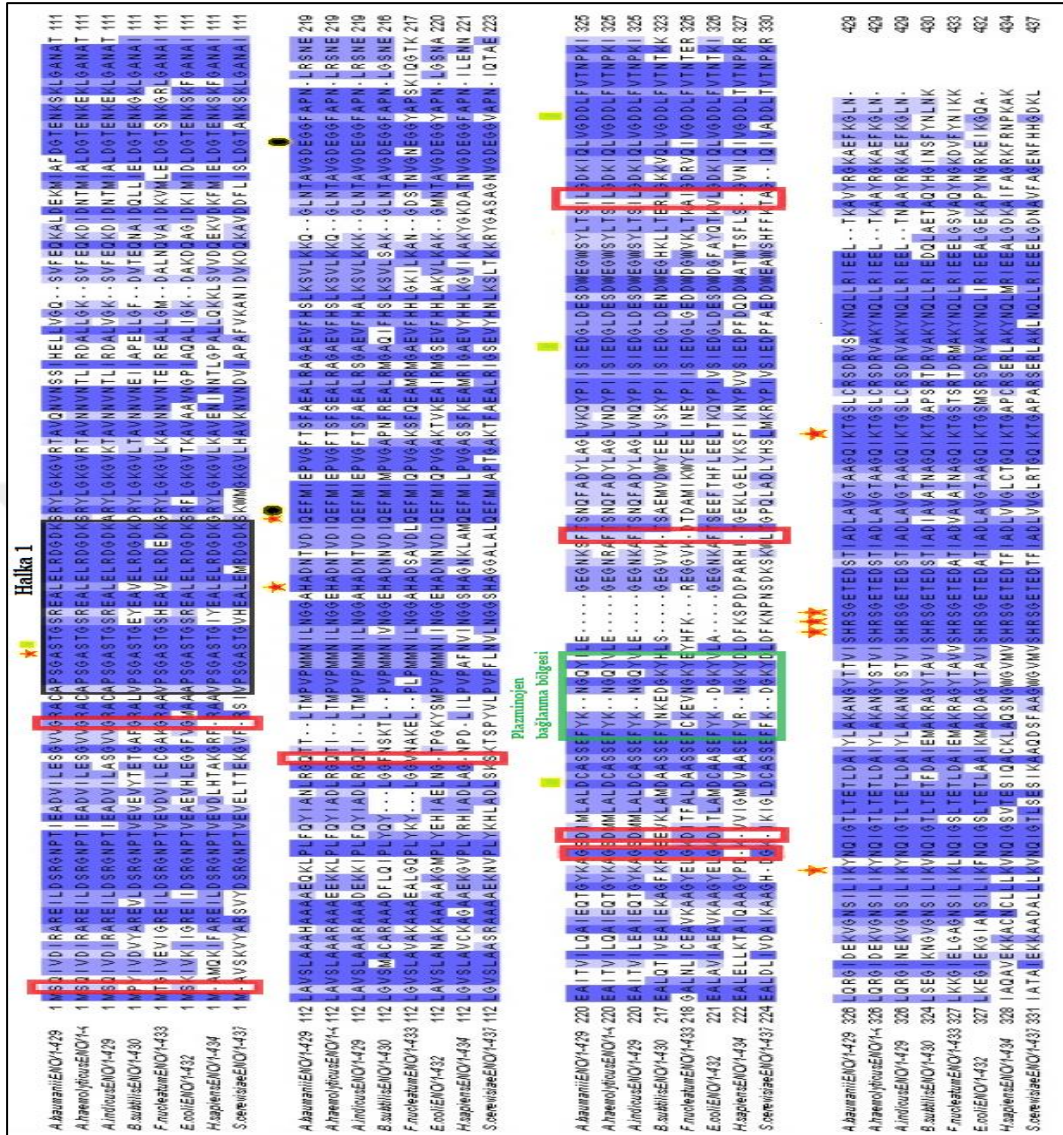
Dizileme sonucu analiz edildiğinde *A. baumannii* enolaz enzimini kodlayan genin nükleotid dizisinde mutasyon gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Klonlanan DNA parçasının nükleotid dizisi referans dizi ile karşılaştırıldığında çerçeve kayması mutasyonunun meydana geldiği görülmektedir. Klonlanan DNA parçasının *A. baumannii* Enolaz geni olmasına rağmen mutasyonun meydana geldiği yerden itibaren açık okuma çerçevesi kaydığı için enolaz proteini üretilmeyecektir.

Bu noktada sorunun primer sentezlenme aşamasında *AbENO* forward primerin 25. nükleotidi olan Adenin nükleotidinden sonra sentezlenmesi gereken bir Adenin nükleotidi sentezlenmeyip ardından gelen diğer nükleotid olan Timin'in sentezine devam edilmesinden dolayı bu durumun meydana geldiği düşünülmektedir. Bu olasılık üzerine *AbENO* forward primerinin dizilenerek kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu kontrolün ardından klonlama basamakları tekrar edilmelidir.

4.1.4 *AbENO* Dizisinin Aminoasit Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi

Bu tez çalışması kapsamında *AbENO* dizisinin aminoasit düzeyinde karşılaştırmalı analizi Clustal Omega [240] programı kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla *A. baumannii* konağı olan *H. sapiens* enolaz3 (HuENO3) (erişim no: P13929), *A. haemolyticus* MTCC 9819 enolazı (erişim no: EPR87828), *A. indicus* enolazı (erişim no: KJV45000), *B. subtilis* enolazı (erişim no: KOS73559), *E. coli* enolazı (erişim no: BAE76853), *F. nucleatum* enolazı (erişim no: EDK88978) ve *S. cerevisiae*'nin enolaz aminoasit dizileri (erişim no: P00924) ile yapılan analiz sonucunda, enolaza ait katalitik rezidüleri, olası insersiyonlar, delesyonlar ve plazminojen bağlanma bölgesi *AbENO*'da belirlenmiştir. Kristal yapısı önceden belirlenmiş olan maya enolazı [241,242] rezidü numaralandırmak için referans olarak kullanılmıştır. *A. baumannii* enolazının aminoasit benzerlikleri; *S. cerevisiae* enolazı ile % 49.21, *H. sapiens* enolaz3 ile %49.433, *A. haemolyticus* MTCC 9819 enolazı ile %93.24, *A. indicus* enolazı ile %91.841, *B. subtilis* enolazı ile %64.286, *E. coli* enolazı ile %67.361 ve *F. Nucleatum* enolazı ile %56.751'dir.

Aminoasit düzeyinde yapılan karşılaştırmalı analiz sonucu Şekil 4. 28'de gösterilmiştir.



Şekil 4.28 Enolazın çoklu dizi eşleştirmesi. Bu eşleştirme neticesinde yıldız işareti 2-PG ile etkileşimde olan, elips işareti dehidrasyon aşamasında etkili olan, kare işareti Mg⁺² iyonu ile etkileşimde olan katalitik rezidüleri göstermektedir. Kırmızı kutu içine alınan bölgeler insersiyon bölgelerini, yeşil kutu plazminojen bağlanma bölgesini ve siyah kutu halka 1 bölgesini göstermektedir.

A. baumannii enolazının katalitik rezidüleri, delesyon bölgeleri ve insersiyon bölgeleri ile plazminojen bağlanma bölgesi literatürde yer alan bilgilerden faydalanılarak protein dizi analizi ile saptanmıştır [243,244,245,246,247]. Tüm organizmalardaki katalitik rezidüleri aynı numaralarla eşleşmemektedir. Bunun nedeni farklı organizmaların enolazlarının amino asit sayılarındaki farklılıktır. Bu

durumdan dolayı, gerçekleştirilen aminoasit düzeyinde karşılaştırmalı analiz sonucunda elde edilen amino asit rezidülerinin numaralandırması hedef protein olan AbENO'ya göre gerçekleştirilmiştir. Literatür çalışmaları esas alınarak belirlenen Ala41, Ser42, His158, Gln166, Glu167, Glu208, Asp245, Glu289, Asp316, Lys341, His369, Arg370, Ser371, Lys392 rezidülerinin reaksiyonların meydana gelmesinde, 2-PG substratının ve Mg⁺² iyonlarının bağlanmasında gerçekleşmesinde etkili olan katalitik rezidüler olduğu saptanmıştır.

Tez kapsamında AbENO açık ve kapalı konformasyonu için gerçekleştirilen homoloji modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen 3 boyutlu protein modellerde bir hareketli halka bölgesi gözlemlenmiştir. Daha önce maya ve *Theileria annulata* enolazı üzerinde yapılan çalışmalar referans alınarak AbENO'daki bu hareketli halka bölgesinin *T. annulata* enolazının halka 1 bölgesi olabileceği öngörülmektedir [243,246,248]. AbENO *H.sapiens* kas enolazı [244] ile karşılaştırıldığında çeşitli peptid ve dipeptid insersiyonları gözlemlendi. S2, G33, Q140, G237, D239 ve F267 peptid insersiyonları iken (₃₀₆IL₃₀₇) dipeptid insersiyonudur. İnsersiyonların yanı sıra peptid, dipeptid ve pentapeptid delesyonları gözlemlenmiştir. D143 peptid delesyonu iken (₈₁KL₈₂) ile (₁₉₈YG₁₉₉) gözlemlenen dipeptid delesyonlarıdır. Bu delesyonlara ek olarak bir tane pentapeptid delesyonu (₂₆₂FKSPD₂₆₆) gözlemlenmiştir. Belirlenen insersiyon ve delesyon bölgelerinin fonksiyonları ileriki çalışmalarda analiz edilmelidir. Ayrıca *Streptococcus pneumoniae*'nin yüzeyinde eksprese edilen, (₂₄₉FYDKERKVYD₂₅₇) spesifik dizisine sahip olan enolazın bir hücre yüzey reseptörü oluşturduğu gösterilmiştir [247]. Enolaz bu işlevi sayesinde konak plazminojen bağlanmasında görev almaktadır. AbENO için bu bölge analiz edildiğinde (₂₅₁FYKNGQYI₂₅₈) spesifik dizisinin varlığı gözlemlenmiştir. Bu bölge plazminojen bağlanma bölgesidir. *S. pneumoniae* plazminojen bağlanma bölgesi ile karşılaştırıldığında iki aminoasitlik delesyon gözlemlenmiştir [247]. AbENO proteininin homoloji modellemesi gerçekleştirilerek muhtemel ilaç hedef bölgelerinin belirlenmesi bölüm 4.1.7'de sunulmuştur.

4.1.5 *Acinetobacter baumannii* Enolazının Molar Absorblama Katsayısının ve Molekül Ağırlığının Hesaplanması

ProtParam; proteinlerin çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklerinin teorik olarak hesaplanmasına imkan tanıyan biyoinformatik bir araçtır. AbENO aminoasit dizisi ProtParam [249]'a girilerek *A. baumannii* enolazının fiziksel ve kimyasal özellikleri hesaplanmıştır. Bu özellikler Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 *A.baumannii* enolazının çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri

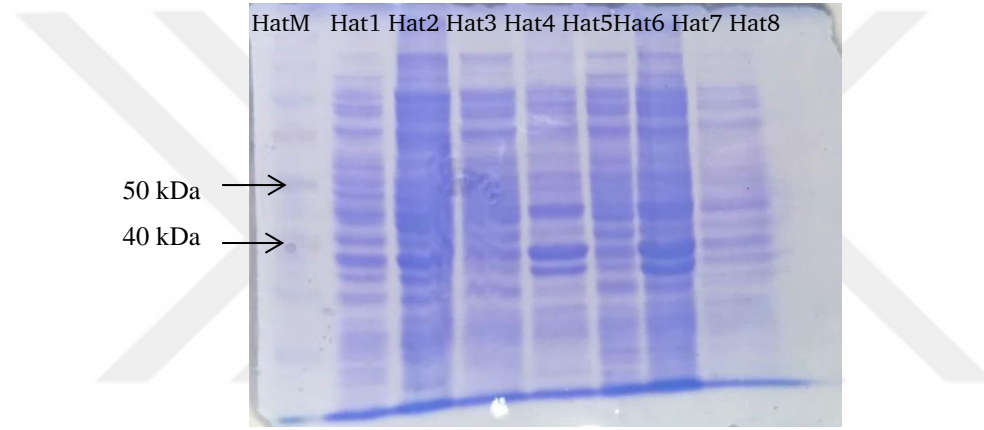
Protein	Aminoasit Sayısı	Moleküler Ağırlık	Teorik izoelektrik nokta	Negatif yüklü rezidülerin toplam sayısı (Asp + Glu)	Pozitif yüklü rezidülerin toplam sayısı (Arg + Lys)	Molar Absorblama katsayısı
A. baumannii Enolaz	429	46216.17 Da	4.99	55	41	30495 M ⁻¹ cm ⁻¹

4.1.6 *A. baumannii* Enolazının İfade Edilmesi

IPTG, *A. baumannii* enolaz enziminin ifadesinin gerçekleştirilmesi amacıyla indükleyici olarak kullanılmıştır. IPTG lac operonunun kontrolü altında olan genlerin ifade edilmesinde indükleyici olarak görev almaktadır. IPTG lac operonunun represör molekülüne bağlanır ve bu sayede gen bölgesinin açılmasını sağlayarak o bölgeye enzimin bağlanmasına aracılık etmektedir. Bu sayede lac operonu tarafından kontrol edilen β - galaktosidaz gibi genlerin transkripsiyonunu tetiklemektedir [250]. *A. baumannii* enolaz enzimini kodlayan gen olduğu düşünülen nükleotid dizisinin dizilenmesi için ilgili firmaya gönderildiği zaman ile eş zamanlı olarak ekspresyon çalışmaları yapılmıştır.

A. baumannii enolaz geninin ifade edilmesi deneyinde yapılan indükleme işlemi; 0,5 mM IPTG'nin hazırlanan 50 ml LB sıvı besiyerindeki hücre kültürlerine ilave edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. AbENO genini içinde barındıran *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri hem indüklenerek hem de indüklenmeden inkübe edilmiştir. Bu işlemin yanısıra; negatif kontrolün sağlanması amacıyla AbENO genini içermeyen *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri indüklenerek ve indüklenmeden inkübe edilmiştir.

Hücrelerin inkübasyon süreleri 3 saat, 5 saat ve bir gece boyu (16 saat) olacak şekilde belirlenmiştir. *A. baumannii* enolazın molekül ağırlığı ProtParam [249] programı kullanılarak belirlenmiştir. *AbENO*'nun 429 aminoasitlik protein dizisi programa girilerek bu değer hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen hesaplama doğrultusunda; *AbENO* proteininin molekül ağırlığı 46216.17 Da (46,21 kDa) olarak belirlenmiştir. *A. baumannii* enolaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizinde proteinin büyüklüğünü saptayabilmek amacıyla kullanılmıştır. Gerçekleştirilen ekspresyon çalışması sonrasında elde edilen hücre lizatları Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezinde yürütülmüştür (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).



Şekil 4.29 Hücrelerin 5 saat inkübe edilmesinin ardından elde edilen ekspresyon sonucu. Hat M: Protein markır, Hat 1: İndüklenmeyen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 2: İndüklenmeyen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti; Hat 3: İndüklenen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı Hat 4: İndüklenen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti, Hat 5: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 6: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti; Hat 7: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin süpernatantı, Hat 8: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin pelleti.



Şekil 4.30 Hücrelerin bir gece boyunca inkübe edilmesinin ardından elde edilen ekspresyon sonucu. Hat M: Protein markır; Hat 1: İndüklenmeyen *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin süpernatantı, Hat 2: İndüklenmeyen *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin pelleti, Hat 3: İndüklenen *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin süpernatantı, Hat 4: İndüklenen *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin pelleti, Hat 5: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin süpernatantı Hat 6: İndüklenmeyen *AbENO* genini içeren *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin pelleti, Hat 7: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin süpernatantı Hat 8: İndüklenen *AbENO* genini içeren *E. coli BL21(DE3)* hücrelerinin pelleti.

Elektroforez sonuçları değerlendirildiğinde *AbENO* proteinin ifade edilemediği gözlemlenmiştir. Ekspresyon çalışması ile eş zamanlı sonuç veren dizileme sonuçları değerlendirildiğinde *AbENO* nükleotid dizisinde çerçeve kayması mutasyonunun gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Klonlanan nükleotid dizisinin *AbENO* proteini olmadığı kanıtlanmıştır. Bu sonuç *AbENO* proteininin ekspresyonunun gerçekleştirilememesi nedenini açıklamaktadır.

4.1.7 *AbENO* Enziminin Homoloji Modellemesi ve Validasyonu

Dimer olarak bulunan enolaz enziminin alt ünitesi iki domain içermektedir. Enolazın küçük N-terminal domaini; $\alpha+\beta$ yapısına sahiptir. Dört heliks ve üç anti paralel kıvrım bu yapıyı oluşturur. Küçük N-terminal domaininin yanı sıra, sekiz kıvrıma sahip $\beta+\alpha$ fiçi topolojisi enolazın ana domainini oluşturmaktadır. Bu sekiz kıvrımlı $\beta+\alpha$ fiçi yapısı, trioz fosfat izomeraz (TIM) fiçi yapısından farklılık göstermektedir. TIM fiçi yapısı ($\beta\alpha$)₈ topolojisine sahipken bu sekiz kıvrıma sahip $\beta+\alpha$ fiçi yapısı, $\beta\beta\alpha\alpha$ ($\beta\alpha$)₆ topolojisine sahiptir. İlk olarak Lebioda vd. maya enolazında bu yapıyı tespit etmiştir [242]. Maya enolazı X-ışını kristalografi metodu kullanılarak 3 boyutlu yapısı çözümlenen ilk enolazdır [242,245,246].

Bu doğrultuda maya enolazı aminoasit rezidülerinin numaralandırılmasında kullanılmıştır.

TIM fiçı yapısının karboksilik ucunda enolaz enzimin aktif bölgesi bulunmaktadır. Enzimin aktif bölgesine giden geniş bir yarık, fiçı domainden çıkan iki uzun halka bölgesi ve N-terminal domainin bir fragmenti tarafından oluşturulmaktadır [242]. Enolaz proteinin aktif bölgesi ile ilgili yapılan analizler neticesinde; 2-PG bağlama rezidüleri belirlenmiştir. Bu rezidüler; Lys396, Ser375, Arg374, His373, Lys345, Gln167, His159 amino asitleridir [245,246]. Bu rezidülere ilave olarak Ala138 rezidüsünün de 2-PG ile etkileşim halinde olduğu belirlenmiştir [245]. Asp246, Glu295 ve Asp320 rezidülerinin Mg^{+2} iyonu ile etkileşim gösterdiği ve Ser39 rezidüsünün ise ikinci Mg^{+2} iyonu ile bağ yaptığı saptanmıştır [246]. Enolazın yapısı üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda; enolazın aktif bölgesi etrafında yer alan üç katalitik halka bölgesinin hareketinin yerel konformasyonel değişikliklerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmalar; birinci metal iyonu, substrat ve ikinci metal iyonu bağlanma sırasının önemli olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Bu özellik; enzimin kapalı, yarı-kapalı ve açık olmak üzere üç birbirinden farklı aktif bölge yapısına sahip olduğunu göstermektedir [245]. Apo-enzim olarak açık konformasyon halinde bulunan enolaz enziminin aktif bölgesi tamamen çözücü ile etkileşim halinde bulunmaktadır. Ürün ya da substrat ve metal iyonlar enzime bağlandığında, aktif bölge üzerine üç halka bölgesi yönelir ve bu durum önemli konformasyonel değişikliklerin meydana gelmesine sebep olarak enolazın “kapalı” konformasyonunu meydana getirir [245]. Tez çalışması kapsamında; *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için homoloji modelleri oluşturulmuştur. İnhibitörler enzim kapandığı için başka bölgelere bağlanabilmektedir. İnhibitörlerin aktif bölge dışına da bağlanabildiği gösterilmiştir [251]. Bu yüzden homoloji modelleme yapılırken kapalı konformasyonun da homoloji modeli oluşturulmuştur.

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı yaklaşımına yönelik olarak *A. baumannii* enolazına karşı potansiyel inhibitörlerin saptanması amacıyla *AbENO*'nun açık ve kapalı konformasyonlarının homoloji modellemesi gerçekleştirilmiştir. *AbENO*'nun açık konformasyonu için MODELLER v9.15 programı [126] ve SWISS-MODEL [224]

kullanılarak iki farklı 3B protein modeli oluşturulmuştur. Aynı şekilde *AbENO*'nun kapalı formasyonu için de bu iki program kullanılarak iki farklı 3B protein modeli yaratılmıştır. Homoloji modelleme ile 3B protein modeli oluşturmak için ilk olarak *AbENO* enziminin aminoasit dizisi web tabanlı bir sunucu olan BLAST programına yüklenmiştir. PSI-BLAST [252] algoritması kullanılarak *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için uygun kalıp proteini bulmak için PDB'ta (Protien Data Bank) yer alan proteinlere karşı protein taraması yapılmıştır [253].

Homoloji modelleme yapılabilmesi için hedef protein ile kalıp olarak seçilen protein arasında en az %30 benzerlik olması gerekmektedir [254]. Yapılan tarama sonucunda; *AbENO* açık konformasyonunun homoloji modellenmesi için %64.9 dizi benzerliğine sahip, maksimum skor değeri 537 ve E-değeri 0.0 olan 4A3R pdb numaralı *Bacillus Subtilis* enolaz proteini kalıp protein olarak seçilmiştir. *AbENO* kapalı konformasyonunun homoloji modellenmesi için ise %67.67 dizi benzerliğine sahip, maksimum skor değeri 582 ve E-değeri 0.0 olan 6BFY pdb numaralı *E.coli* enolaz enzimi kalıp protein olarak belirlenmiştir. MUSCLE programı ile %64.9 oranında dizi benzerliği gösteren kalıp ile *AbENO* amino asit dizi eşleştirme sonucu Şekil 4.31'de gösterilmiştir.

		10	20	30	40	50															
4A3R:A1PDBIDY1-430	1	MPYI	VDVYAREV	LDSRGNPT	VEVE	YTTETG	AFGRALVPSGASTG	EYEA	VELRDGDK	56											
<i>AbENO</i> V1-429	1	MSQI	VDIRAREI	LDSRGNPT	IEADV	ILESGV	VVGRACAPSGASTG	SREALE	LRDGDK	56											
		60	70	80	90	100	110														
4A3R:A1PDBIDY1-430	57	DRYLGK	GVLTAV	NNVNEI	IAPELL	GFDM	TEQNAIDQLL	IELD	GTENK	GLGANAIL	112										
<i>AbENO</i> V1-429	57	SRYLGK	GVRTAV	QNVNSSI	HELIV	QQSM	FEQKALDEKMI	AFD	GTENK	SKLGANATL	112										
		120	130	140	150	160															
4A3R:A1PDBIDY1-430	113	GVSMAC	RAAADFLQ	IPLYQY	LG	- -	SFNSK	TLFVPM	MNI	VNGGEHAD	NNVDIQEF	165									
<i>AbENO</i> V1-429	113	AVSLAA	AHAAA	AEQKLP	LFQY	IANLR	QTTLT	MPVPM	MNI	LN	GAHADNTVDIQEF	168									
		170	180	190	200	210	220														
4A3R:A1PDBIDY1-430	166	MIMPV	GAPNFR	EALRMGA	QIFH	SLSKSVL	SAKGL	NNTAV	DEGG	FAPNL	GSNEEALQT	221									
<i>AbENO</i> V1-429	169	MIEPV	GFTSFA	EALRAGA	EVF	HLSKSVL	KKQGL	NNTAV	DEGG	FAPNLR	SNEEAITV	224									
		230	240	250	260	270															
4A3R:A1PDBIDY1-430	222	I	VEAIEK	AGFK	PG	EEVKL	AMDAA	SSSEFY	NKED	QKYHLS	CEGVVK	TS	AE	MVDWYEE	276						
<i>AbENO</i> V1-429	225	I	LQAI	EQTG	YK	AGSD	IMLALD	CASSEFY	-	KNQ	QYILE	SEGN	KS	FTS	NQFADYLAG	278					
		290	300	310	320	330															
4A3R:A1PDBIDY1-430	277	LVSKY	PITIS	EDGL	DEND	WEGH	KL	LTER	LQ	KKVQL	VGD	DLF	VT	NPK	KL	SE	GT	KN	GV	332	
<i>AbENO</i> V1-429	279	LVKQY	PITIS	EDGL	DES	DWEG	WSY	LTSI	L	GD	KIQL	VGD	DLF	VT	NPK	IL	QR	I	DEK	V	334
		340	350	360	370	380	390														
4A3R:A1PDBIDY1-430	333	GNSIL	IKV	NQIG	TLT	ET	FDAI	EMAK	RAS	YTA	VISH	RS	GET	ED	STI	ADIA	VAT	NAG		388	
<i>AbENO</i> V1-429	335	GNSIL	IKY	NQIG	TLT	ET	LDAI	YLA	KAN	GYT	TV	ISH	RS	GET	ED	STI	ADIA	VAT	NAG		390

Şekil 4.31 *AbENO* açık konformasyonun homoloji modelinin oluşturulması için kalıp olarak seçilen *B. Subtilis* enolaz proteininin (1. sıra) ve *A. baumannii* enolaz proteininin (2. sıra) aminoasit dizilerinin eşleştirilmesi.

MUSCLE programı kullanılarak %67.67 oranında dizi benzerliği gösteren kalıp ile *AbENO* aminoasit dizi eşleştirme sonucu Şekil 4.32’de gösterilmiştir.

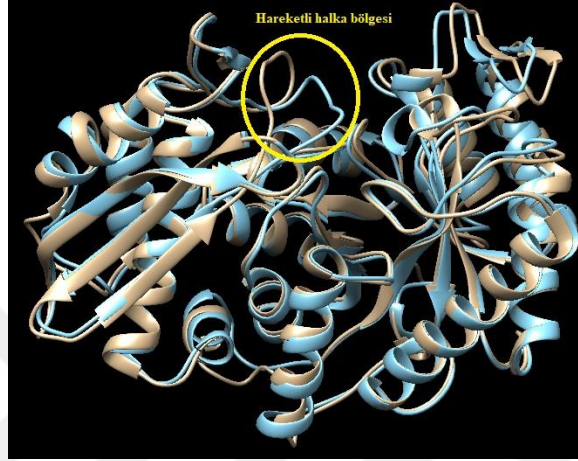
68FY:A PDBIDV1-449	1	SHMASMTGGQQMGRGSSMSKIVKIIIGREIIDSRGNPTVEAEVHLEGGFVGMAAAPS	56
<i>AbENO</i> /1-429	1	MSQIVDIRAREILDSRGNPTIEADVILESGVVGRACAPS	39
68FY:A PDBIDV1-449	57	GASTGSREALELRDGDKSRFLGKGVTKAVAVNGPIAQALIGKDAKDQAGIDKIMI	112
<i>AbENO</i> /1-429	40	GASTGSREALELRDGDKSRFLGKGVRTAVQNVNSSLHELLVGGQSVFEQKALDEKMI	95
68FY:A PDBIDV1-449	113	DL DGTENKSKFGANA ILAVSLANAKAAAAAKMPLYEHTAELNGTPGKYSPVPMM	168
<i>AbENO</i> /1-429	96	AFDGTENKSKLGNATLAVSLAAHAAAAEQKLPLFQYIANLRGQTTLTMPVPM	150
68FY:A PDBIDV1-449	169	NIINGGEHADNNVDIQEFMIQPVGAKTVKEIRMGSEVFHHLAKVLKAKGMNTAVG	224
<i>AbENO</i> /1-429	151	NILNCGAHADNTVDIQEFMIQPVGFTSFAEALRAEAEVHLSKSVLKKQGLNTAVG	206
68FY:A PDBIDV1-449	225	DEGGYAPNLGSNAEALAVIAEAVKAAAGYELGKDTLAMDCASSEFYKDGKYVLAG	280
<i>AbENO</i> /1-429	207	DEGGFAPNLRNSNEEAITVILQAIIEQTGYKAGSDIMLALDCASSEFYKNGQYILLEG	262
68FY:A PDBIDV1-449	281	GNKAFITSEEFTHFLEELTKQYPIVSIEDGLDESDDGFAFYQTKVLGDKIQLVGGDDL	336
<i>AbENO</i> /1-429	263	GNKSFTSNQFADYLAGLVKQYPIVSIEDGLDESDDGEGWSYLTSLGDKIQLVGGDDL	318
68FY:A PDBIDV1-449	337	FVTNTKILKEGIEKGIANSILIKFNQIGSLTETLAAIKMAKDAGYTAVISHRSGET	392
<i>AbENO</i> /1-429	319	FVTNPKILQRGIDKVGNSILIKYNQIGTLTETLDAIYLAANGYTTVISHRSGET	374

Şekil 4.32 *AbENO* kapalı konformasyonunun homoloji modelinin oluşturulması için kalıp olarak seçilen *E.coli* enolaz proteininin (1. sıra) ve *A. baumannii* enolaz proteininin (2. sıra) aminoasit dizilerinin eşleştirilmesi.

4.1.7.1 MODELLER v9.15 programı kullanılarak *AbENO* Açık ve Kapalı Konformasyonlarının Homoloji Modelinin Oluşturulması

AbENO açık konformasyonunun homoloji modelinin oluşturulması için, *AbENO* aminoasit dizisi ve kalıp protein pdb dosyası MODELLER v9.15 programına girilerek 100 farklı model oluşturulmuştur. Aynı şekilde *AbENO* kapalı konformasyonunun homoloji modelinin oluşturulması için *AbENO* aminoasit dizisi ve kapalı model için seçilen kalıp protein pdb dosyası MODELLER v9.15 programına girilerek 100 farklı model yaratılmıştır. Her iki form için oluşturulan modellerin DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) skoru hesaplanmıştır. Bu skor iç enerjiyle alakalı olup düşük DOPE skoruna sahip olan yapılar daha kararlı durumdadır. Bu yüzden, *A. baumannii* enolazının açık ve kapalı konformasyonları için ayrı ayrı oluşturulan 100 modelden DOPE skoru en düşük olan modeller moleküler yanıştırma çalışmaları için belirlenmiştir. Açık konformasyon için -

49929.70313 ile en düşük DOPE skoruna sahip 56 numaralı model en iyi model olarak seçilmiştir. Kapalı konformasyon için ise 29 numaralı model -51071.58594 ile en düşük DOPE skoruna sahip olup en iyi model seçilmiştir. Enerji minimizasyonu sonrası *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan homoloji modeller Şekil 4.33’de gösterilmiştir.



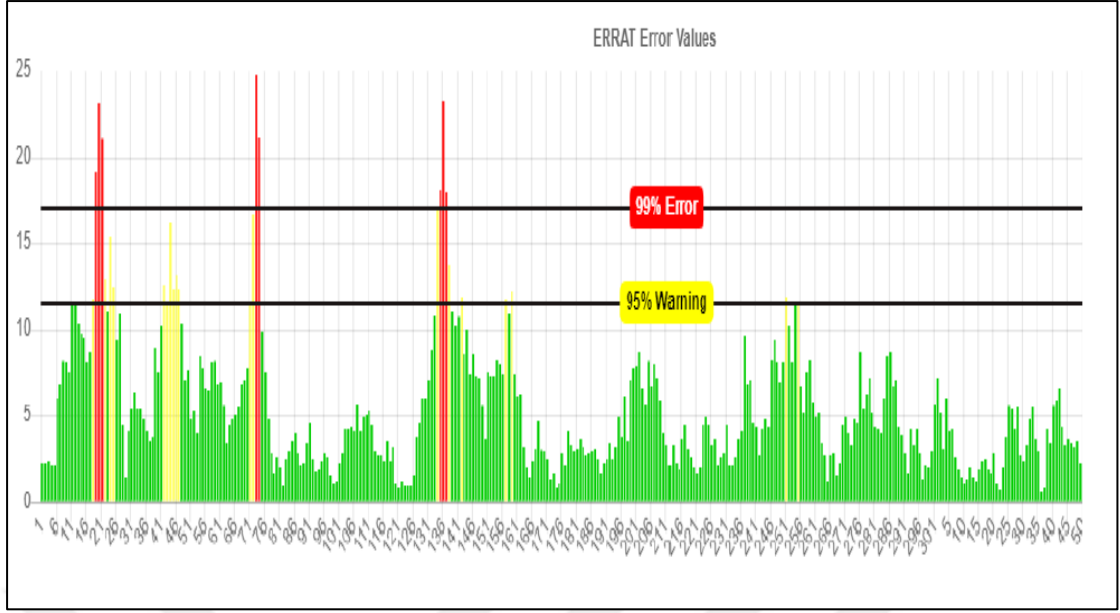
Şekil 4.33 Enerji minimizasyonu sonrası *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan homoloji modeller. Mavi renkle gösterilen kapalı form için oluşturulan homoloji modeli, turuncu renkle ise açık form için oluşturulan modeli göstermektedir.

DOPE skoru temel alınarak belirlenen modelleri deneysel hedef yapılarına yakınlaştırmak için enerji minimizasyonu Chimera v1.13.1 programı kullanılarak AMBER 14SB kuvvet alanı uygulanarak 2000 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Enerji minimizasyonu sonrası elde edilen *AbENO* açık konformasyonuna ait oluşturulan 3B protein modelinin, bu modelin oluşturulması için kalıp olarak kullanılan *B.subtilis* enolazı (PDBID:4A3R) ile süperimpozisyonu Chimera v1.13.1 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir Aynı şekilde *AbENO* kapalı konformasyonuna ait 3B protein modeli ile bu modelin oluşturulması için kalıp olarak kullanılan *E.coli* enolazı (PDBID:6BFY) ile süperimpozisyonu Chimera v1.13.1 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

AbENO'nun açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan her iki tip model ile bu iki konformasyon için seçilen kalıp protein yapılarının karşılaştırılması sonucunda, root mean square deviation (RMSD) değeri Chimera v1.13.1 programı kullanılarak elde edilmiştir. RMSD proteinlerin atomları arasındaki uzaklığı ifade eden bir değerdir. Birbirine benzer yapıların RMSD değeri 0'dır [255]. Bu bilgiden yola çıkılarak hesaplanan RMSD değerinin sıfıra yakın bir değere sahip olması oluşturulan 3B modellerin kalıp proteine benzerliğini göstermektedir. *AbENO*'nun açık ve kapalı konformasyonları için RMSD değerleri sırasıyla 0.368 Å ve 0.333 Å olarak belirlenmiştir. RMSD değeri sıfıra ne kadar yakınsa iki proteinin birbirine o derece yapısal olarak benzer olduğu anlaşılmaktadır [225].

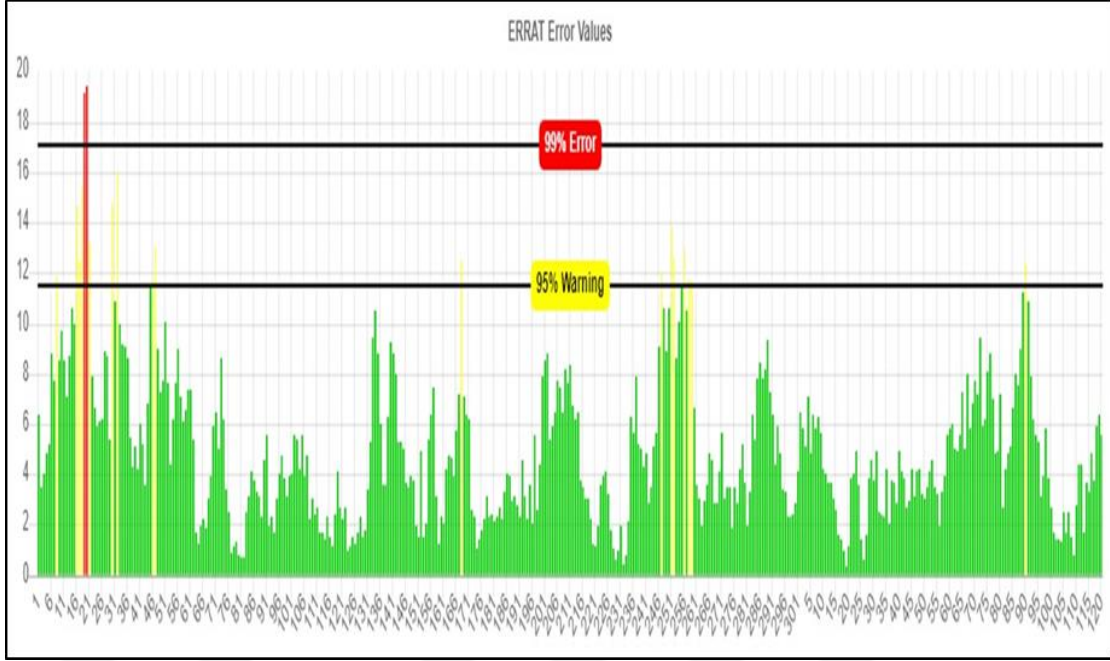
AbENO açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan 3B protein modellerinin validasyonu ilk olarak ERRAT web sunucusu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ERRAT karakteristik atomik etkileşimlere dayanan protein yapılarının doğru ve yanlış saptanmış bölgelerinin ayırt edilmesine imkan tanıyan bir programdır. Atomlar oksijen (O), karbon (C), nitrojen (N) olmak üzere 3 grupta sınıflandırılırlar. Bu durumda, atomlar arasında ikili kovalent olmayan 6 farklı kombinasyon meydana gelmektedir. Oluşan kombinasyonlar OO, CC, NO, NN, CN, CO kombinasyonlarıdır [226].



Şekil 4.34 AbENO açık konformasyonu için oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı.

ERRAT web sunucusu kullanılarak her bir rezidünün atomları arasındaki etkileşimler incelenebilmektedir ve karakteristik olmayan etkileşimlerden türeyen hatalar istatistiksel olarak saptanmaktadır. ERRAT programından elde edilen sonuçlar incelendiğinde, analiz sonucu oluşan grafikte %95'in üzerinde kırmızı renkle gösterilen alanlarda hatalı olan amino asitler gösterilmektedir. AbENO açık konformasyonuna ait oluşturulan 3B protein modelinin genel kalite faktörü enerji minimizasyon sonrasında 92.339 olarak hesaplanmıştır. Analiz sonrası ERRAT sonuçların yüksek çıkması atomlar arasındaki etkileşimin gayet iyi olduğunu ve proteinin üç boyutlu yapısının doğruluğunun yüksek olduğunu belirtmektedir. AbENO açık konformasyonu için yaratılan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı Şekil 4.34'de gösterilmiştir.

AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan 3B protein modelinin genel kalite faktörü enerji minimizasyon sonrasında 95.4869 olarak belirlenmiştir. Analiz sonrası ERRAT sonuçların yüksek çıkması atomlar arasındaki etkileşimin gayet iyi olduğunu ve proteinin üç boyutlu yapısının doğruluğunun yüksek olduğunu belirtmektedir. AbENO kapalı konformasyonu için yaratılan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı Şekil 4.35'de sunulmuştur.



Şekil 4.35 AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı.

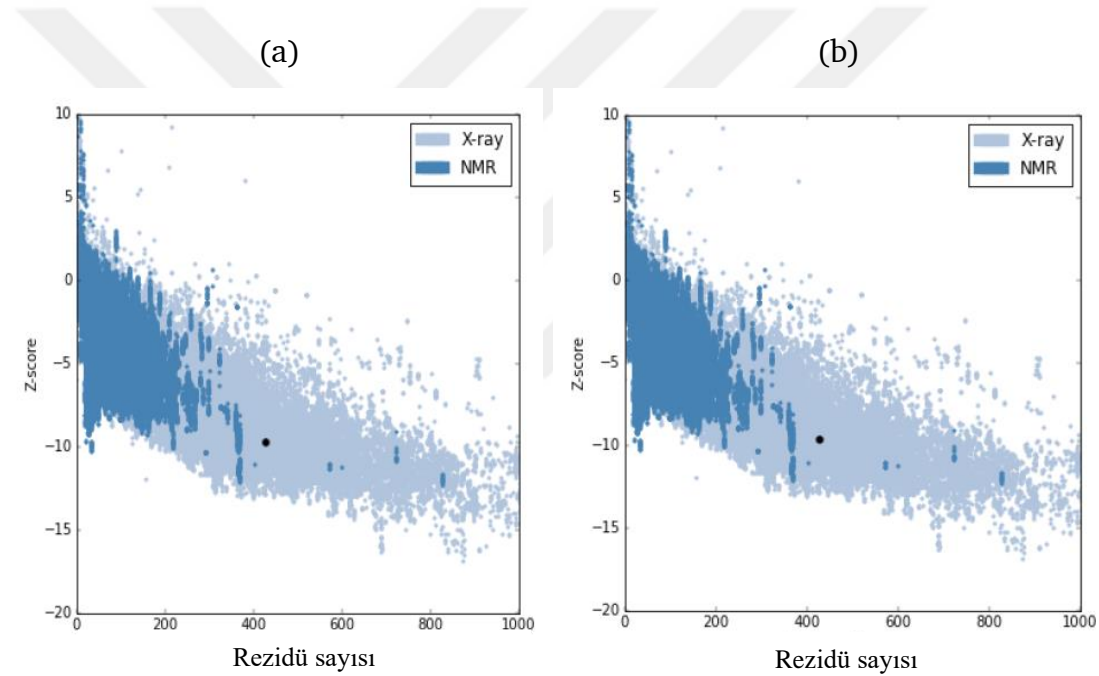
Oluşturulan modellerin validasyonu için kullanılan ikinci program ProSA'dır. Bu program ile protein yapı analizi yapılmaktadır. ProSA programı oluşturulan 3B protein yapılarında gözlemlenen potansiyel problemleri gösteren skorların ve enerji grafiklerinin görüntülenmesi amacıyla etkileşimli web tabanlı uygulamaların avantajlarından yararlanmaktadır. ProSA sunucusu ile bir proteinin sahip olduğu kalite skoru tüm bilinen protein yapıları temel alınarak gösterilir ve bir yapının sahip olduğu sorunlu bölümleri 3B molekül görüntüleyicide sunulur. NMR spektroskopisi, X-ışını analizi ve teorik hesaplamalardan elde edilen 3B protein yapılarının validasyonunda ortaya çıkan ihtiyaçlar bu sunucu tarafından karşılanmaktadır [145].

ProSA programına 3B model yapının yüklenmesiyle yapının sahip olduğu Z-skoru ve rezidü enerji grafiği oluşturulur. 3B modelin genel kalite skoru olan Z-skoru, yapısı çözümlenmiş proteinlerin konformasyonlardan türetilen bir enerji dağılımını temel alarak 3B yapının toplam enerji sapmasını belirler.

DeneySEL olarak yapısı tanımlanmış tüm proteinlerin Z-skorlarını içinde barındıran bir grafik üzerinde model 3B protein yapının Z-skoru gösterilmektedir. X-ışını ve NMR ile üç boyutlu yapısı çözümlenmiş yapı grupları grafik üzerinde farklı renkler kullanılarak gösterilmiştir. ProSA programına yüklenen proteinin Z-skoru, bu

gruplardan birine dahil olan benzer boyuttaki proteinleri için tanımlanan Z-skoru aralığında yer alıp almadığı değerlendirilir [145].

Enerji minimizasyonu gerçekleştirildikten sonra *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan 3B protein modellerinin Z-skorları sırasıyla -9.7 ve -9.6 olarak hesaplanmıştır. Her iki tip modelin X-ray kristalografisi ile yapısı çözümlenmiş protein grubu arasında bulunduğu sonucuna varılmıştır. (Şekil 4.36a ve 4.36b). Hesaplanan Z-skorlarının proteinlerin deneysel olarak yapısı çözülmüş proteinlerin skorları arasında yer alması, her iki konformasyon için oluşturulan 3B modellerin doğru modeller olarak kabul edilmesine imkan vermektedir.

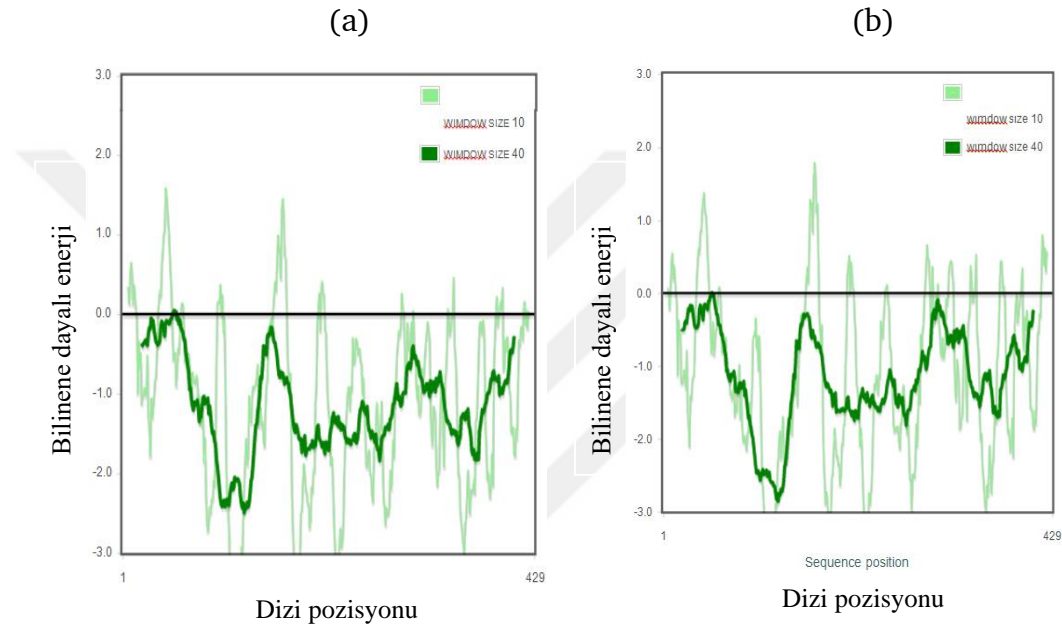


Şekil 4.36 Enerji minimizasyonu sonrası *AbENO* açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin Z-skor sonucu.

ProSA ile yapılan protein modelinin analizi sonucu elde edilen bir diğer veri olan enerji grafiğinde yerel model kalitesi; aminoasit dizi pozisyonunun fonksiyonu olarak verilen enerjilere göre değerlendirir. Tek rezidü enerji grafiği genellikle büyük dalgalanmalar sergiler. Oluşturulan 3B protein modelin değerlendirilmesi için sınırlı bir değer olarak görülmektedir. Bu nedenle 40 rezidü için ortalama enerji hesaplaması yapılarak enerji grafiğine uygulanır. Enerji grafiğinde

gözlemlenen pozitif değerler oluşturulan modelin hatalı veya sorunlu bölümlerine denk gelmektedir [145].

Bu noktada elde edilen enerji grafiği değerlendirildiğinde, neredeyse bütün rezidülerin negatif bölgede yer alması, model protein konformasyonlarının doğru bir şekilde belirlendiğini göstermektedir. *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan 3B protein modellerinin enerji grafikleri sırasıyla Şekil 4.37a ve Şekil 4.37b'de yer almaktadır.



Şekil 4.37 Enerji minimizasyonu gerçekleştirildikten sonra *AbENO* açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin enerji düzeyi grafiği.

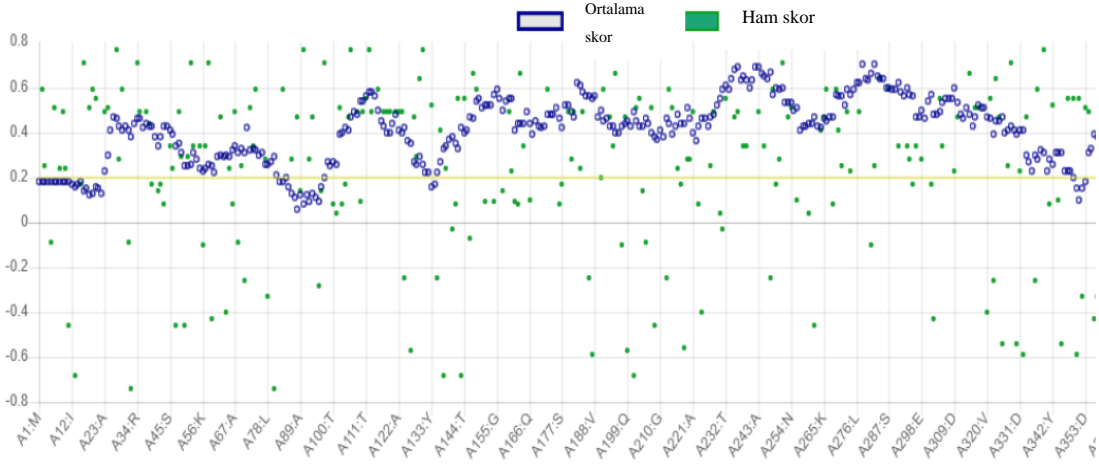
Bir diğer validasyon programı olan ProQ, homoloji modelleme sonrası oluşturulan modelin çok sayıda farklı yapısal özelliklerinden yararlanarak 3B protein modelin kalitesini değerlendiren bir araçtır. ProQ modelin kalitesini analiz ederken bazı protein yapı özelliklerinden yararlanır. Çözücü erişilebilirliği, atom-atom ve rezidü-rezidü bağ sıklığı, kalıp protein ve oluşturulan modelin ikincil yapıları arasındaki benzerlik ProQ programının yararlandığı bu protein yapı özelliklerini oluşturur. Bu protein yapı özellikleri kullanılarak modelin LGscore değeri saptanır. Oluşturulan modelin LGscore değeri 1.5'in üzerinde ise doğru model, 2.5'in üzerinde ise çok iyi model ve 4'ün üzerinde ise son derece iyi model olarak adlandırılmaktadır [227].

Son derece iyi model olarak kabul edilen *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan 3B protein modelin LGscore değeri 6.150'dir. LGscore değeri 6.223 olan *AbENO* kapalı konformasyonu için oluşturulan 3B protein model de son derece iyi model olarak kabul edilmiştir.

Validasyon için kullanılan bir diğer program RAMPAGE'dir [228]. Bu programda proteinin yapısını oluşturulan amino asit rezidülerinin phi (ϕ) ve psi (ψ) adı verilen dihedral açılarının grafiğini veren Ramachandran diyagramı oluşturulmaktadır. Oluşturulan diyagramda x-ekseninde ϕ değerleri yer alırken y-ekseninde ψ değerleri bulunur. Oluşturulan 3B protein modelin iyi kalitede olduğu yorumunun yapılabilmesi için Ramachandran diyagramında asıl bölge olarak nitelendirilen bölgedeki rezidü yüzdesinin %90 ve üzerinde olması gerekmektedir. Enerji minimizasyon sonrası *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan modelin Ramachandran diyagramındaki asıl bölgedeki rezidü yüzdesi %93.7, kabul edilebilir bölgedeki rezidü yüzdesi %5.6 ve dış bölgedeki rezidü yüzdesi %0.7'dir. Enerji minimizasyon sonrası *AbENO* kapalı konformasyonu için oluşturulan homoloji modelinin Ramachandran diyagramındaki asıl bölgedeki rezidü yüzdesi %96, kabul edilebilir bölgedeki rezidü yüzdesi %3.7 ve dış bölgedeki rezidü yüzdesi %0.2'dir.

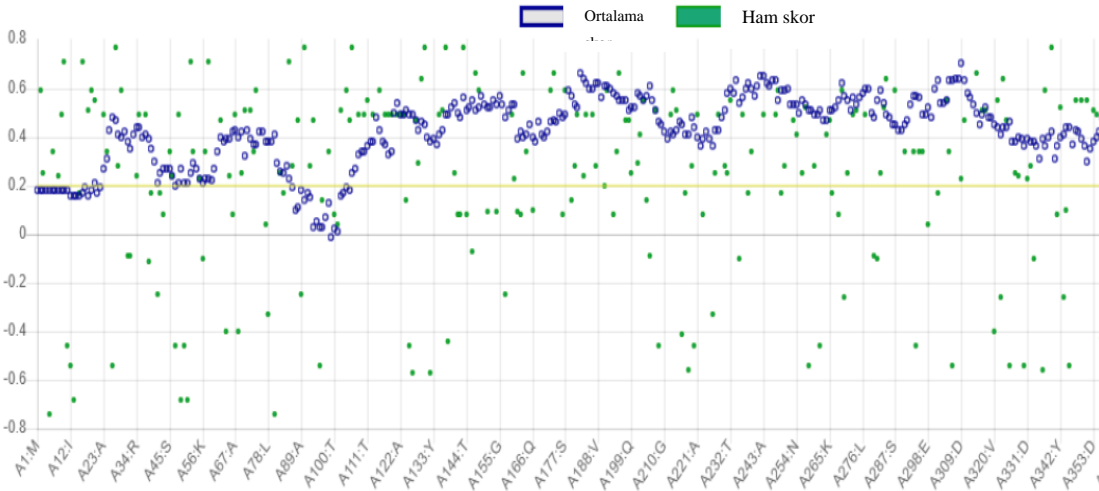
AbENO açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan her iki 3B protein modelin asıl bölgede bulunan rezidü yüzdeleri değerlendirildiğinde MODELLER v9.15 kullanılarak oluşturulan her iki modelin iyi kalitede olduğu kabul edilmiştir.

VERIFY3D oluşturulan 3B protein model ile onun bir boyutlu aminoasit dizisiyle uygunluğunu değerlendiren ve yapısı iyi bir şekilde belirlenmiş diğer modellerle karşılaştıran bir programdır. Bu şekilde 3 boyutlu profillerle protein modellerinin değerlendirilmesi gerçekleştirilir [229]. VERIFY3D programında bir modelin iyi bir model olarak değerlendirilebilmesi için amino asitlerin en az %80'inin skorunun 3D/1D profilinde 0.2'den büyük ya da eşit olması gerekmektedir. Şekil 4.38'de gösterildiği üzere *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan protein modelin rezidülerinin %86.01'inin 3D-1D skorunun 0.2'den büyük veya eşit olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.38 AbENO açık konformasyonu için oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu.

Şekil 4.39’da sunulduğu üzere AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan protein modelin rezidülerinin %88.34’ünün 3D-1D skorunun 0.2’den büyük veya eşit olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.39 AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu.

Her iki model için elde edilen VERIFY3D sonuçları değerlendirildiğinde her iki modelin de iyi bir model olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen 3B protein modellerin kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer ölçüt QMEAN’dır. QMEAN oluşturulan modelin geometrik analizini yaparak

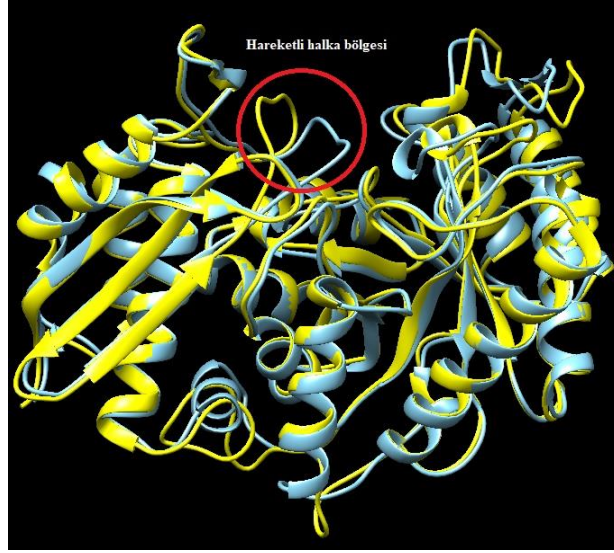
kalitesini değerlendirir [256]. Enerji minimizasyonu sonrası MODELLER kullanılarak AbENO açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan modellerin QMEAN değerleri sırasıyla -2 ve -0.72'dir. Enerji minimizasyonu yapıldıktan sonra QMEAN değeri -4'ten daha küçük olur ise bu durum oluşturulan modelin düşük kalitede olduğunu gösterir. QMEAN skoru 0'a ne kadar yakın olursa oluşturulan modelin kalitesinin o kadar iyi olduğu anlaşılır [257]. Bu değerlendirme ölçütlerinde AbENO açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan modellerin QMEAN değerlerinin iyi modellerin sahip olduğu QMEAN değerleri arasında olduğu gösterilmiştir.

4.1.7.2 SWISS-MODEL Programı Kullanılarak AbENO Açık ve Kapalı Konformasyonlarının Homoloji Modelinin Oluşturulması

AbENO açık konformasyonun homoloji modelinin oluşturulması için, AbENO aminoasit dizisi ve kalıp olarak seçilen, AbENO ile %66.12 dizi benzerliği içeren 4a3r.1.A PDB numaralı *B. subtilis* enolazı SWISS-MODEL [224] programına girilerek model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelin QMEAN değeri -1.27, GMQE değeri 0.81, C β değeri -1.16, çözünme değeri 0.42 ve torsiyonu (burulma) -1.18'dir.

AbENO kapalı konformasyonun homoloji modelinin oluşturulması için, AbENO aminoasit dizisi ve kalıp olarak seçilen, AbENO ile %68.15 dizi benzerliği içeren 6bfy.1.A PDB numaralı *E.coli* enolazı SWISS-MODEL [224] programına girilerek model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelin QMEAN değeri -0.45, GMQE değeri 0.85, C β değeri -0.24, çözünme değeri 0.60 ve torsiyonu (burulma) -0.59'dur.

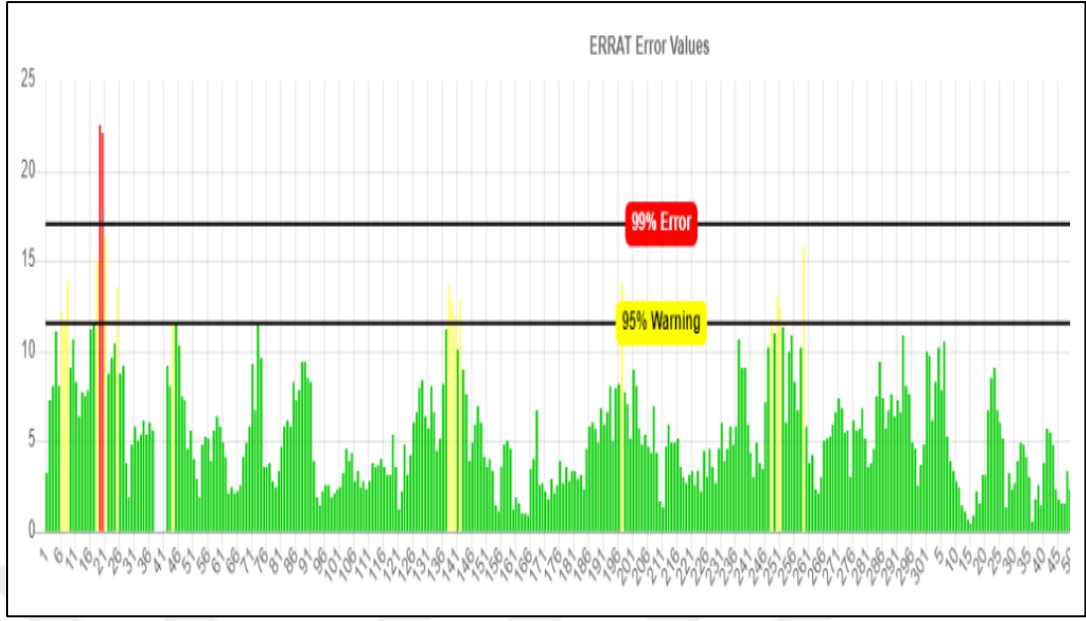
AbENO'nun açık ve kapalı formu için enerji minimizasyonu Chimera v1.13.1 programı kullanılarak AMBER 14SB kuvvet alanı uygulanarak 2000 döngü olacak şekilde yapılmıştır. Enerji minimizasyonu sonrası açık ve kapalı formun modelleri Şekil 4.40'ta verilmiştir.



Şekil 4.40 Enerji minimizasyon sonrası SWISS- MODEL kullanılarak *AbENO* açık ve kapalı form için oluşturulan homoloji modeller. Kapalı form için oluşturulan model mavi renk ile gösterilmiştir. Sarı renk ise açık form için oluşturulan modeli göstermektedir.

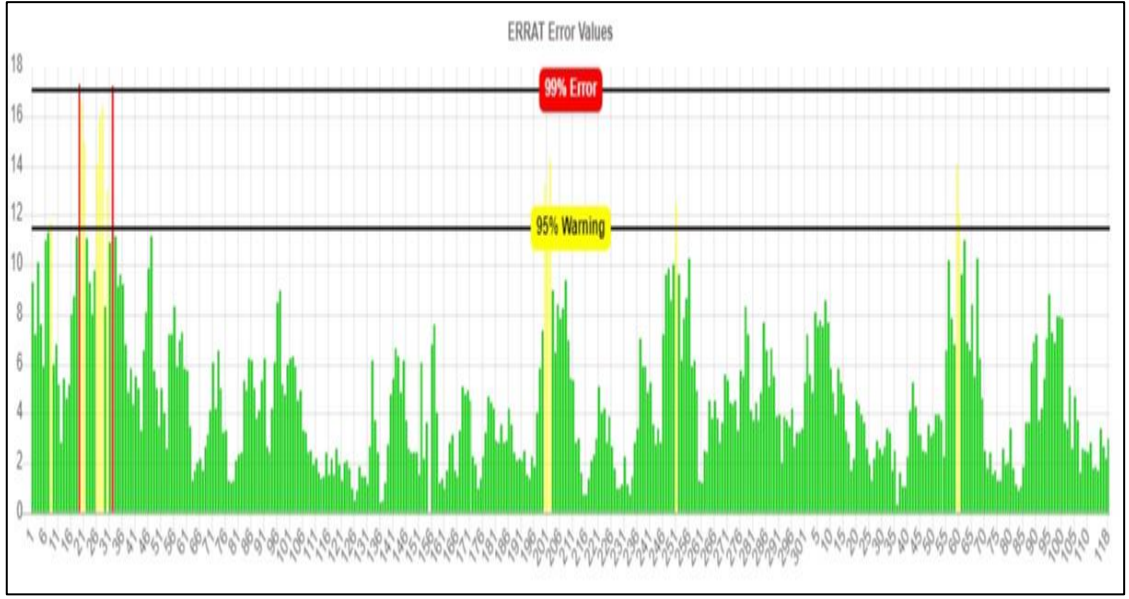
AbENO'nun açık ve kapalı konformasyonları için yaratılan her iki tip model ile bu iki konformasyon için seçilen kalıp protein yapılarının karşılaştırılması sonucunda, root mean square deviation (RMSD) değeri Chimera v1.13.1 programı kullanılarak elde edilmiştir. *AbENO*'nun açık ve kapalı konformasyonları için RMSD değerleri sırasıyla 0.369 Å ve 0.279 Å olarak belirlenmiştir. RMSD değeri sıfıra ne kadar yakınsa iki proteinin birbirine o derece yapısal olarak benzer olduğu anlaşılmaktadır [225]. Bu noktada elde edilen RMSD değerleri kabul edilebilir değerlerdir.

AbENO açık ve kapalı konformasyonları için SWISS-MODEL ile oluşturulan 3B protein modellerinin validasyonunu yapmak için kullanılan ilk web sunucusu ERRAT'tır. *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan 3B protein modelinin genel kalite faktörü enerji minimizasyon sonrasında 94.4712 olarak hesaplanmıştır. Analiz sonrası ERRAT sonuçların yüksek çıkması atomlar arasındaki etkileşimin gayet iyi olduğunu ve proteinin üç boyutlu yapısının doğruluğunun yüksek olduğunu belirtmektedir. *AbENO* açık konformasyonu için yaratılan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



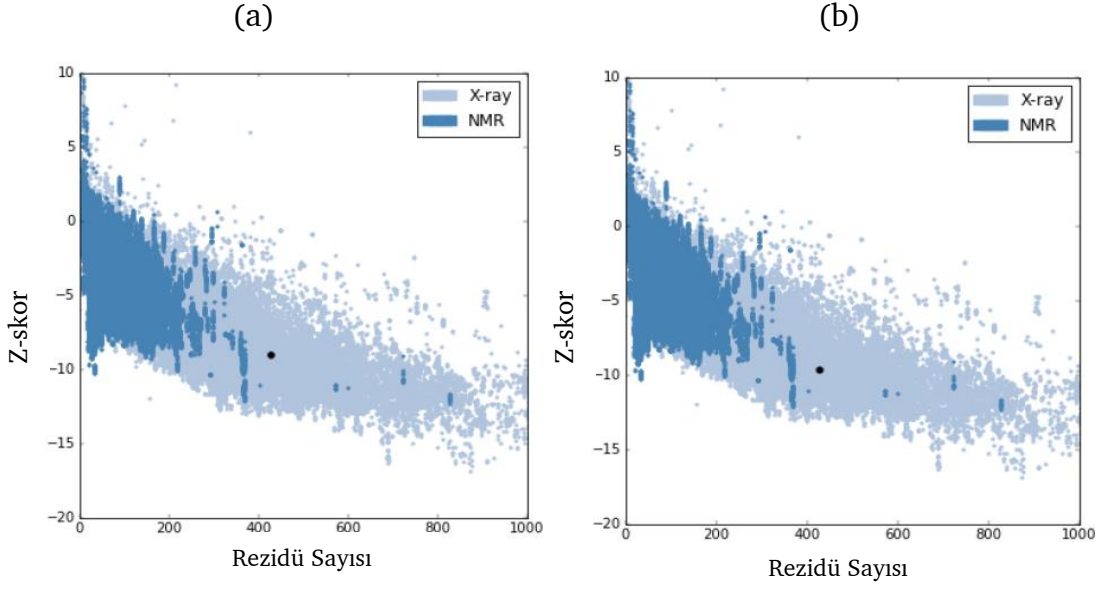
Şekil 4.41 *AbENO* açık konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı.

AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan 3B protein modelinin genel kalite faktörü enerji minimizasyon sonrasında 96.4115 olarak belirlenmiştir. Analiz sonrası ERRAT sonuçların yüksek çıkması atomlar arasındaki etkileşimin iyi bir düzeyde olduğunu ve proteinin üç boyutlu yapısının yüksek doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir. *AbENO* kapalı konformasyonu için yaratılan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı Şekil 4.42’de sunulmuştur.



Şekil 4.42 *AbENO* kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelinin enerji minimizasyon sonrası ERRAT histogramı.

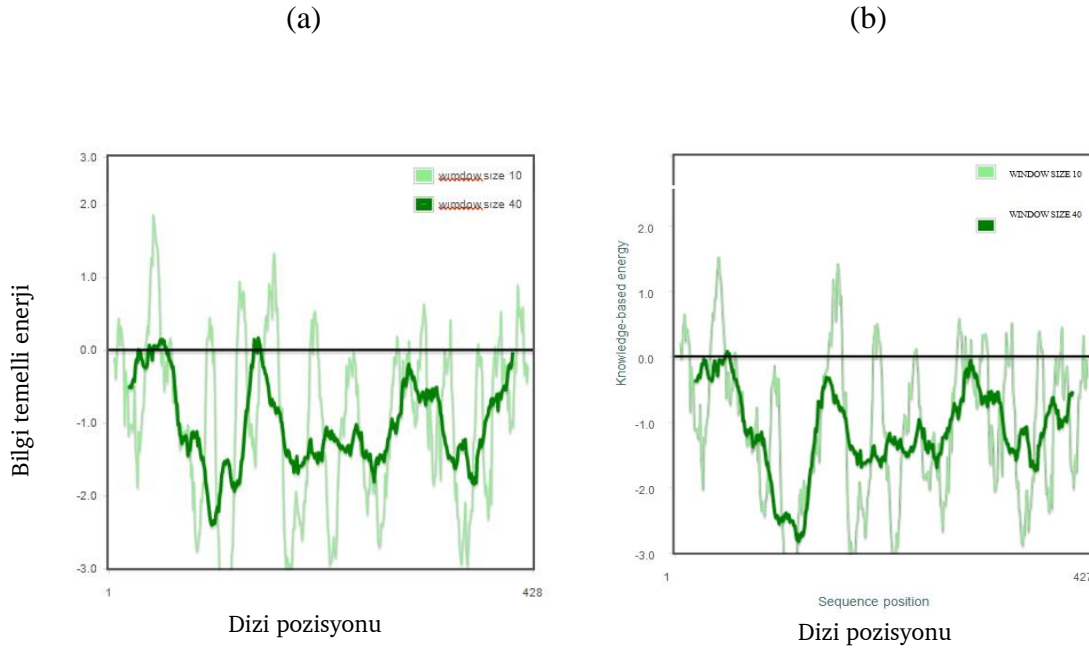
SWISS-MODEL ile oluşturulan modellerin validasyonu için kullanılan ikinci program ProSA'dır. Enerji minimizasyonu gerçekleştirildikten sonra *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan 3B protein modellerinin Z-skorları sırasıyla -8.98 ve -9.52 olarak hesaplanmıştır. Her iki tip modelin X-ray kristalografisi ile yapısı çözümlenmiş protein grubu arasında bulunduğu sonucuna varılmıştır. (Şekil 4.43a ve Şekil 4.43b). Hesaplanan Z-skorlarının proteinlerin deneysel olarak yapısı çözülmüş proteinlerin skorları arasında yer alması, her iki konformasyon için oluşturulan 3B modellerin doğru modeller olarak kabul edilmesine imkan vermektedir.



Şekil 4.43 Enerji minimizasyonu sonrası *AbENO* açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin Z-skoru sonucu.

ProSA ile yapılan protein modelinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen bir değer veri olan enerji grafiğinde yerel model kalitesi; aminoasit dizi pozisyonunun fonksiyonu olarak verilen enerjilere göre değerlendirilir.

Bu noktada oluşturulan modelin enerji grafiği değerlendirildiğinde, neredeyse bütün rezidülerin negatif bölgede yer alması, model protein konformasyonlarının doğru bir şekilde belirlendiğini göstermektedir. *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan 3B protein modellerinin enerji grafikleri sırasıyla Şekil 4.44a ve Şekil 4.44b’de yer almaktadır.



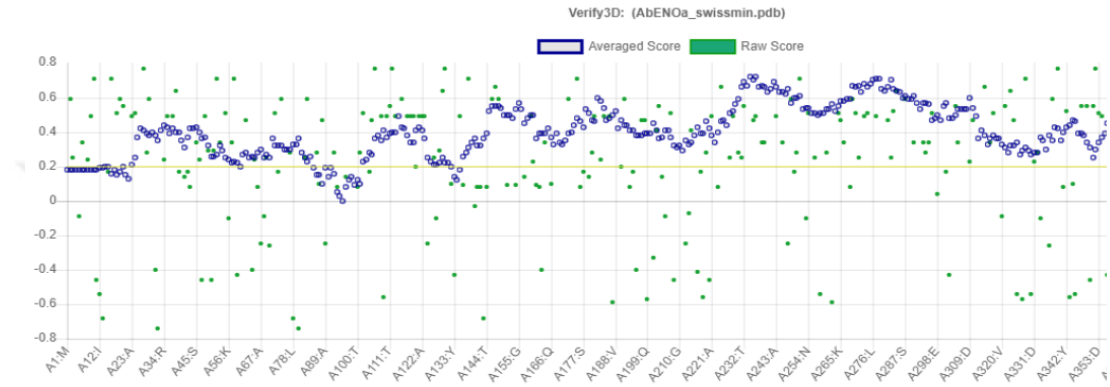
Şekil 4.44 Enerji minimizasyonu gerçekleştirildikten sonra *AbENO* açık (a) ve kapalı (b) konformasyonu için oluşturulan modellerin enerji düzeyi grafiği.

Elde edilen 3B protein modellerin kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer validasyon programı ProQ'dur. Oluşturulan modelin LGscore değeri 1.5'in üzerinde ise doğru model, 2.5'in üzerinde ise çok iyi model ve 4'ün üzerinde ise son derece iyi model olarak adlandırılmaktadır [258]. Son derece iyi model olarak kabul edilen *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan 3B protein modelin LGscore değeri 6.323'tür. LGscore değeri 6.174 olan *AbENO* kapalı konformasyonu için oluşturulan 3B protein model de son derece iyi model olarak kabul edilmiştir.

Validasyon için kullanılan bir diğer program RAMPAGE'dir [259]. Enerji minimizasyon sonrası *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan modelin Ramachandran diyagramındaki asıl bölgedeki rezidü yüzdesi %92.3, kabul edilebilir bölgedeki rezidü yüzdesi %6.6 ve dış bölgedeki rezidü yüzdesi %1.2'dir. Enerji minimizasyon sonrası *AbENO* kapalı konformasyonu için oluşturulan homoloji modelinin Ramachandran diyagramındaki asıl bölgedeki rezidü yüzdesi %94.4, kabul edilebilir bölgedeki rezidü yüzdesi %5.4 ve dış bölgedeki rezidü yüzdesi %0.2'dir. *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan her iki 3B protein modelin asıl bölgede bulunan rezidü yüzdeleri değerlendirildiğinde

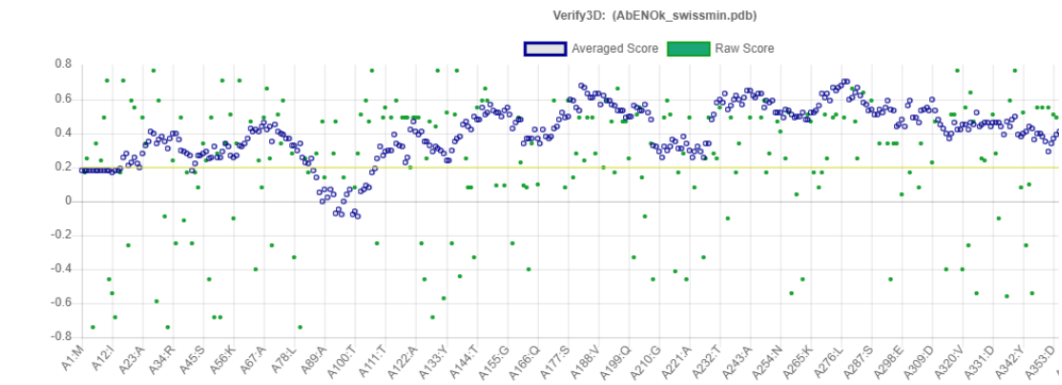
SWISS-MODEL kullanılarak oluşturulan her iki modelin iyi kalitede olduğu kabul edilmiştir.

Oluşturulan modellerin kalitesini değerlendiren bir diğer program VERIFY3D'dir [229]. Şekil 4.45'de gösterildiği üzere AbENO açık konformasyonu için oluşturulan protein modelin rezidülerinin %89.25'inin 3D-1D skorunun 0.2'den büyük veya eşit olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.45 AbENO açık konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu

Şekil 4.46'da gösterildiği üzere AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan protein modelin rezidülerinin %88.99'unun 3D-1D skorunun 0.2'den büyük veya eşit olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.46 AbENO kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein modelin VERIFY3D sonucu.

SWISS-MODEL kullanılarak *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan her iki model için VERIFY3D sonuçları değerlendirildiğinde her iki modelin de iyi bir model olduğu görülmektedir.

QMEAN değeri oluşturulan modellerin kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer önemli değerlendirme ölçütüdür [230]. SWISS-MODEL ile *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan modelin enerji minimizasyonu sonrası QMEAN değeri -2.16 iken *AbENO* kapalı konformasyonu için bu değer -0.81 olarak belirlenmiştir. QMEAN değeri 0 ile -4 arasında bir değer alırsa oluşturulan bu modelin iyi bir model olduğu belirlenir. QMEAN değeri 0'a ne kadar yakın bir değer alırsa bu model o kadar deneysel olarak 3B yapısı tanımlanmış modele yakın, kaliteli bir model olarak değerlendirilir [257]. *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL kullanılarak oluşturulan modellerin QMEAN skorları değerlendirildiğinde elde edilen modellerin iyi birer model olduğu görülmektedir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen homoloji modelleme kapsamında *AbENO* açık konformasyonu için MODELLER v9.15 ve SWISS-MODEL kullanılarak iki farklı model oluşturulmuştur. *AbENO* kapalı konformasyonu içinde bu iki program kullanılarak iki farklı model türetilmiştir. *AbENO* açık konformasyonu için MODELLER v9.15 ve SWISS-MODEL ile oluşturulan modellerin minimizasyon sonrası farklı validasyon programları uygulanması sonucunda sahip oldukları değerler Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Benzer şekilde *AbENO* kapalı konformasyonu için bu iki program kullanılarak oluşturulan modellerin minimizasyon sonrası farklı validasyon programları uygulanması sonucunda sahip oldukları değerler Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Bu iki tablo analiz edildiğinde *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için elde edilen validasyon sonuçları birbirine çok yakın olmasına rağmen SWISS-MODEL'le oluşturulan modellerin daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Moleküler yanıştırma çalışmalarında SWISS-MODEL kullanılarak *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan iki modelle devam edilmesine karar verilmiştir.

Tablo 4.2 Minimizasyon sonrası AbENO açık konformasyonu için MODELLER v9.15 ve SWISS-MODEL’le oluşturulan modellerin karşılaştırılması

Web Sunucusu	MODELLER v9.15 ile oluşturulan model	SWISS-MODEL ile oluşturulan model
ERRAT	92.399	94.4712
RAMPAGE	Tercih edilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 400 (% 93.7)	Tercih edilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 393 (% 92.3)
	İzin verilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 24 (% 5.6)	İzin verilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 28 (% 6.6)
	Dış bölgedeki rezidülerin sayısı: 3 (% 0.7)	Dış bölgedeki rezidülerin sayısı: 5 (% 1.2)
PROSA z-score	-9.7	-8.98
PROQ	Tahmin edilmiş LGscore : 6.150	Tahmin edilmiş LGscore : 6.323
QMEAN	QMEAN4 Değeri: -2.00	QMEAN4 Değeri: -2.16
VERIFY3D	% 86.01	% 89.25
RMSD	0.368	0.369

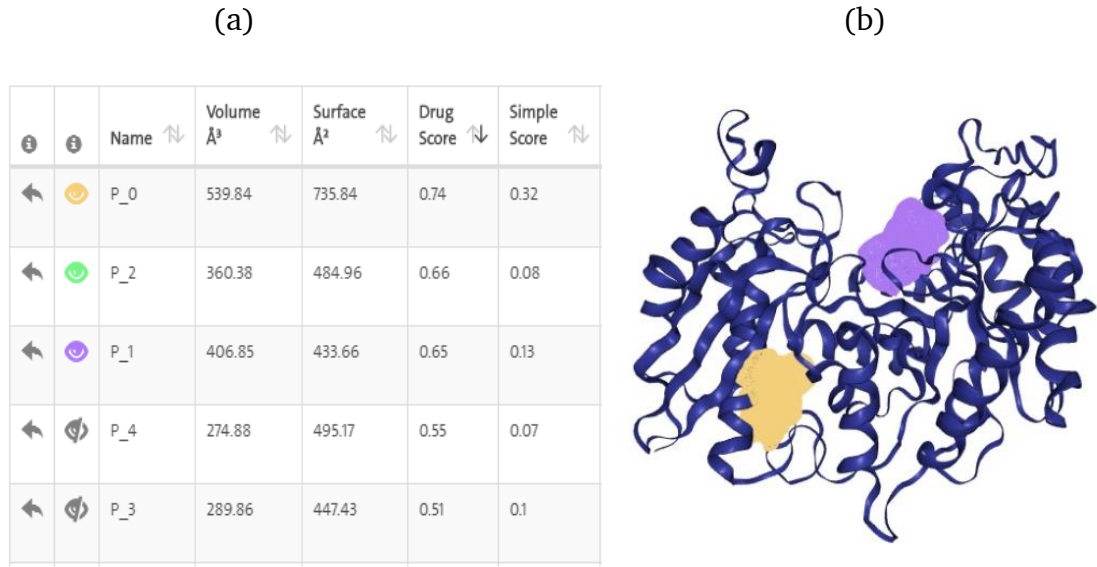
Tablo 4.3 Minimizasyon sonrası AbENO kapalı konformasyonu için MODELLER v9.15 ve SWISS-MODEL’le oluşturulan modellerin karşılaştırılması

Web Sunucusu	MODELLER v9.15 ile oluşturulan model	SWISS-MODEL ile oluşturulan model
ERRAT	95.4869	96.4115
RAMPAGE	Tercih edilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 410 (% 96.0)	Tercih edilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 401 (%94.4)
	İzin verilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 16 (% 3.7)	İzin verilen bölgedeki rezidülerin sayısı: 23 (% 5.4)
	Dış bölgedeki rezidülerin sayısı: 1 (% 0.2)	Dış bölgedeki rezidülerin sayısı: 1 (% 0.2)
PROSA z-score	-9.6	-9.52
PROQ	Tahmin edilmiş LGscore : 6.223	Tahmin edilmiş LGscore : 6.174
QMEAN	QMEAN4 Değeri: -0.72	QMEAN4 Değeri: -0.81
VERIFY3D	% 88.34	% 88.99
(RMSD)	0.333	0.279

4.1.8 Moleküler Yanaştırma Temelli Sanal Tarama ile Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi

AbENO açık ve kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan modeller kullanarak moleküler yanaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *AbENO* açık ve kapalı konformasyon için DoGSiteScorer ilaç skoru verileri dikkate alınarak her bir konformasyon için ilaç bağlanabilir iki bölge seçilerek toplamda 4 farklı moleküler yanaştırma çalışması yapılmıştır.

AbENO açık konformasyon için oluşturulan modelin aktif bölgesi ve bu bölge dışında DoGSiteScorer programında en yüksek ilaç skoruna sahip bir bölgesi moleküler yanaştırma çalışması için seçilmiştir. *AbENO* kapalı konformasyon için oluşturulan modelde ise oluşturulan 3B protein modelin aktif bölgesi seçilmemiştir. Bunun nedeni kapalı konformasyonda enzimin substratıyla etkileşim halinde olmasıdır. Enzim aktif bölgede substratı ile etkileşim halindedir ve bu durum aktif bölgeyi bileşiklerin bağlanmasını engelleyecek duruma getirmektedir. Bu nedenle aktif bölge dışında bölgeler seçilmiştir. Bu bölge yerine DoGSiteScorer programında en yüksek ilaç skoruna sahip bölge ile enzimin aktif bölgesine en yakın olan bölge moleküler yanaştırma çalışmaları için seçilmiştir.



Şekil 4.47 AbENO açık konformasyonu için oluşturulan modelin DoGSiteScorer sonuçları (a). Sarı ile gösterilen bölge AbENO açık konformasyon için oluşturulan modelde interface bölgeyi simgelerken mor ile gösterilen bölge ise aktif bölgeyi göstermektedir (b).

AbENO açık konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan model DoGSiteScorer [260] programına yüklenerek protein model üzerinde ilaç skoru en yüksek olan bölgeler listelenmiştir (Şekil 4.47). Bu bölgeler içinden P1 bölgesi aktif bölge olduğu için ve P0 bölgesi en yüksek ilaç skoruna sahip olduğu için moleküler yanaştırma çalışmaları için seçilmiştir. P1 bölgesi aktif bölge olup 0.65 ilaç skoruna sahiptir. P0 bölgesi ise muhtemel ilaç bağlanma bölgesi olup 0.74 ilaç skoruna sahiptir.

AbENO kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL ile oluşturulan protein model DoGSiteScorer [260] programına girilerek protein model üzerinde ilaç skoru en yüksek olan bölgeler listelenmiştir (Şekil 4.48). Bu bölgeler içinden P3 bölgesi en yüksek ilaç skoruna sahip olduğu için seçilmiştir. Kapalı konformasyon için moleküler yanaştırma çalışmalarında hedef olarak seçilen ikinci bölge P0'dır. DoGSiteScorer sonuçları incelendiğinde P0 bölgesinin ilaç skorunun P2 ve P1 bölgelerinden düşük olduğu görülmekteyken bu bölgenin seçilmesinin amacı enzimin aktif bölgesi ve katalitik loopa çok yakın olmasıdır. P3 bölgesi 0.73 ilaç skoruna sahiptir. P0 bölgesinin ilaç skoru ise 0.67'dir.

(a)

(b)

	Name	Volume Å ³	Surface Å ²	Drug Score	Simple Score
	P_3	320.51	438.03	0.73	0.12
	P_2	353.6	564.27	0.7	0.11
	P_1	400.19	419.11	0.69	0.12
	P_0	407.68	606.57	0.67	0.17
	P_4	296.19	509.93	0.57	0.14



Şekil 4.48 *AbENO* kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin DoGSiteScorer sonuçları (a). Pembe ile gösterilen bölge *AbENO* kapalı konformasyon için oluşturulan modelde en yüksek ilaç skoruna sahip olan bölgeyi gösterirken sarı ile gösterilen bölge ise aktif bölgeye ve katalitik halkaya en yakın olan bölgeyi göstermektedir (b).

DoGSiteScorer programı kullanılarak *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için SWISS-MODEL ile oluşturulan modeller için muhtemel ilaç bağlanma bölgeleri yukarıda gösterilen şekilde belirlenerek moleküler yavaşıtma çalışmalarına başlanmıştır. Moleküler yavaşıtma çalışmaları Schrödinger tarafından sağlanan Small - Molecule Drug Discovery yazılımı kullanılarak Maestro 2017.1 arayüz programı üzerinde GLIDE ile gerçekleştirilmiştir. Bioassay aktif 25093 bileşikten oluşan sanal kütüphane, ilk olarak *AbENO* açık konformasyon için oluşturulan modelin aktif bölgesi ile sırasıyla GLIDE HTVS, SP ve XP metodolojisinden faydalanılarak yavaşıtılmıştır [205,207]. 25093 yavaşıtılmış bileşiğin HTVS ile en iyi %30'u, ardından SP skarlama fonksiyonuna göre en iyi %20'si ve son basamak olarak XP skarlama fonksiyonu uygulanarak en iyi %10'u seçilmiştir. En güvenilir skarlama fonksiyonu olarak tanımlanan XP GlideScore'a göre yavaşıtılmış bileşikler sıralanmıştır ve toplam ligand sayısı 10'a indirgenmiştir (Tablo 4.4). *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan modelle yavaşıtılmış

bileşiklerin serbest bağlanma enerjileri MM/GBSA metodolojisi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.4 AbENO açık konformasyon için öngörülen modelin aktif bölgesi ile yavaşlatılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)

PubChem ID	Bileşik adı	XP GScore (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
4845	6-[2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl]-2-(hydroxymethyl)pyridin-3-ol	-9.659	-31.35
100766	(2R,3R,4S,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(1,8-diaminooctan-3-ylsulfanylmethyl)oxolane-3,4-diol	-9.437	-40.05
132128	10-[2-(diethylamino)ethylamino]-5-hydroxy-15-methyl-1,14-diazatetracyclo[7.6.1.0 ^{2,7} .0 ^{13,16}]hexadeca-2(7),3,5,9,11,13(16),14-heptaen-8-one	-9.318	-39.09
14539800	(2S)-1-[(2S)-1-[(2S,3R)-2-amino-3-hydroxybutanoyl]pyrrolidine-2-carbonyl]-N-[(2S,3R)-1-amino-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl]pyrrolidine-2-carboxamide	-9.257	-35.84
3074845	2-hydroxy-3-(1H-imidazol-5-ylmethyl)benzenecarboximidamide	-9.239	-60.63
3074849	2-hydroxy-3-[1-(1H-imidazol-5-yl)ethyl]benzenecarboximidamide	-9.127	-60.46
65911	(1S,2S)-3-amino-1-(2-amino-1H-imidazol-5-yl)-2-chloropropan-1-ol	-9.126	-26.89
43854	2,3,4a,8,12b-pentahydroxy-3-methyl-2,4-dihydrobenzo[a]anthracene-1,7,12-trione	-8.944	-35.70
23276420	1-[2-[2-hydroxy-3-(propan-2-ylamino)propoxy]phenoxy]-3-(propan-2-ylamino)propan-2-ol	-8.931	-42.36
11349170	(3R,4R)-4-amino-1-[[4-(3-methoxyanilino)pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-yl]methyl]piperidin-3-ol	-8.807	-39.29

Tablo 4.4'de yer alan *AbENO* açık konformasyon için öngörülen modelin aktif bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri değerlendirildiğinde PubChem ID:100766 olan bileşik (2R,3R,4S,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(1,8-diaminooctan-3-ylsulfanylmethyl)oxolane-3,4-diol) en iyi bileşik olarak seçilmiştir. 100766 numaralı bileşiğin *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan model ile yanaştırılması sonucunda XP GScore'u -9.437 kcal/mol olarak belirlenmiştir ve MM/GBSA metodolojisine göre serbest bağlanma enerjisi -40.05 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Bioassay aktif 25093 bileşiğin oluşturduğu sanal kütüphane *AbENO* açık konformasyon için oluşturulan modelin muhtemel ilaç bağlanma bölgesi olarak adlandırılan P0 bölgesi ile yanaştırılmıştır [205,207]. 25093 yanaştırılmış bileşikler en son en güvenilir skorlama fonksiyonu olan XP GlideScore'a göre sıraya dizilmiştir ve en iyi bağlanma afinitesi gösteren toplam 10 ligand listelenmiştir (Tablo 4.5). Tablo 4.5'de yer alan *AbENO* açık konformasyon için öngörülen modelin muhtemel ilaç bağlanma bölgesi olan P0 ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri incelendiğinde açık form için olduğu gibi PubChem ID: 100766 olan bileşik (2R,3R,4S,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(1,8-diaminooctan-3-ylsulfanylmethyl)oxolane-3,4-diol) bağlanma afinitesi en yüksek ligand olarak seçilmiştir. 100766 numaralı bileşiğin *AbENO* açık konformasyonu için yaratılan model ile yanaştırılması sonucunda XP GScore'u -10.409 kcal/mol olarak belirlenmiştir ve MM/GBSA metodolojisine göre serbest bağlanma enerjisi -49.38 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.5 AbENO açık konformasyon için öngörülen modelin muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)

PubChem ID	Bileşik adı	XP GScore (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
100766	(2R,3R,4S,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(1,8-diaminooctan-3-ylsulfanylmethyl)oxolane-3,4-diol	-10.409	-49.38
399465	(2S)-2,6-diamino-N-[4-(5-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylphenyl]hexanamide	-9.372	-47.03
171251	(2S,3S,4R,5R)-2-(3-aminopropylsulfanylmethyl)-5-(6-aminopurin-9-yl)oxolane-3,4-diol	-9.089	-40.74
6436013	(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(Z)-4-aminobut-2-enyl]-methylamino]methyl]-5-(6-aminopurin-9-yl)oxolane-3,4-diol	-8.917	-46.04
25031915	6-[7-[(1-aminocyclopropyl)methoxy]-6-methoxyquinolin-4-yl]oxy-N-methylnaphthalene-1-carboxamide	-8.865	-58.56
203443	(1S,3R,4S,6R)-4,6-diaminocyclohexane-1,2,3-triol	-8.630	-29.14
2687	4-[3-(tert-butylamino)-2-hydroxypropoxy]-1,3-dihydrobenzimidazol-2-one	-8.542	-50.24
130332	1-[(1-amino-3-hydroxypropan-2-yl)oxymethyl]-5-benzylpyrimidine-2,4-dione	-8.458	-43.59
132663	(2R,3R,4S,5R)-2-(4-amino-3-bromopyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)-5-(aminomethyl)oxolane-3,4-diol	-8.384	-33.42
9978917	(Z)-7-[(1R,2R,3R,5S)-2-[(E)-3,3-difluoro-4-phenoxybut-1-enyl]-3,5-dihydroxycyclopentyl]hept-5-enoic acid	-8.243	-42.15

PubChem ID:100766 olan ligandın AbENO açık konformasyonu için oluşturulan modelin aktif bölgesi (P1) ve muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

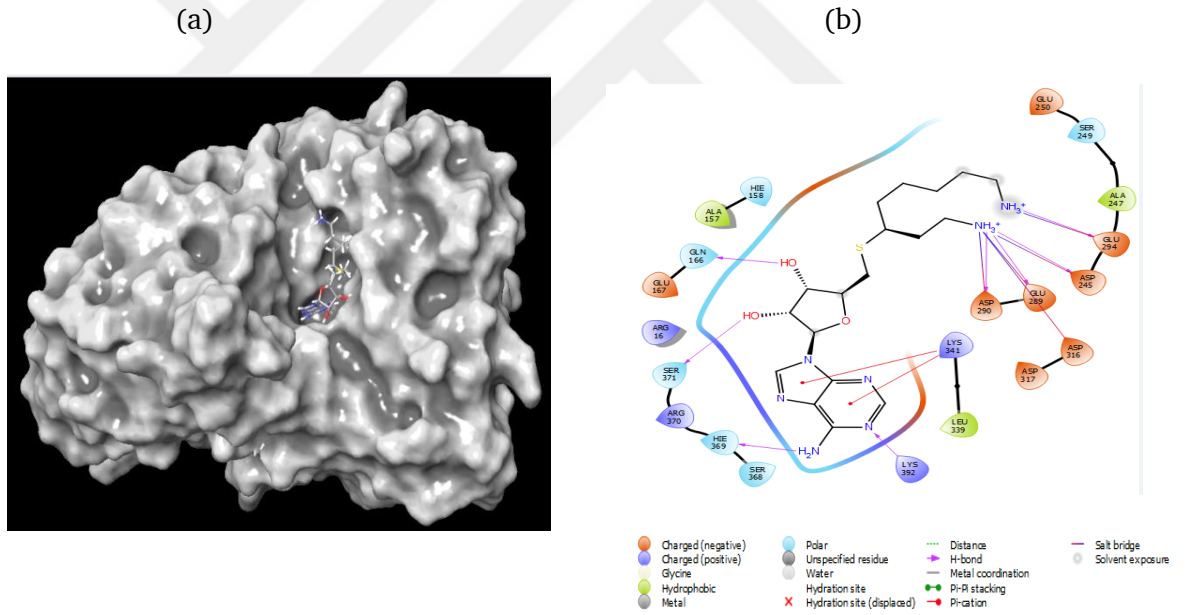
Tablo 4.6 100766 PubChem numaralı ligandın *AbENO* açık formu için oluşturulan modelin aktif bölgesi ve muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile yanıştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler

100766 numaralı ligand ile <i>AbENO</i> açık modelin aktif bölgesi (P1 bölgesi) arasındaki etkileşim rezidüleri	100766 numaralı ligand ile <i>AbENO</i> açık modelin P0 bölgesi arasındaki etkileşim rezidüleri
Arg16 (elektrostatik etkileşim)	Arg34 (hidrojen bağ)
Ala157 (hidrofobik etkileşim)	Ala35 (hidrofobik etkileşim)
Gln166 (hidrojen bağ)	Cys36 (hidrofobik etkileşim)
Glu167 (elektrostatik etkileşim)	Thr378 (polar etkileşim)
His158 (polar etkileşim)	Ser377 (polar etkileşim)
Ser371 (hidrojen bağ)	Asp376 (tuz köprüsü)
Arg370 (elektrostatik etkileşim)	Glu375 (tuz köprüsü)
His369 (hidrojen bağ)	His120 (hidrojen bağ) ve (2 tane pi-pi istiflenmesi)
Ser368 (polar etkileşim)	Glu22 (hidrojen bağ) ve (tuz köprüsü)
Lys392 (hidrojen bağ)	Ile12 (hidrofobik etkileşim)
Leu339 (hidrofobik etkileşim)	Ala123 (hidrofobik etkileşim)
Lys341 (iki pi-katyon)	Ala124 (hidrofobik etkileşim)
Asp316 (elektrostatik etkileşim) ve (tuz köprüsü)	Leu128 (hidrojen bağ)
Asp317 (elektrostatik etkileşim)	Pro129 (hidrofobik etkileşim)
Asp290 (hidrojen bağ) ve (tuz köprüsü)	Leu130 (hidrojen bağ)
Glu289 (hidrojen bağ) ve (tuz köprüsü)	Arg410 (elektrostatik etkileşim)

Tablo 4.7 100766 PubChem numaralı ligandın *AbENO* açık formu için oluşturulan modelin aktif bölgesi ve muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler (devamı)

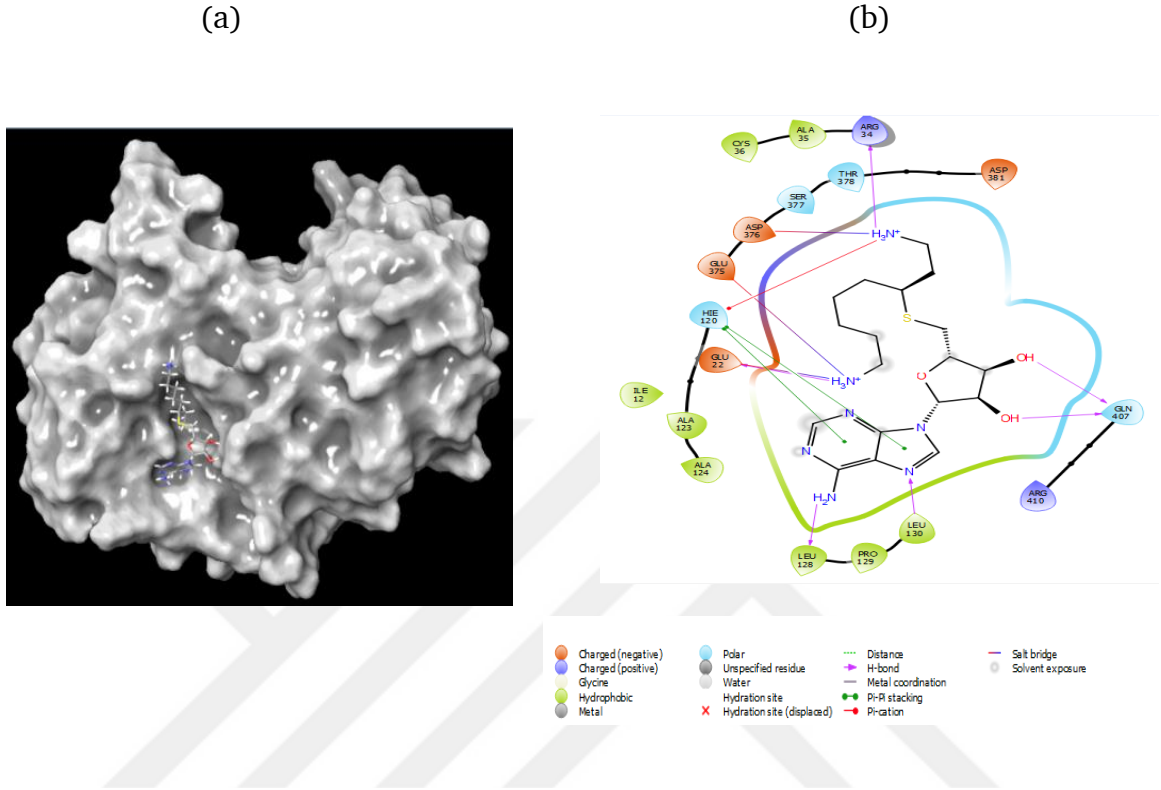
Asp245 (hidrojen bağ) ve (tuz köprüsü)	Gln407 (iki tane Hidrojen bağ)
Glu294 (hidrojen bağ) ve (tuz köprüsü)	Asp381 (elektrostatik etkileşim)
Ala247 (hidrofobik etkileşim)	
Ser249 (polar etkileşim)	
Glu250 (elektrostatik etkileşim)	

AbENO açık konformasyonu için öngörülen modelin aktif bölgesi ile 100766 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi Şekil 4.49'da gösterilmiştir.



Şekil 4.49 *AbENO* açık konformasyonu için öngörülen modelin aktif bölgesi ile 100766 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı

AbENO açık konformasyonu için öngörülen modelin muhtemel ilaç bağlanma bölgesi (P0) ile 100766 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yavaşlatılmış kompleksi şekil 4.50'de gösterilmiştir.



Şekil 4.50 *AbENO* açık konformasyonu için öngörülen modelin P0 bölgesi ile 100766 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yavaşlatılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.

Oluşturulan sanal kütüphane, *AbENO* kapalı konformasyon için oluşturulan modelin aktif bölgeye ve katalitik loopa en yakın bölge olan P0 bölgesi ile yavaşlatılmıştır [205,207]. 25093 yavaşlatılmış bileşiğin HTVS ile en iyi %30'u, ardından SP skora göre en iyi %20'si ve son basamak olarak XP skora göre en iyi %10'u belirlenmiştir. XP GlideScore'a yavaşlatılmış bileşikler sıraya dizilmiştir ve toplam ligand sayısı 10'a indirilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.8 AbENO kapalı konformasyon için öngörülen PO bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)

PubChem ID	Bileşik adı	XP GScore (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
3068866	N'-ethyl-N'-[3-[(2-methyl-6,13,17-triazatetracyclo[8.7.0.0 ^{3,8} .0 ^{11,16}]heptadeca-1(10),2,4,6,8,11(16),12,14-octaen-7-yl)amino]propyl]propane-1,3-diamine	-9.351	-35.63
122267	(2S)-N-[(2S)-5-(diaminomethylideneamino)-1-oxopentan-2-yl]-1-[(2R)-2-(methylamino)-3-phenylpropanoyl]pyrrolidine-2-carboxamide	-8.551	-45.95
203443	(1S,3R,4S,6R)-4,6-diaminocyclohexane-1,2,3-triol	-8.377	-27.98
6436013	(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(Z)-4-aminobut-2-enyl]-methylamino]methyl]-5-(6-aminopurin-9-yl)oxolane-3,4-diol	-8.257	-33.08
129444	4-amino-6-(2-aminopropyl)benzene-1,3-diol	-7.926	-12.09
77731	N',N'-bis(2-aminoethyl)ethane-1,2-diamine	-7.770	-28.51
100766	(2R,3R,4S,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(1,8-diaminooctan-3-ylsulfanylmethyl)oxolane-3,4-diol	-7.757	-32.21
173406	6-[1-(3,4-dihydroxyphenyl)propan-2-ylamino]-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-2,3-diol	-7.513	-41.87
171251	(2S,3S,4R,5R)-2-(3-aminopropylsulfanylmethyl)-5-(6-aminopurin-9-yl)oxolane-3,4-diol	-7.397	-34.89
72347	[(11-ethyl-6-methyl-5-oxopyrido[2,3-b][1,5]benzodiazepin-6-ium-9-ylidene)hydrazinylidene]azanide	-7.344	-38.84

Tablo 4.7'de yer alan AbENO kapalı konformasyon için öngörülen modelin PO bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri incelendiğinde PubChem ID: 3068866 olan bileşik (N'-ethyl-N'-[3-[(2-methyl-6,13,17-triazatetracyclo[8.7.0.0^{3,8}.0^{11,16}]heptadeca-1(10),2,4,6,8,11(16),12,14-octaen-7-yl)amino]propyl]propane-1,3-diamine) bağlanma afinitesi en yüksek bileşik olarak seçilmiştir. 3068866 numaralı bileşiğin AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan model ile yanaştırılması sonucunda

XP GScore'u -9.351 kcal/mol olarak belirlenmiştir ve MM/GBSA metodolojisine göre serbest bağlanma enerjisi -35.63 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Bioassay aktif 25093 bileşiği kapsayan sanal kütüphane, *AbENO* kapalı konformasyon için oluşturulan modelin muhtemel ilaç bağlanma bölgesi olarak adlandırılan en yüksek ilaç skoruna sahip P3 bölgesi ile sırasıyla GLIDE HTVS, SP ve XP metodolojilerinden yararlanılarak yanaştırılmıştır [205], [207]. Bu yanaştırılmış bileşiklerin HTVS ile en iyi % 30'u, ardından SP skora göre en iyi % 20'si ve son olarak XP skora göre en iyi % 10'u seçilmiştir. XP GlideScore'a yanaştırılmış bileşikler sıraya dizilmiştir ve toplam ligand sayısı 10'a düşürülmüştür (Tablo 4.8).

Tablo 4.8'de yer alan *AbENO* kapalı konformasyon için öngörülen modelin interface bölgesi olan P3 ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri değerlendirildiğinde PubChem ID: 6436013 olan bileşik (2R,3S,4R,5R)-2-[[[(Z)-4-aminobut-2-enyl]-methylamino]methyl]-5-(6-aminopurin-9-yl)oxolane-3,4-diol) bağlanma afinitesi en yüksek ligand olarak seçilmiştir. 6436013 numaralı bileşiğin *AbENO* kapalı konformasyonu için yaratılan model ile yanaştırılması sonucunda XP GScore'u -10.956 kcal/mol olarak belirlenmiştir ve MM/GBSA metodolojisine göre serbest bağlanma enerjisi -40.50 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.9 AbENO kapalı konformasyon için öngörülen modelin P3 muhtemel ilaç bağlanma bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)

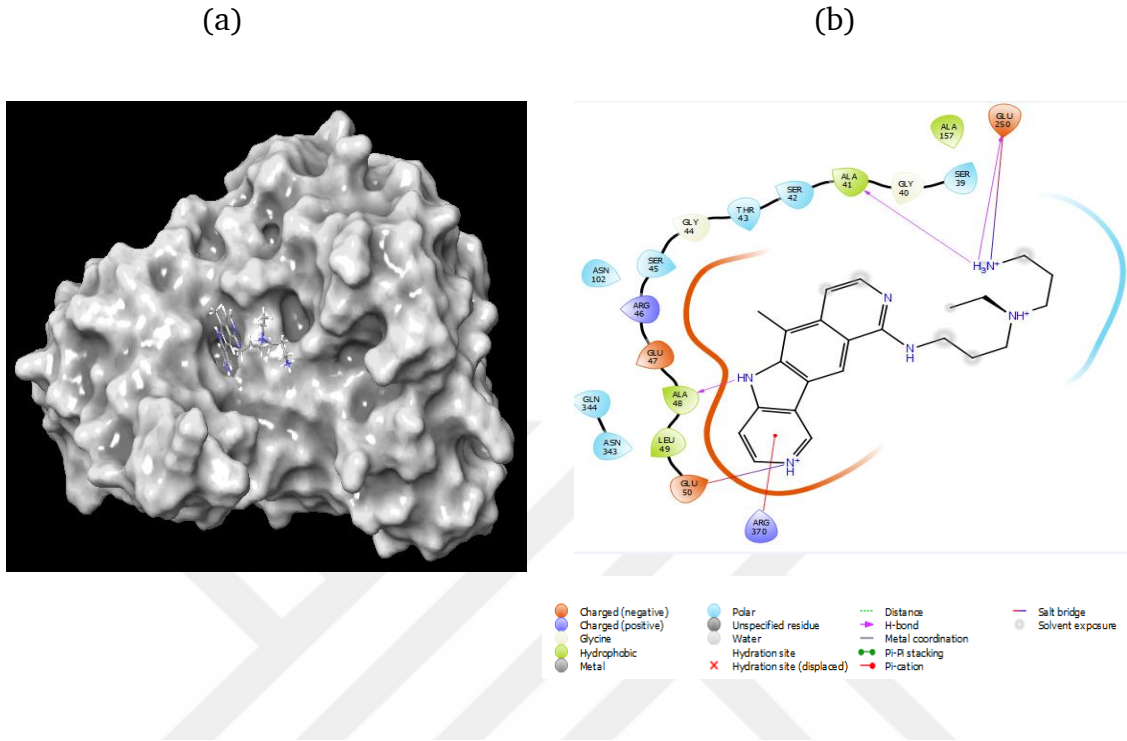
PubChem ID	Bileşik adı	XP GScore (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
6436013	(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(Z)-4-aminobut-2-enyl]-methylamino]methyl]-5-(6-aminopurin-9-yl)oxolane-3,4-diol	-10.956	-40.50
11155874	2-amino-2-[2-[2-chloro-4-(3-phenylmethoxyphenyl)sulfanylphenyl]ethyl]propane-1,3-diol	-9.352	-50.82
129695	N-[3-[4-(3-aminopropylamino)butylamino]propyl]-2-naphthalen-1-ylacetamide	-9.283	-49.17
34755	(2S)-2-amino-4-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-aminopurin-9-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methylmethylsulfonio]butanoate	-8.980	-39.60
9865603	2-amino-4-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-aminopurin-9-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methylmethylsulfonio]butanoate	-8.980	-39.60
3035904	(2S,4R,5R,6R)-6-[(1R)-2-amino-1-hydroxyethyl]-4,5-dihydroxyoxane-2-carboxylic acid	-8.423	-23.80
73529	(2R,3S,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-[(4-methoxypyrimido[5,4-d]pyrimidin-8-yl)amino]oxolane-3,4-diol	-8.107	-27.84
14539800	(2S)-1-[(2S)-1-[(2S,3R)-2-amino-3-hydroxybutanoyl]pyrrolidine-2-carbonyl]-N-[(2S,3R)-1-amino-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl]pyrrolidine-2-carboxamide	-7.976	-26.80
122618	(2S,3R,4S,5R)-2-methylpiperidine-3,4,5-triol	-7.901	-32.71
129874	2-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]triazole-4,5-dicarboxamide	-7.871	-32.85

PubChem ID: 3068866 olan ligandın AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin P0 bölgesi ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler ve 6436013 PubChem numarasına sahip ligandın AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin P3 bölgesi ile yanaştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10 PubChem ID: 3068866 olan ligandın AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin P0 bölgesi ile yanıştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler ve 6436013 PubChem numarasına sahip ligandın AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan modelin P3 bölgesi ile yanıştırılması sonucunda meydana gelen etkileşimler

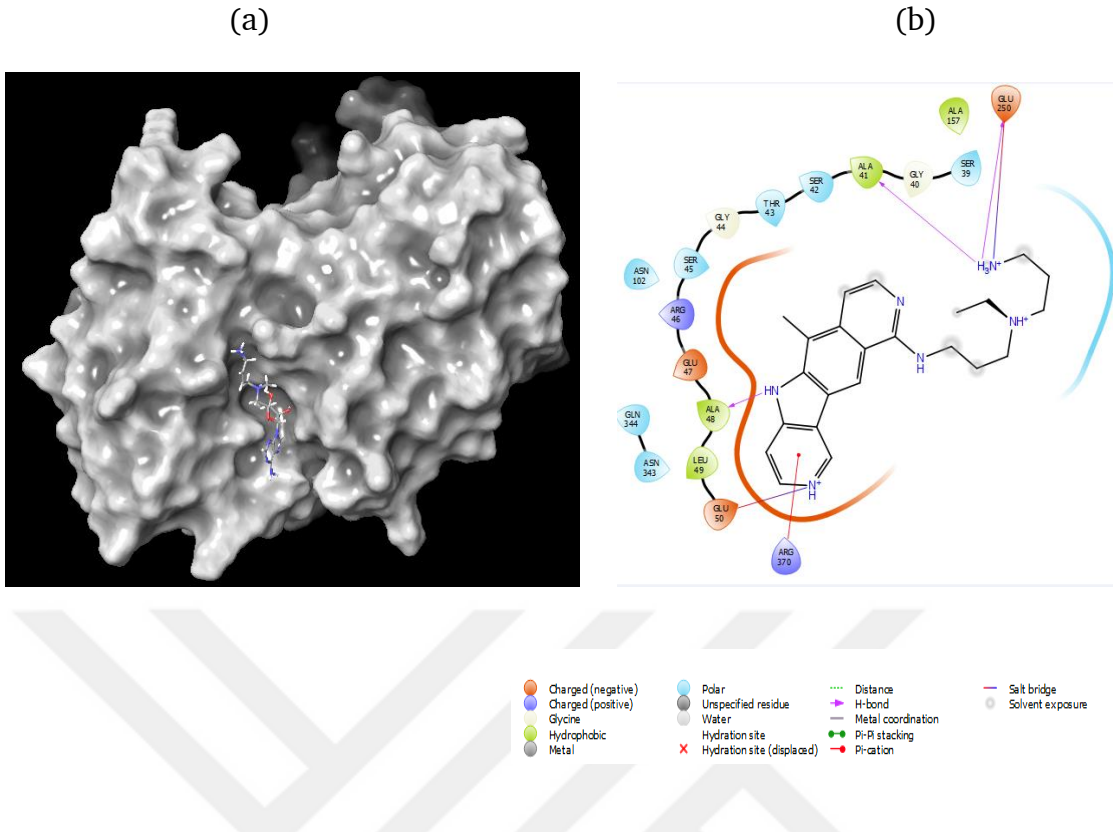
3068866 numaralı ligand ile AbENO kapalı modelin P0 bölgesi arasındaki etkileşim rezidüleri	6436013 numaralı ligand ile AbENO kapalı modelin P3 bölgesi arasındaki etkileşim rezidüleri
Ala157 (hidrofobik etkileşim)	Ile12 (hidrofobik etkileşim)
Ser39 (polar etkileşim)	Thr374 (polar etkileşim)
Gly40 (Glisin)	Glu375 (tuz köprüsü)
Ala41 (Hidrojen bağ)	Asp376 (2 tane Hidrojen bağ) ve (tuz köprüsü)
Glu250 (hidrojen bağ) ve (tuz köprüsü)	Ser377 (polar etkileşim)
Ser42 (polar etkileşim)	Thr378 (polar etkileşim)
Thr43(polar etkileşim)	Ala380 (hidrofobik etkileşim)
Gly44 (Glisin)	Gln407 (polar etkileşim)
Ser45 (polar etkileşim)	Asp381 (Hidrojen bağ)
Arg46 (elektrostatik etkileşim)	Phe131 (hidrofobik etkileşim)
Asn102 (polar etkileşim)	Leu130 (Hidrojen bağ)
Glu47 (elektrostatik etkileşim)	Pro129 (hidrofobik etkileşim)
Ala48 (Hidrojen bağ)	His120 (2 tane pi-pi istiflenmesi), (Hidrojen bağ) ve (pi-katyon)
Leu49 (hidrofobik etkileşim)	Arg34 (elektrostatik etkileşim)
Gln344 (polar etkileşim)	Ala35 (hidrofobik etkileşim)
Asn343 (polar etkileşim)	Cys36 (hidrofobik etkileşim)
Glu50 (tuz köprüsü)	Glu22(Hidrojen bağ)
Arg370 (pi katyon)	

*Ab*ENO kapalı konformasyonu için öngörülen modelin P0 bölgesi ile 3068866 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi Şekil 4.51’de gösterilmiştir.



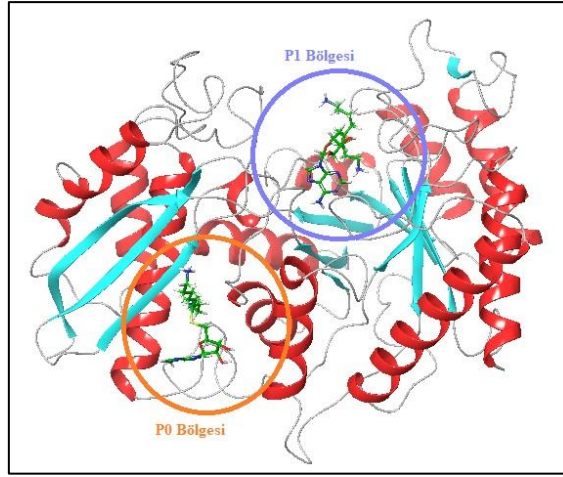
Şekil 4.51 *Ab*ENO kapalı konformasyonu için öngörülen modelin P0 bölgesi ile 3068866 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.

*Ab*ENO kapalı konformasyonu için öngörülen modelin P3 bölgesi ile 6436013 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi Şekil 4.52’de gösterilmiştir.



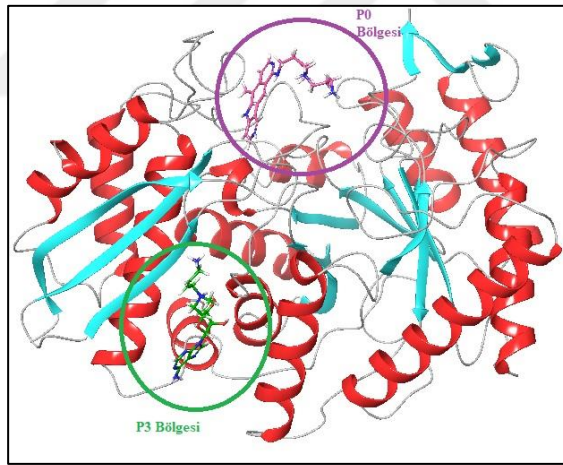
Şekil 4.52 *AbENO* kapalı konformasyonu için öngörülen modelin P3 bölgesi ile 6436013 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin yanaştırılmış kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.

SWISS-MODEL kullanılarak *AbENO* açık konformasyonu için oluşturulan 3B protein modelin P1 ve P0 bölgesi üzerinde, GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri değerlendirilerek en iyi bileşik olarak belirlenen 100766 numaralı bileşiğin gösterimi Şekil 4.53'tedir.



Şekil 4.53 AbENO açık konformasyonun P1 ve P0 bölgesi üzerinde en iyi bağlanma afinitesi gösteren 100766 numaralı bileşiğin gösterimi.

SWISS-MODEL ile AbENO kapalı konformasyonu için oluşturulan protein modelin P0 ve P3 bölgesi üzerinde, GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri değerlendirilerek en iyi bileşik olarak belirlenen sırasıyla 3068866 ve 6436013 numaralı bileşiklerin gösterimi Şekil 4.54'te sunulmuştur.



Şekil 4.54 AbENO kapalı konformasyonun P0 ve P3 bölgesi üzerinde en iyi bağlanma afinitesi gösteren sırasıyla 3068866 ve 6436013 numaralı bileşiklerin gösterimi.

Yapılan *in silico* çalışmalar sonucunda AbENO açık ve kapalı konformasyonu için oluşturulan homoloji modeller üzerinde ilaç adayı olarak belirlenen bu bileşiklerin daha sonra gerçekleştirilecek olan çalışmalarda daha ileri düzeyde analiz edilmesi gerektiği öngörülmektedir.

4.2 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler

Bu tez kapsamında; ileri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanmak amacıyla, literatürde ilk defa olmak üzere *A. baumannii* enolaz geni klonlanmıştır ve *A. baumannii* enolazının açık ve kapalı konformasyonları için homoloji modelleme ile yapısal karakterizasyonu yapılmış ve moleküler yanaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının klonlama basamağında ilk olarak, *A. baumannii* enolaz enzimini kodlayan genin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada verimli bir PCR gerçekleştirilebilmesi için farklı PCR bileşenlerinde çok sayıda optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon gerçekleştirildikten sonra enolaz geni pGEM®-T Easy Vektör sistemine klonlanmıştır. Ardından *Escherichia coli* BL21(DE3) hücrelerinde enolaz enzimin ekspresyonunun yapılması amacıyla pLATE 31 vektörüne bu genin alt klonlaması yapılmıştır ve transformasyon işlemi bu hücrelere gerçekleştirilmiştir. Bu klonlama basamaklarının ardından, DNA dizileme işlemi yapılmıştır. DNA dizileme sonucu analiz edildiğinde; çerçeve kayması mutasyonunun meydana geldiği gözlemlenmiştir. Klonlanan DNA parçasının *A. baumannii* Enolaz geni olmasına rağmen mutasyonun meydana geldiği yerden itibaren açık okuma çerçevesi kaymıştır ve bu nedenle *A. baumannii* enolaz geni ifade edilemeyip enolaz proteini üretilmemiştir. Böyle bir mutasyonun meydana gelme sebebinin primer sentez aşamasında gerçekleşen bir sorun olduğu düşünülmektedir.

AbENO'nun yapısal özelliklerinin belirlenebilmesi için ilk olarak protein dizi analizi yapılmıştır. Bu analiz neticesinde literatürde yer alan bilgilerden faydalanılarak [241,243,246,261]belirlenen Ala41, Ser42, His158, Gln166, Glu167, Glu208, Asp245, Glu289, Asp316, Lys341, His369, Arg370, Ser371, Lys392 rezidülerinin katalitik rezidüler olduğu saptanmıştır.

Tez kapsamında *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için gerçekleştirilen homoloji modelleme çalışmaları sonucunda elde edilen 3 boyutlu protein modellerde bir hareketli halka bölgesi gözlemlenmiştir. Daha önce maya ve *Theileria annulata* enolazı üzerinde yapılan çalışmalar referans alınarak

AbENO'daki bu hareketli halka bölgesinin *T. annulata* enolazının halka 1 bölgesi olabileceği öngörülmektedir [243,246,248].

AbENO H.sapiens kas enolazı [244] ile karşılaştırıldığında çeşitli peptid ve dipeptid insersiyonları gözlemlendi. S2, G33, Q140, G237, D239 ve F267 peptid insersiyonları iken (₃₀₆IL₃₀₇) dipeptid insersiyonudur. İnsersiyonların yanı sıra peptid, dipeptid ve pentapeptid delesyonları gözlemlenmiştir. D143 peptid delesyonu iken (₈₁KL₈₂) ile (₁₉₈YG₁₉₉) gözlemlenen dipeptid delesyonlarıdır. Bu delesyonlara ek olarak bir tane pentapeptid delesyonu (₂₆₂FKSPD₂₆₆) gözlemlenmiştir. Belirlenen insersiyon ve delesyon bölgelerinin fonksiyonları ileriki çalışmalarda analiz edilmelidir.

Ayrıca *Streptococcus pneumoniae*'nin yüzeyinde eksprese edilen, (₂₄₉FYDKERKQVD₂₅₇) spesifik dizisine sahip olan enolazın bir hücre yüzey reseptörü oluşturduğu gösterilmiştir [247]. Enolaz bu işlevi sayesinde konak plazminojen bağlanmasında görev almaktadır. *AbENO* için bu bölge analiz edildiğinde (₂₅₁FYKNGQYI₂₅₈) spesifik dizisinin varlığı gözlemlenmiştir. Bu bölge plazminojen bağlanma bölgesidir. *S. pneumoniae* plazminojen bağlanma bölgesi ile karşılaştırıldığında iki aminoasitlik delesyon gözlemlenmiştir [247].

Tez çalışması kapsamında; bilgisayar destekli ilaç tasarımı aşamasının ilk basamağında; *A. baumannii* enolazının açık ve kapalı konformasyonları için homoloji modelleri MODELLER v9.15 ve SWISS-MODEL programları kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan homoloji modellerin geometri optimizasyonu, validasyonu ve doğruluğu farklı web sunucuları kullanılarak analiz edilmiştir. Enzimin açık ve kapalı konformasyonları için 3B yapısı belirlenmiştir. İki farklı program ile oluşturulan modeller değerlendirilmiştir ve *AbENO* açık ve kapalı konformasyonu için SWISS-MODEL programı kullanılarak oluşturulan modeller ile moleküler yanıştırma çalışmalarına devam edilmiştir.

Homoloji modelleme ile *AbENO* açık ve kapalı konformasyonları için oluşturulan 3B modellerin muhtemel ilaç bağlanma cepleri DoGSiteScorer programı kullanılarak belirlenmiştir. PubChem veri bankası kullanılarak elde edilen 25093 biyoassay aktif bileşiğin oluşturduğu sanal kütüphane, *AbENO* açık ve kapalı konformasyon için DoGSiteScorer programı ile seçilen toplam dört bölgeye karşı

Schrödinger Glide HTVS, SP ve XP yanaştırma metodolojilerine göre taranmıştır. Yanaştırılmış bileşikler Glide Extra Precision (XP) skorlama fonksiyonu ile sıralanmıştır. Yüksek bağlanma afinitesi gösteren 10 tane ligand seçilmiştir. XP skorlama sırasına göre açık konformasyon için oluşturulan modelin aktif bölgesi (P0 bölgesi) ve en yüksek ilaç skoruna sahip muhtemel ilaç bağlanma (P1 bölgesi) bölgesi için 100766 Pubchem numaralı bileşik bağlanma afinitesi en yüksek bileşik olarak seçilmiştir. Kapalı konformasyon için oluşturulan modelin aktif bölgeye en yakın bölgesi olan P1 bölgesi için 3068866 Pubchem numaralı bileşik seçilirken, en yüksek ilaç skoruna sahip P3 bölgesi için ise 6436013 Pubchem numaralı bileşik bağlanma afinitesi en iyi bileşik olarak seçilmiştir.

Tez çalışmasında yapılan çalışmalar sonucu elde edilen tüm bu sonuçlar ışığında; yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımı temel alınarak yeni görüşler oluşturulabilecek ve enolaz *Acinetobacter baumannii*'nin sebep olduğu enfeksiyonları baskılamak için aday olabilecektir. Yapılan tez çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar doğrultusunda;

- Gerçekleştirilen tez çalışmasının klonlama basamaklarının ardından, DNA dizileme işlemi gerçekleştirildiğinde; genin nükleotid dizisinde çerçeve kayması mutasyonu meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle *AbENO* genine spesifik primerler tekrardan sentezlenerek genin yeniden klonlanması ve *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonun gerçekleştirilmesi,
- *AbENO* geninin ifade edilerek enzim aktivite testlerinin yapılması ve *AbENO* aktivitesinin onaylanması,
- *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edilen *AbENO* geninin ifade edilerek inhibitör test çalışmalarında kullanmak amacıyla proteinin saf olarak elde edilmesi ve karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi,
- Potansiyel inhibitör olabileceği tahmin edilen ligandlar (100766, 3068866, 6436013) ile moleküler dinamik simülasyon çalışmalarının

gerçekleştirilmesi ve *in vitro* inhibisyon çalışmalarının yapılarak enzimin aktivitesi üzerindeki rolünün saptanması,

- Konak ve *A. baumannii* enolazı ile gerçekleştirilen nükleotid dizi hizalamaları değerlendirilerek; AbENO enziminin saptanan aminoasit dizisi farklılıkların enzimin aktivitesine ne derecede etki ettiği mutasyon analizleri gerçekleştirilerek araştırılması önerilmektedir.
- AbENO'nun 3 boyutlu yapısı X-ışınları kristalografisi yöntemi ile belirlenmelidir.
- AbENO inhibitörleri olarak seçilen bileşiklerin (100766, 3068866, 6436013) bağlanma bölgelerinin peptid dizileri MALDI-TOF analizi ile belirlenmelidir.
- AbENO inhibitörleri olarak seçilen bileşikler ile hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilerek bu bileşiklerin klinik öncesi analizleri yapılmalıdır.
- Klinik öncesi çalışmaların başarılı olması durumunda bu seçilen inhibitörler deney hayvanları üzerinde denenerek *in vivo* analizleri yapılmalıdır.

- [1] M. E. Falagas ve P. I. Rafailidis, "Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue," *Critical care*, vol. 11, p. 134, 2007.
- [2] L. S. Munoz-Price ve R. A. Weinstein, "Acinetobacter infection," *New England Journal of Medicine*, vol. 358, pp. 1271-1281, 2008.
- [3] J. Garnacho-Montero ve R. Amaya-Villar, "Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management," *Current opinion in infectious diseases*, vol. 23, pp. 332-339, 2010.
- [4] J.-L. Vincent, J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, C. D. Martin, vd., "International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units," *Jama*, vol. 302, pp. 2323-2329, 2009.
- [5] G. M. Eliopoulos, L. L. Maragakis ve T. M. Perl, "Acinetobacter baumannii: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options," *Clinical infectious diseases*, vol. 46, pp. 1254-1263, 2008.
- [6] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D. L. Monnet, vd., "Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 18, pp. 318-327, 2018.
- [7] S. Myers ve A. Baker, "Drug discovery—an operating model for a new era," *Nature biotechnology*, vol. 19, p. 727, 2001.
- [8] C. Shekhar, "In silico pharmacology: computer-aided methods could transform drug development," *Chemistry & biology*, vol. 15, pp. 413-414, 2008.
- [9] L. Chen, J. K. Morrow, H. T. Tran, S. S. Phatak, L. Du-Cuny ve S. Zhang, "From laptop to benchtop to bedside: structure-based drug design on protein targets," *Current pharmaceutical design*, vol. 18, pp. 1217-1239, 2012.
- [10] M. Kannisto, T. Aho, M. Karp ve V. Santala, "Metabolic engineering of *Acinetobacter baylyi* ADP1 for improved growth on gluconate and glucose," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, pp. 7021-7027, 2014.
- [11] À. Díaz-Ramos, A. Roig-Borrellas, A. García-Melero ve R. López-Alemaný, " α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations," *BioMed Research International*, vol. 2012, 2012.
- [12] M. Esgleas, Y. Li, M. A. Hancock, J. Harel, J. D. Dubreuil ve M. Gottschalk, "Isolation and characterization of α -enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*," *Microbiology*, vol. 154, pp. 2668-2679, 2008.
- [13] A. Redlitz, B. J. Fowler, E. F. Plow ve L. A. Miles, "The role of an enolase related molecule in plasminogen binding to cells," *European Journal of Biochemistry*, vol. 227, pp. 407-415, 1995.
- [14] M. T. Muhammed ve E. AkiYalcin, "Homology modeling in drug discovery: overview, current applications, and future perspectives," *Chemical biology & drug design*, vol. 93, pp. 12-20, 2019.
- [15] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei ve M. Cui, "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery," *Current computer-aided drug design*, vol. 7, pp. 146-157, 2011.
- [16] F. López-Vallejo, T. Caulfield, K. Martínez-Mayorga, M. A. Giulianotti, A. Nefzi, R. A. Houghten, vd., "Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery," *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol. 14, pp. 475-487, 2011.

- [17] A. Howard, M. O'Donoghue, A. Feeney ve R. D. Sleator, "Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen," *Virulence*, vol. 3, pp. 243-250, 2012.
- [18] J. Brisou ve A. Prevot, "Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group," in *Annales de l'Institut Pasteur*, 1954, pp. 722-728.
- [19] S. B. Almasaudi, "Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 25, pp. 586-596, 2018.
- [20] H. J. Doughari, P. A. Ndakidemi, I. S. Human ve S. Benade, "The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview," *Microbes and environments*, pp. 1103150282-1103150282, 2009.
- [21] B. Kurcuk-Trajkovska, "Acinetobacter spp.-A serious enemy threatening hospitals worldwide," *Macedonian Journal of Medical Sciences*, vol. 2, pp. 157-162, 2009.
- [22] A. Y. Peleg, H. Seifert ve D. L. Paterson, "Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen," *Clinical microbiology reviews*, vol. 21, pp. 538-582, 2008.
- [23] <https://www.schrodinger.com/prime>. Erişim Tarihi:10 Eylül 2019.
- [24] P. Visca, H. Seifert ve K. J. Towner, "Acinetobacter infection—an emerging threat to human health," *IUBMB life*, vol. 63, pp. 1048-1054, 2011.
- [25] H. Seifert, L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg ve M. Vaneechoutte, "Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods," *Journal of clinical microbiology*, vol. 35, pp. 2819-2825, 1997.
- [26] K. Towner, "Acinetobacter: an old friend, but a new enemy," *Journal of Hospital Infection*, vol. 73, pp. 355-363, 2009.
- [27] L. Dijkshoorn, A. Nemec ve H. Seifert, "An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii," *Nature reviews microbiology*, vol. 5, p. 939, 2007.
- [28] A. Al Atrouni, M.L. Joly-Guillou, M. Hamze ve M. Kempf, "Reservoirs of non-baumannii Acinetobacter species," *Frontiers in microbiology*, vol. 7, p. 49, 2016.
- [29] S. Chusri, V. Chongsuvivatwong, J. I. Rivera, K. Silpapojakul, K. Singkhamanan, E. McNeil, vd., "Clinical outcomes of hospital-acquired infection with Acinetobacter nosocomialis and Acinetobacter pittii," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 58, pp. 4172-4179, 2014.
- [30] L. Antunes, P. Visca ve K. J. Towner, "Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen," *Pathogens and disease*, vol. 71, pp. 292-301, 2014.
- [31] I. Roca Subirà, P. Espinal, X. Vila-Farrés ve J. Vila Estapé, "The Acinetobacter baumannii oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace," *Frontiers in microbiology*, vol. 3, p. 148, 2012.
- [32] M. J. McConnell, L. Actis ve J. Pachón, "Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models," *FEMS microbiology reviews*, vol. 37, pp. 130-155, 2013.
- [33] H. Wisplinghoff, W. Perbix ve H. Seifert, "Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to Acinetobacter baumannii: a case-control study of adult burn patients," *Clinical infectious diseases*, vol. 28, pp. 59-66, 1999.
- [34] W. Chang, C. Lu, C. Huang ve Y. Chuang, "Community-acquired Acinetobacter meningitis in adults," *Infection*, vol. 28, pp. 395-397, 2000.
- [35] M. Falagas, E. Karveli, I. Kelesidis ve T. Kelesidis, "Community-acquired Acinetobacter infections," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 26, pp. 857-868, 2007.

- [36] C. M. Harding, S. W. Hennon ve M. F. Feldman, "Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, p. 91, 2018.
- [37] S. S. Magill, J. R. Edwards, W. Bamberg, Z. G. Beldavs, G. Dumyati, M. A. Kainer, vd., "Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections," *New England Journal of Medicine*, vol. 370, pp. 1198-1208, 2014.
- [38] S. H. Lob, D. J. Hoban, D. F. Sahm ve R. E. Badal, "Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 47, pp. 317-323, 2016.
- [39] A. Giammanco, C. Calà, T. Fasciana ve M. J. Dowzicky, "Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial," *Mosphere*, vol. 2, pp. e00310-16, 2017.
- [40] M. E. de Kraker, A. J. Stewardson ve S. Harbarth, "Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?," *PLoS medicine*, vol. 13, p. e1002184, 2016.
- [41] R. Xie, X. D. Zhang, Q. Zhao, B. Peng ve J. Zheng, "Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries," *Emerging microbes & infections*, vol. 7, pp. 1-10, 2018.
- [42] E. Tasina, A.-B. Haidich, S. Kokkali ve M. Arvanitidou, "Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of infectious diseases: a meta-analysis," *The Lancet infectious diseases*, vol. 11, pp. 834-844, 2011.
- [43] W. Ni, Y. Han, J. Zhao, C. Wei, J. Cui, R. Wang, vd., "Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 47, pp. 107-116, 2016.
- [44] A. Potron, L. Poirel ve P. Nordmann, "Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 45, pp. 568-585, 2015.
- [45] R. L. Nation, J. Li, O. Cars, W. Couet, M. N. Dudley, K. S. Kaye, vd., "Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus," *The Lancet infectious diseases*, vol. 15, pp. 225-234, 2015.
- [46] Z. A. Qureshi, L. E. Hittle, J. A. O'Hara, J. I. Rivera, A. Syed, R. K. Shields, vd., "Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance," *Clinical infectious diseases*, vol. 60, pp. 1295-1303, 2015.
- [47] M.-F. Lin ve C.-Y. Lan, "Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside," *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, vol. 2, p. 787, 2014.
- [48] J. H. Jeon, J. H. Lee, J. J. Lee, K. S. Park, A. M. Karim, C.-R. Lee, vd., "Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance," *International journal of molecular sciences*, vol. 16, pp. 9654-9692, 2015.
- [49] Y. Doi, G. L. Murray ve A. Y. Peleg, "Acinetobacter baumannii: evolution of antimicrobial resistance—treatment options," in *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 2015, pp. 085-098.
- [50] M. Hornsey, M. J. Ellington, M. Doumith, C. P. Thomas, N. C. Gordon, D. W. Wareham, vd., "AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic

- clones of *Acinetobacter baumannii*," *Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 65, pp. 1589-1593, 2010.
- [51] Y. Cai, D. Chai, R. Wang, B. Liang ve N. Bai, "Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies," *Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 67, pp. 1607-1615, 2012.
- [52] X. Chen, K. Schreiber, J. Appel, A. Makowka, B. Fährnich, M. Roettger, vd., "The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, pp. 5441-5446, 2016.
- [53] N. C. Soares, M. P. Cabral, J. R. Parreira, C. Gayoso, M. J. Barba ve G. Bou, "2-DE analysis indicates that *Acinetobacter baumannii* displays a robust and versatile metabolism," *Proteome science*, vol. 7, p. 37, 2009.
- [54] P. Baumann, M. Doudoroff ve R. Stanier, "A study of the *Moraxella* group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*)," *Journal of bacteriology*, vol. 95, pp. 1520-1541, 1968.
- [55] W. H. Taylor ve E. Juni, "Pathways For Biosynthesis Of A Bacterial Capsular Polysaccharide : Carbohydrate Metabolism and Terminal Oxidation Mechanisms of a Capsule-Producing Coccus1," *Journal of bacteriology*, vol. 81, p. 694, 1961.
- [56] A.-M. Cleton-Jansen, N. Goosen, G. Odle ve P. Van de Putte, "Nucleotide sequence of the gene coding for quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*," *Nucleic acids research*, vol. 16, p. 6228, 1988.
- [57] A. Cleton-Jansen, N. Goosen, O. Fayet ve P. Van de Putte, "Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase," *Journal of bacteriology*, vol. 172, pp. 6308-6315, 1990.
- [58] D. Vallenet, P. Nordmann, V. Barbe, L. Poirel, S. Mangenot, E. Bataille, vd., "Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles," *PloS one*, vol. 3, p. e1805, 2008.
- [59] A. J. Wolfe, "Glycolysis for the microbiome generation," *Microbiology spectrum*, vol. 3, 2015.
- [60] K. Kersters ve J. De Ley, "The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 34, pp. 393-408, 1968.
- [61] M. Dolin ve E. Juni, "Utilization of oxalacetate by *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for coupling between malic enzyme and malic dehydrogenase," *Journal of bacteriology*, vol. 133, pp. 786-793, 1978.
- [62] V. Pancholi, "Multifunctional α -enolase: its role in diseases," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, vol. 58, pp. 902-920, 2001.
- [63] M. Piast, I. Kustrzeba-Wójcicka, M. Matusiewicz ve T. Banas, "Molecular evolution of enolase," *Acta Biochimica Polonica-English Edition-*, vol. 52, p. 507, 2005.
- [64] J. M. Brewer ve G. Weber, "The effect of magnesium on some physical properties of yeast enolase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 241, pp. 2550-2557, 1966.
- [65] L. D. Faller, B. M. Baroudy, A. M. Johnson ve R. X. Ewall, "Magnesium ion requirements for yeast enolase activity," *Biochemistry*, vol. 16, pp. 3864-3869, 1977.
- [66] M. A. Isgrò, P. Bottoni ve R. Scatena, "Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects," in *Advances in Cancer Biomarkers*, ed: Springer, 2015, pp. 125-143.
- [67] P. Marangos, A. Parma ve F. Goodwin, "Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase," *Journal of neurochemistry*, vol. 31, pp. 727-732, 1978.

- [68] M. Capello, S. Ferri-Borgogno, P. Cappello ve F. Novelli, " α -enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target," *The FEBS journal*, vol. 278, pp. 1064-1074, 2011.
- [69] M. Kitamura, Y. Takayama, S. Kojima, K. Kohno, H. Ogata, Y. Higuchi, vd., "Cloning and expression of the enolase gene from *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F)," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, vol. 1676, pp. 172-181, 2004.
- [70] L. Fletcher, C. Rider ve C. Taylor, "Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 452, pp. 245-252, 1976.
- [71] J. P. Holland, L. Labieniec, C. Swimmer ve M. Holland, "Homologous nucleotide sequences at the 5'termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. The primary structure of a third yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, pp. 5291-5299, 1983.
- [72] A. Giallongo, D. Oliva, L. Cali, G. Barba, G. Barbieri ve S. Feo, "Structure of the human gene for α -enolase," *European Journal of Biochemistry*, vol. 190, pp. 567-573, 1990.
- [73] S. Y. Ryu, G. U. Hong, D. Y. Kim ve J. Y. Ro, "Enolase 1 and calreticulin regulate the differentiation and function of mouse mast cells," *Cellular signalling*, vol. 24, pp. 60-70, 2012.
- [74] E. Georges, A.-M. Bonneau ve P. Prinos, "RNAi-mediated knockdown of α -enolase increases the sensitivity of tumor cells to antitubulin chemotherapeutics," *International journal of biochemistry and molecular biology*, vol. 2, p. 303, 2011.
- [75] D. S. Ucker, M. R. Jain, G. Pattabiraman, K. Palasiewicz, R. B. Birge ve H. Li, "Externalized glycolytic enzymes are novel, conserved, and early biomarkers of apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, pp. 10325-10343, 2012.
- [76] S. Feo, D. Arcuri, E. Piddini, R. Passantino ve A. Giallongo, "ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1)," *FEBS letters*, vol. 473, pp. 47-52, 2000.
- [77] L. A. Miles, C. M. Dahlberg, J. Plescia, J. Felez, K. Kato ve E. F. Plow, "Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of α -enolase as a candidate plasminogen receptor," *Biochemistry*, vol. 30, pp. 1682-1691, 1991.
- [78] P. A. Fontán, V. Pancholi, M. M. Nociari ve V. A. Fischetti, "Antibodies to streptococcal surface enolase react with human α -enolase: implications in poststreptococcal sequelae," *The Journal of infectious diseases*, vol. 182, pp. 1712-1721, 2000.
- [79] T. Merkulova, L. Thornell, G. Butler-Browne, C. Oberlin, M. Lucas, N. Lamande, vd., "The β enolase subunit displays three different patterns of microheterogeneity in human striated muscle," *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, vol. 20, pp. 55-63, 1999.
- [80] Y. Kuramitsu ve K. Nakamura, "Hepatitis C Virus-Related Human Hepatocellular Carcinoma: Predictive Markers Using Proteomic Analysis (Methodology)," in *Liver Cancer*, ed: Springer, 2009, pp. 343-350.
- [81] A. K. Dudani, C. Cummings, S. Hashemi ve P. R. Ganz, "Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells," *Thrombosis research*, vol. 69, pp. 185-196, 1993.

- [82] J.w. Kim ve C. V. Dang, "Multifaceted roles of glycolytic enzymes," Trends in biochemical sciences, vol. 30, pp. 142-150, 2005.
- [83] S. Agarwal, P. Kulshreshtha, D. B. Mukku ve R. Bhatnagar, " α -Enolase binds to human plasminogen on the surface of Bacillus anthracis," Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, vol. 1784, pp. 986-994, 2008.
- [84] S. Bergmann, M. Rohde, G. S. Chhatwal ve S. Hammerschmidt, " α -Enolase of Streptococcus pneumoniae is a plasmin (ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface," Molecular microbiology, vol. 40, pp. 1273-1287, 2001.
- [85] C. Castaldo, V. Vastano, R. A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, vd., "Surface displaced alfa-enolase of Lactobacillus plantarum is a fibronectin binding protein," Microbial cell factories, vol. 8, p. 14, 2009.
- [86] I. Veiga-Malta, M. Duarte, M. Dinis, D. Tavares, A. Videira ve P. Ferreira, "Enolase from Streptococcus sobrinus is an immunosuppressive protein," Cellular microbiology, vol. 6, pp. 79-88, 2004.
- [87] C. R. Carneiro, E. Postol, R. Nomizo, L. F. Reis ve R. R. Brentani, "Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of Staphylococcus aureus," Microbes and Infection, vol. 6, pp. 604-608, 2004.
- [88] H. Moses, E. R. Dorsey, D. H. Matheson ve S. O. Thier, "Financial anatomy of biomedical research," Jama, vol. 294, pp. 1333-1342, 2005.
- [89] V. Lobanov, "Using artificial neural networks to drive virtual screening of combinatorial libraries," Drug Discovery Today: BIOSILICO, vol. 2, pp. 149-156, 2004.
- [90] C. M. Song, S. J. Lim ve J. C. Tong, "Recent advances in computer-aided drug design," Briefings in bioinformatics, vol. 10, pp. 579-591, 2009.
- [91] G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler ve E. W. Lowe, "Computational methods in drug discovery," Pharmacological reviews, vol. 66, pp. 334-395, 2014.
- [92] S. P. Leelananda ve S. Lindert, "Computational methods in drug discovery," Beilstein journal of organic chemistry, vol. 12, pp. 2694-2718, 2016.
- [93] S. J. Y. Macalino, V. Gosu, S. Hong ve S. Choi, "Role of computer-aided drug design in modern drug discovery," Archives of pharmacal research, vol. 38, pp. 1686-1701, 2015.
- [94] C. Acharya, A. Coop, J. E Polli ve A. D MacKerell, "Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach," Current computer-aided drug design, vol. 7, pp. 10-22, 2011.
- [95] A. C. Anderson, "The process of structure-based drug design," Chemistry & biology, vol. 10, pp. 787-797, 2003.
- [96] V. Mountain, "Astex, Structural Genomix, and Syrrx. I can see clearly now: structural biology and drug discovery," Chemistry & biology, vol. 10, pp. 95-98, 2003.
- [97] B. L. Staker, G. W. Buchko ve P. J. Myler, "Recent contributions of structure-based drug design to the development of antibacterial compounds," Current opinion in microbiology, vol. 27, pp. 133-138, 2015.
- [98] S. Kalyanamoorthy ve Y.P. P. Chen, "Structure-based drug design to augment hit discovery," Drug discovery today, vol. 16, pp. 831-839, 2011.
- [99] E. Lionta, G. Spyrou, D. K Vassilatis ve Z. Cournia, "Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances," Current topics in medicinal chemistry, vol. 14, pp. 1923-1938, 2014.
- [100] A. Lavecchia ve C. Di Giovanni, "Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review," Current medicinal chemistry, vol. 20, pp. 2839-2860, 2013.

- [101] G. Schneider ve U. Fechner, "Computer-based de novo design of drug-like molecules," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 4, p. 649, 2005.
- [102] M. A. Grant, "Protein structure prediction in structure-based ligand design and virtual screening," *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, vol. 12, pp. 940-960, 2009.
- [103] T. Katsila, G. A. Spyroulias, G. P. Patrinos ve M.-T. Matsoukas, "Computational approaches in target identification and drug discovery," *Computational and structural biotechnology journal*, vol. 14, pp. 177-184, 2016.
- [104] E. Krieger, K. Joo, J. Lee, J. Lee, S. Raman, J. Thompson, vd., "Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 77, pp. 114-122, 2009.
- [105] H. M. Berman, G. J. Kleywegt, H. Nakamura ve J. L. Markley, "The Protein Data Bank archive as an open data resource," *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 28, pp. 1009-1014, 2014.
- [106] N. R. Coordinators, "Database resources of the national center for biotechnology information," *Nucleic acids research*, vol. 41, pp. D8-D20, 2012.
- [107] M. Levitt, "Growth of novel protein structural data," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, pp. 3183-3188, 2007.
- [108] C. N. Cavasotto ve S. S. Phatak, "Homology modeling in drug discovery: current trends and applications," *Drug discovery today*, vol. 14, pp. 676-683, 2009.
- [109] M. Baker, "Making membrane proteins for structures: a trillion tiny tweaks," ed: Nature Publishing Group, 2010.
- [110] T. Werner, M. B. Morris, S. Dastmalchi ve W. B. Church, "Structural modelling and dynamics of proteins for insights into drug interactions," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pp. 323-343, 2012.
- [111] T. Cheng, Q. Li, Z. Zhou, Y. Wang ve S. H. Bryant, "Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review," *The AAPS journal*, vol. 14, pp. 133-141, 2012.
- [112] P. W. Rose, A. Prlić, A. Altunkaya, C. Bi, A. R. Bradley, C. H. Christie, vd., "The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information," *Nucleic acids research*, p. gkw1000, 2016.
- [113] B. Rost ve C. Sander, "Bridging the protein sequence-structure gap by structure predictions," *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, vol. 25, pp. 113-136, 1996.
- [114] J. Peng, "Statistical inference for template-based protein structure prediction," arXiv preprint arXiv:1306.4420, 2013.
- [115] A. Saxena, R. S. Sangwan ve S. Mishra, "Fundamentals of homology modeling steps and comparison among important bioinformatics tools: An overview," *Sci. Int*, vol. 1, pp. 237-252, 2013.
- [116] J. A. Dalton ve R. M. Jackson, "An evaluation of automated homology modelling methods at low target-template sequence similarity," *Bioinformatics*, vol. 23, pp. 1901-1908, 2007.
- [117] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, vd., "Clustal W and Clustal X version 2.0," *bioinformatics*, vol. 23, pp. 2947-2948, 2007.
- [118] C. Notredame, D. G. Higgins ve J. Heringa, "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment," *Journal of molecular biology*, vol. 302, pp. 205-217, 2000.

- [119] O. O'Sullivan, K. Suhre, C. Abergel, D. G. Higgins ve C. Notredame, "3DCoffee: combining protein sequences and structures within multiple sequence alignments," *Journal of molecular biology*, vol. 340, pp. 385-395, 2004.
- [120] R. C. Edgar, "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST," *Bioinformatics*, vol. 26, pp. 2460-2461, 2010.
- [121] P. A. Bates, L. A. Kelley, R. M. MacCallum ve M. J. Sternberg, "Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 45, pp. 39-46, 2001.
- [122] T. R. Kim, S. Oh, J. S. Yang, S. Lee, S. Shin ve J. Lee, "A simplified homology-model builder toward highly protein-like structures: An inspection of restraining potentials," *Journal of computational chemistry*, vol. 33, pp. 1927-1935, 2012.
- [123] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp ve T. Schwede, "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling," *Bioinformatics*, vol. 22, pp. 195-201, 2006.
- [124] M. Levitt, "Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching," *Journal of molecular biology*, vol. 226, pp. 507-533, 1992.
- [125] A. Šali ve T. L. Blundell, "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints," *Journal of molecular biology*, vol. 234, pp. 779-815, 1993.
- [126] B. K. Kuntal, P. Aparoy ve P. Reddanna, "EasyModeller: A graphical interface to MODELLER," *BMC research notes*, vol. 3, p. 226, 2010.
- [127] B. Wallner ve A. Elofsson, "All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs," *Protein Science*, vol. 14, pp. 1315-1327, 2005.
- [128] A. Kryshtafovych, B. Monastyrskyy, K. Fidelis, J. Moult, T. Schwede ve A. Tramontano, "Evaluation of the template-based modeling in CASP12," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 86, pp. 321-334, 2018.
- [129] J. C. Almagro, M. P. Beavers, F. Hernandez-Guzman, J. Maier, J. Shaulsky, K. Butenhof, vd., "Antibody modeling assessment," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 79, pp. 3050-3066, 2011.
- [130] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass ve M. J. Sternberg, "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis," *Nature protocols*, vol. 10, p. 845, 2015.
- [131] D. Sindhikara, S. A. Spronk, T. Day, K. Borrelli, D. L. Cheney ve S. L. Posy, "Improving accuracy, diversity, and speed with prime macrocycle conformational sampling," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 57, pp. 1881-1894, 2017.
- [132] S. Kmiecik, D. Gront, M. Kolinski, L. Wieteska, A. E. Dawid ve A. Kolinski, "Coarse-grained protein models and their applications," *Chemical reviews*, vol. 116, pp. 7898-7936, 2016.
- [133] R. E. Bruccoleri, "Application of systematic conformational search to protein modeling," *Molecular simulation*, vol. 10, pp. 151-174, 1993.
- [134] V. Vyas, R. Ukawala, M. Ghate ve C. Chintha, "Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives," *Indian journal of pharmaceutical sciences*, vol. 74, p. 1, 2012.
- [135] R. Samudrala ve J. Moult, "Determinants of side chain conformational preferences in protein structures," *Protein engineering*, vol. 11, pp. 991-997, 1998.
- [136] G. G. Krivov, M. V. Shapovalov ve R. L. Dunbrack Jr, "Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 77, pp. 778-795, 2009.

- [137] J. Zhu, H. Fan, X. Periole, B. Honig ve A. E. Mark, "Refining homology models by combining replica-exchange molecular dynamics and statistical potentials," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 72, pp. 1171-1188, 2008.
- [138] H. Liu, M. Elstner, E. Kaxiras, T. Frauenheim, J. Hermans ve W. Yang, "Quantum mechanics simulation of protein dynamics on long timescale," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 44, pp. 484-489, 2001.
- [139] E. Krieger, G. Koraimann ve G. Vriend, "Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 47, pp. 393-402, 2002.
- [140] R. W. Hooft, G. Vriend, C. Sander ve E. E. Abola, "Errors in protein structures," *Nature*, vol. 381, pp. 272-272, 1996.
- [141] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss ve J. M. Thornton, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures," *Journal of applied crystallography*, vol. 26, pp. 283-291, 1993.
- [142] V. B. Chen, W. B. Arendall, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, vd., "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 66, pp. 12-21, 2010.
- [143] O. Carugo ve K. Djinović-Carugo, "Half a century of Ramachandran plots," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 69, pp. 1333-1341, 2013.
- [144] B. Wallner ve A. Elofsson, "Identification of correct regions in protein models using structural, alignment, and consensus information," *Protein Science*, vol. 15, pp. 900-913, 2006.
- [145] M. Wiederstein ve M. J. Sippl, "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins," *Nucleic acids research*, vol. 35, pp. W407-W410, 2007.
- [146] T. C. C. França, "Homology modeling: an important tool for the drug discovery," *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 33, pp. 1780-1793, 2015.
- [147] D. Baker ve A. Sali, "Protein structure prediction and structural genomics," *Science*, vol. 294, pp. 93-96, 2001.
- [148] N. Eswar, B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. Madhusudhan, D. Eramian, M. y. Shen, vd., "Comparative protein structure modeling using Modeller," *Current protocols in bioinformatics*, vol. 15, pp. 5.6. 1-5.6. 30, 2006.
- [149] Z. Xiang, "Advances in homology protein structure modeling," *Current Protein and Peptide Science*, vol. 7, pp. 217-227, 2006.
- [150] A. ali, "Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints," *Molecular medicine today*, vol. 1, pp. 270-277, 1995.
- [151] A. Fiser ve A. Šali, "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models," in *Methods in enzymology*. vol. 374, ed: Elsevier, 2003, pp. 461-491.
- [152] A. Mathur ve A. S. Vidyarthi, "SWIFT MODELLER: a JAVA based GUI for molecular modeling," *Journal of molecular modeling*, vol. 17, pp. 2601-2607, 2011.
- [153] G. Q. Dong, H. Fan, D. Schneidman-Duhovny, B. Webb ve A. Sali, "Optimized atomic statistical potentials: assessment of protein interfaces and loops," *Bioinformatics*, vol. 29, pp. 3158-3166, 2013.
- [154] M. y. Shen ve A. Sali, "Statistical potential for assessment and prediction of protein structures," *Protein science*, vol. 15, pp. 2507-2524, 2006.

- [155] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim vd., "CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields," *Journal of computational chemistry*, vol. 31, pp. 671-690, 2010.
- [156] A. Jagielska, L. Wroblewska ve J. Skolnick, "Protein model refinement using an optimized physics-based all-atom force field," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, pp. 8268-8273, 2008.
- [157] Y. Zhang, "Protein structure prediction: when is it useful?," *Current opinion in structural biology*, vol. 19, pp. 145-155, 2009.
- [158] P. D. Lyne, "Structure-based virtual screening: an overview," *Drug discovery today*, vol. 7, pp. 1047-1055, 2002.
- [159] F. L. Stahura ve J. Bajorath, "Virtual screening methods that complement HTS," *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, vol. 7, pp. 259-269, 2004.
- [160] T. Kodadek, "The rise, fall and reinvention of combinatorial chemistry," *Chemical communications*, vol. 47, pp. 9757-9763, 2011.
- [161] T. I. Oprea ve H. Matter, "Integrating virtual screening in lead discovery," *Current opinion in chemical biology*, vol. 8, pp. 349-358, 2004.
- [162] L. Ferreira, R. dos Santos, G. Oliva ve A. Andricopulo, "Molecular docking and structure-based drug design strategies," *Molecules*, vol. 20, pp. 13384-13421, 2015.
- [163] H. Geppert, M. Vogt ve J. Bajorath, "Current trends in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 50, pp. 205-216, 2010.
- [164] J. Inglese, D. S. Auld, A. Jadhav, R. L. Johnson, A. Simeonov, A. Yasgar vd., "Quantitative high-throughput screening: a titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, pp. 11473-11478, 2006.
- [165] G. M. Spitzer, M. Heiss, M. Mangold, P. Markt, J. Kirchmair, G. Wolber, vd., "One concept, three implementations of 3D pharmacophore-based virtual screening: distinct coverage of chemical search space," *Journal Of Chemical Information and Modeling*, vol. 50, pp. 1241-1247, 2010.
- [166] R. P. Gangwal, M. V. Damre, N. R. Das, G. V. Dhoke, A. Bhadauriya, R. A. Varikoti, vd., "Structure based virtual screening to identify selective phosphodiesterase 4B inhibitors," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 57, pp. 89-98, 2015.
- [167] T. Scior, A. Bender, G. Tresadern, J. L. Medina-Franco, K. Martínez-Mayorga, T. Langer, vd., "Recognizing pitfalls in virtual screening: a critical review," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 52, pp. 867-881, 2012.
- [168] C. N. Cavasotto, W. Orry ve J. Andrew, "Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 7, pp. 1006-1014, 2007.
- [169] A. N. Jain ve A. Nicholls, "Recommendations for evaluation of computational methods," *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 22, pp. 133-139, 2008.
- [170] A. Jorge Moura Barbosa ve A. Del Rio, "Freely accessible databases of commercial compounds for high-throughput virtual screenings," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 12, pp. 866-877, 2012.
- [171] M. Sastry, J. F. Lowrie, S. L. Dixon ve W. Sherman, "Large-scale systematic analysis of 2D fingerprint methods and parameters to improve virtual screening

- enrichments," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 50, pp. 771-784, 2010.
- [172] A. Akdemir, P. Rucktooa, A. Jongejan, R. van Elk, S. Bertrand, T. K. Sixma, vd., "Acetylcholine binding protein (AChBP) as template for hierarchical in silico screening procedures to identify structurally novel ligands for the nicotinic receptors," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 19, pp. 6107-6119, 2011.
- [173] S.Y. Huang ve X. Zou, "Advances and challenges in protein-ligand docking," *International journal of molecular sciences*, vol. 11, pp. 3016-3034, 2010.
- [174] I. Kapetanovic, "Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach," *Chemico-biological interactions*, vol. 171, pp. 165-176, 2008.
- [175] E. Yuriev, M. Agostino ve P. A. Ramsland, "Challenges and advances in computational docking: 2009 in review," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 24, pp. 149-164, 2011.
- [176] D. K. Agrafiotis, A. C. Gibbs, F. Zhu, S. Izrailev ve E. Martin, "Conformational sampling of bioactive molecules: a comparative study," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 47, pp. 1067-1086, 2007.
- [177] S. F. Sousa, P. A. Fernandes ve M. J. Ramos, "Protein–ligand docking: current status and future challenges," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 65, pp. 15-26, 2006.
- [178] Z. Zsoldos, D. Reid, A. Simon, S. B. Sadjad ve A. P. Johnson, "eHiTS: a new fast, exhaustive flexible ligand docking system," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 26, pp. 198-212, 2007.
- [179] B. Gorelik ve A. Goldblum, "High quality binding modes in docking ligands to proteins," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 71, pp. 1373-1386, 2008.
- [180] M. McGann, "FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets," *Journal of Computer-aided Molecular Design*, vol. 26, pp. 897-906, 2012.
- [181] R. Dias, J. de Azevedo ve F. Walter, "Molecular docking algorithms," *Current Drug Targets*, vol. 9, pp. 1040-1047, 2008.
- [182] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. Huey ve A. J. Olson, "Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4," *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 10, pp. 293-304, 1996.
- [183] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach ve R. Taylor, "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking," *Journal of molecular biology*, vol. 267, pp. 727-748, 1997.
- [184] E. Krovat, T. Steindl ve T. Langer, "Recent advances in docking and scoring," *Current Computer-Aided Drug Design*, vol. 1, pp. 93-102, 2005.
- [185] N. Foloppe ve R. Hubbard, "Towards predictive ligand design with free-energy based computational methods?," *Current medicinal chemistry*, vol. 13, pp. 3583-3608, 2006.
- [186] S.Y. Huang, S. Z. Grinter ve X. Zou, "Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, pp. 12899-12908, 2010.
- [187] P. Englebienne ve N. Moitessier, "Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 5. Force-field-based prediction of binding affinities of ligands to proteins," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 49, pp. 2564-2571, 2009.

- [188] D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr ve J. Bajorath, "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications," *Nature reviews Drug discovery*, vol. 3, p. 935, 2004.
- [189] M. M. Mysinger ve B. K. Shoichet, "Rapid context-dependent ligand desolvation in molecular docking," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 50, pp. 1561-1573, 2010.
- [190] H. M. Kumalo, S. Bhakat ve M. E. Soliman, "Theory and applications of covalent docking in drug discovery: merits and pitfalls," *Molecules*, vol. 20, pp. 1984-2000, 2015.
- [191] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie ve A. Whitty, "The resurgence of covalent drugs," *Nature reviews Drug discovery*, vol. 10, p. 307, 2011.
- [192] X. Ouyang, S. Zhou, C. T. T. Su, Z. Ge, R. Li ve C. K. Kwoh, "CovalentDock: automated covalent docking with parameterized covalent linkage energy estimation and molecular geometry constraints," *Journal of computational chemistry*, vol. 34, pp. 326-336, 2013.
- [193] S. F. Sousa, A. J. Ribeiro, J. Coimbra, R. Neves, S. Martins, N. Moorthy, vd., "Protein-ligand docking in the new millennium—a retrospective of 10 years in the field," *Current medicinal chemistry*, vol. 20, pp. 2296-2314, 2013.
- [194] G. Klebe, "Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations," *Drug discovery today*, vol. 11, pp. 580-594, 2006.
- [195] C. Bissantz, B. Kuhn ve M. Stahl, "A medicinal chemist's guide to molecular interactions," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 53, pp. 5061-5084, 2010.
- [196] J. Michel, J. Tirado-Rives ve W. L. Jorgensen, "Energetics of displacing water molecules from protein binding sites: consequences for ligand optimization," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, pp. 15403-15411, 2009.
- [197] R. Chaudhari, Z. Tan, B. Huang ve S. Zhang, "Computational polypharmacology: a new paradigm for drug discovery," *Expert opinion on drug discovery*, vol. 12, pp. 279-291, 2017.
- [198] K. Atkovska, S. Samsonov, M. Paszkowski-Rogacz ve M. Pisabarro, "Multipose binding in molecular docking," *International journal of molecular sciences*, vol. 15, pp. 2622-2645, 2014.
- [199] A. Tripathi ve K. Misra, "Molecular Docking: A structure-based drug designing approach," *JSciMed Chemistry*, vol. 5, pp. 1042-47, 2017.
- [200] Y.-C. Chen, "Beware of docking!," *Trends in pharmacological sciences*, vol. 36, pp. 78-95, 2015.
- [201] X. Hou, K. Li, X. Yu, J.-p. Sun ve H. Fang, "Protein flexibility in docking-based virtual screening: discovery of novel lymphoid-specific tyrosine phosphatase inhibitors using multiple crystal structures," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 55, pp. 1973-1983, 2015.
- [202] M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray ve R. D. Taylor, "Improved protein–ligand docking using GOLD," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 52, pp. 609-623, 2003.
- [203] P. T. Lang, S. R. Brozell, S. Mukherjee, E. F. Pettersen, E. C. Meng, V. Thomas, vd., "DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes," *Rna*, vol. 15, pp. 1219-1230, 2009.
- [204] A. N. Jain, "Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search," *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 21, pp. 281-306, 2007.
- [205] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, vd., "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method

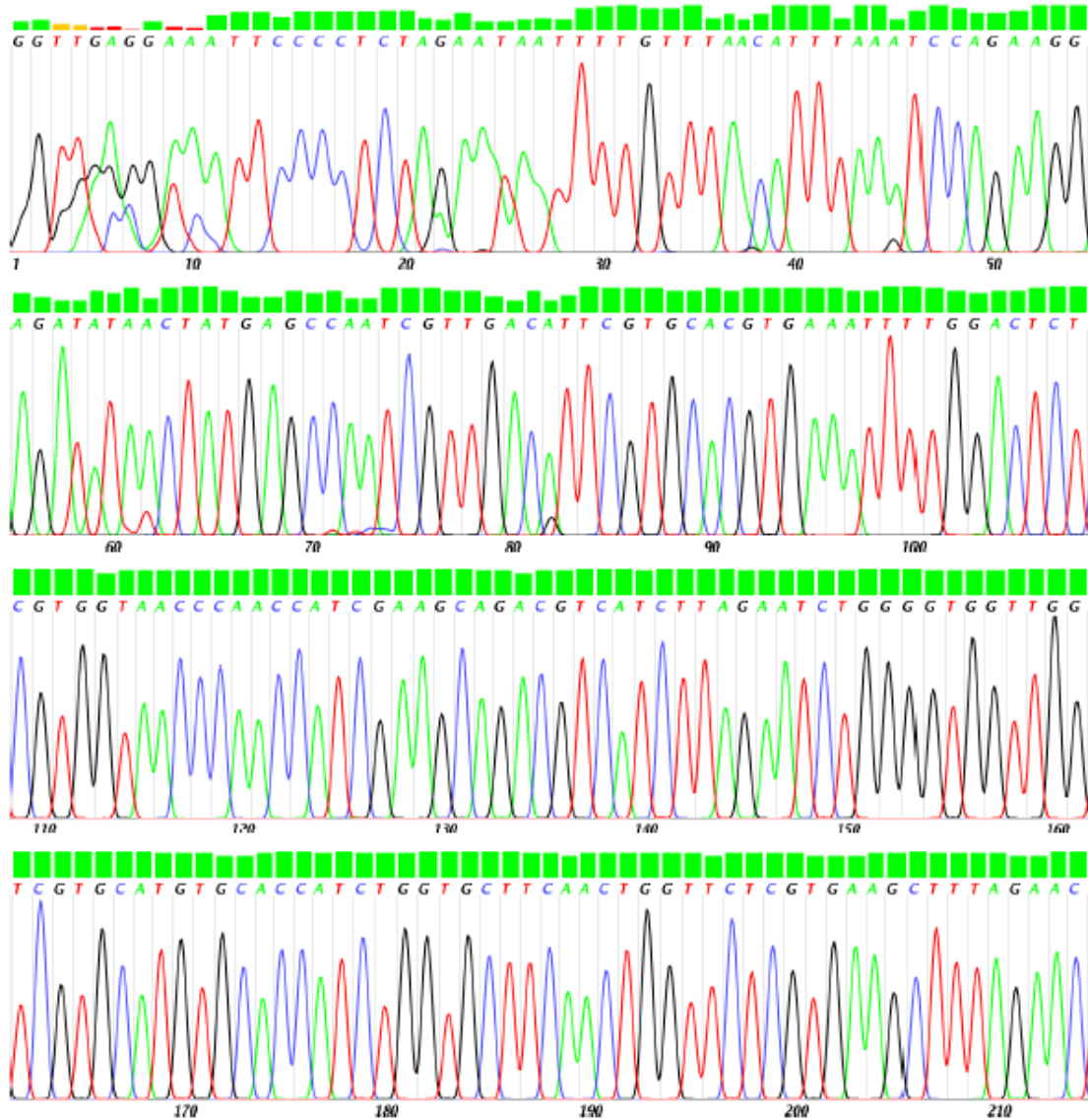
- and assessment of docking accuracy," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 47, pp. 1739-1749, 2004.
- [206] M. P. Repasky, M. Shelley ve A. Friesner, "Flexible ligand docking with Glide," *Current Protocols in Bioinformatics*, vol. 18, pp. 8.12. 1-8.12. 36, 2007.
- [207] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, vd., "Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 49, pp. 6177-6196, 2006.
- [208] <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>. Erişim Tarihi:3 Kasım 2019.
- [209] <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-cloning/alicator-cloning-system.html>. Erişim Tarihi:16 Kasım 2019.
- [210] J. F. Sambrook and D. W. Russell, "Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)", 2001.
- [211] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Erişim Tarihi:17 Kasım 2019.
- [212] <https://saglik.ibb.istanbul/saglik-ve-hifzissihha-mudurlugu/>. Erişim Tarihi:27 Kasım 2018.
- [213] <https://worldwide.promega.com/>. Erişim Tarihi:11 Ekim 2019.
- [214] http://www.ecotechbiotechnology.com/FileUpload/ep926784/File/ecopure_pcr-gel_purification.pdf. Erişim Tarihi:10 Ekim 2019.
- [215] <https://nld.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>. Erişim Tarihi:3 Eylül 2019.
- [216] <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol/> Erişim Tarihi:5 Eylül 2019
- [217] <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Erişim Tarihi:10 Eylül 2019.
- [218] S. Yakarsonmez, E. Cayir, O. Mutlu, B. Nural, E. Sariyer, M. Topuzogullari, vd., "Cloning, expression and characterization of the gene encoding the enolase from *Fusobacterium nucleatum*," *Applied biochemistry and microbiology*, vol. 52, pp. 23-30, 2016.
- [219] E. Cayir, A. Erdemir, E. Ozkan, M. Topuzogullari, Z. B. Bolat, A. Akat, vd., "Cloning of intron-removed enolase gene and expression, purification, kinetic characterization of the enzyme from *Theileria annulata*," *Molecular biotechnology*, vol. 56, pp. 689-696, 2014.
- [220] D. K. Shoemark, M. J. Cliff, R. B. Sessions ve A. R. Clarke, "Enzymatic properties of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*," *The FEBS journal*, vol. 274, pp. 2738-2748, 2007.
- [221] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *nature*, vol. 227, p. 680, 1970.
- [222] <https://web.expasy.org/protparam/> Erişim Tarihi:17 Eylül 2019
- [223] R. C. Edgar, "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput," *Nucleic acids research*, vol. 32, pp. 1792-1797, 2004.
- [224] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, vd., "SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information," *Nucleic acids research*, vol. 42, pp. W252-W258, 2014.
- [225] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, vd., "UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis," *Journal of computational chemistry*, vol. 25, pp. 1605-1612, 2004.

- [226] C. Colovos ve T. O. Yeates, "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions," *Protein science*, vol. 2, pp. 1511-1519, 1993.
- [227] B. Wallner ve A. Elofsson, "Can correct protein models be identified?," *Protein science*, vol. 12, pp. 1073-1086, 2003.
- [228] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall III, P. I. De Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, vd., "Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ , ψ and $C\beta$ deviation," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 50, pp. 437-450, 2003.
- [229] D. Eisenberg, R. Lüthy ve J. U. Bowie, "[20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles," in *Methods in enzymology*. vol. 277, ed: Elsevier, 1997, pp. 396-404.
- [230] P. Benkert, S. C. Tosatto ve D. Schomburg, "QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 71, pp. 261-277, 2008.
- [231] A. Volkamer, D. Kuhn, F. Rippmann ve M. Rarey, "DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment," *Bioinformatics*, vol. 28, pp. 2074-2075, 2012.
- [232] A. Volkamer, A. Griewel, T. Grombacher, ve M. Rarey, "Analyzing the topology of active sites: on the prediction of pockets and subpockets," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 50, pp. 2041-2052, 2010.
- [233] S. Kim, P. A. Thiessen, E. E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, vd., "PubChem substance and compound databases," *Nucleic acids research*, vol. 44, pp. D1202-D1213, 2015.
- [234] P. Leeson, "Drug discovery: Chemical beauty contest," *Nature*, vol. 481, p. 455, 2012.
- [235] L. Schrödinger, "Release 2017-1: LigPrep," LLC, New York, NY: Schrödinger, 2017.
- [236] E. Harder, W. Damm, J. Maple, C. Wu, M. Reboul, J. Y. Xiang, vd., "OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 12, pp. 281-296, 2015.
- [237] S. Release, "1: Schrödinger Suite 2017-1 Ligand Docking protocol," Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
- [238] G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju ve W. Sherman, "Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments," *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 27, pp. 221-234, 2013.
- [239] S. Genheden ve U. Ryde, "The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities," *Expert opinion on drug discovery*, vol. 10, pp. 449-461, 2015.
- [240] <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Erişim Tarihi:5 Temmuz 2019.
- [241] J. Qin, G. Chai, J. M. Brewer, L. L. Lovelace ve L. Lebioda, "Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics," *Biochemistry*, vol. 45, pp. 793-800, 2006.
- [242] L. Lebioda, B. Stec ve J. Brewer, "The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta+ alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha) 6 topology," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, pp. 3685-3693, 1989.
- [243] O. Mutlu, S. Yakarsonmez, E. Sariyer, O. Danis, B. Yuce-Dursun, M. Topuzogullari vd., "Comprehensive structural analysis of the open and closed conformations of *Theileria annulata* enolase by molecular modelling and docking," *Computational biology and chemistry*, vol. 64, pp. 134-144, 2016.

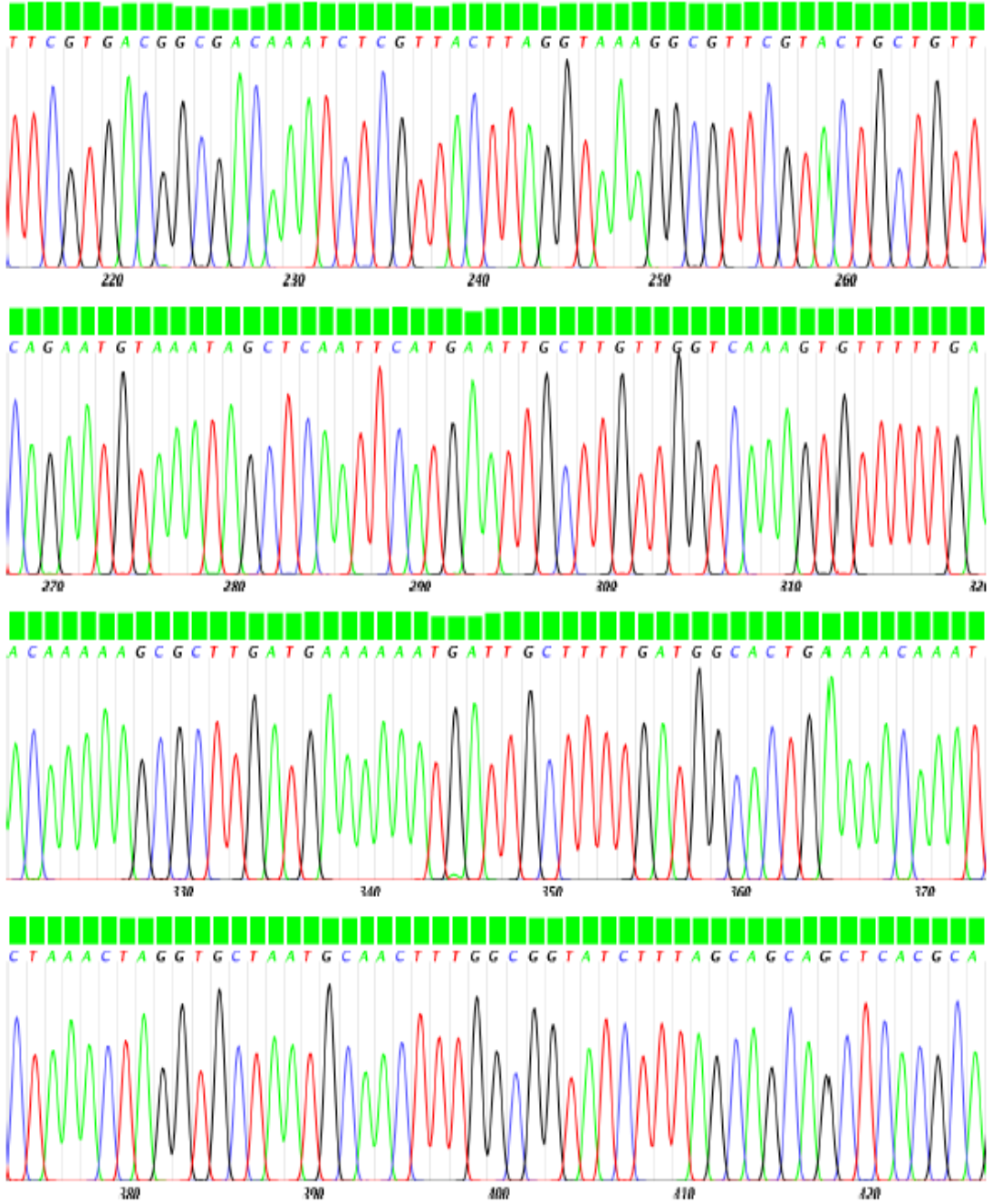
- [244] J. Qin, G. Chai, J. M. Brewer, L. L. Lovelace ve L. Lebioda, "Structures of asymmetric complexes of human neuron specific enolase with resolved substrate and product and an analogous complex with two inhibitors indicate subunit interaction and inhibitor cooperativity," *Journal of inorganic biochemistry*, vol. 111, pp. 187-194, 2012.
- [245] E. Zhang, J. M. Brewer, W. Minor, L. A. Carreira ve L. Lebioda, "Mechanism of enolase: The crystal structure of asymmetric dimer enolase– 2-phospho-d-glycerate/enolase– phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution," *Biochemistry*, vol. 36, pp. 12526-12534, 1997.
- [246] T. M. Larsen, J. E. Wedekind, I. Rayment ve G. H. Reed, "A carboxylate oxygen of the substrate bridges the magnesium ions at the active site of enolase: structure of the yeast enzyme complexed with the equilibrium mixture of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate at 1.8 Å resolution," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 4349-4358, 1996.
- [247] S. Bergmann, D. Wild, O. Diekmann, R. Frank, D. Bracht, G. S. Chhatwal, "Identification of a novel plasmin (ogen)-binding motif in surface displayed α -enolase of *Streptococcus pneumoniae*," *Molecular microbiology*, vol. 49, pp. 411-423, 2003.
- [248] J. Ruan, T. Mouveaux, S. H. Light, G. Minasov, W. F. Anderson, S. Tomavo, "The structure of bradyzoite-specific enolase from *Toxoplasma gondii* reveals insights into its dual cytoplasmic and nuclear functions," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 71, pp. 417-426, 2015.
- [249] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel ve A. Bairoch, "Protein identification and analysis tools on the ExpASY server," in *The proteomics protocols handbook*, ed: Springer, 2005, pp. 571-607.
- [250] L. H. Hansen, S. Knudsen ve S. J. Sørensen, "The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*," *Current microbiology*, vol. 36, pp. 341-347, 1998.
- [251] S. Yakarsonmez, O. Danis, O. Mutlu, M. Topuzogullari, E. Sariyer, B. Yuce-Dursun, "Discovery and evaluation of inhibitory activity and mechanism of arylcoumarin derivatives on *Theileria annulata* enolase by in vitro and molecular docking studies," *Molecular Diversity*, 2019/11/21 2019.
- [252] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Erişim Tarihi: 7 Ağustos 2019.
- [253] <https://www.rcsb.org/>. Erişim Tarihi:10 Ağustos 2019.
- [254] A. Hillisch, L. F. Pineda ve R. Hilgenfeld, "Utility of homology models in the drug discovery process," *Drug discovery today*, vol. 9, pp. 659-669, 2004.
- [255] O. Carugo ve S. Pongor, "A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures," *Protein science*, vol. 10, pp. 1470-1473, 2001.
- [256] P. Benkert, M. Künzli ve T. Schwede, "QMEAN server for protein model quality estimation," *Nucleic acids research*, vol. 37, pp. W510-W514, 2009.
- [257] <https://swissmodel.expasy.org/docs/help> Erişim Tarihi:18 Eylül 2019
- [258] P. Mereghetti, M. L. Ganadu, E. Papaleo, P. Fantucci, L. De Gioia, "Validation of protein models by a neural network approach," *BMC bioinformatics*, vol. 9, p. 66, 2008.
- [259] <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>. Erişim Tarihi: 14 Ekim 2019.
- [260] <https://proteins.plus/> Erişim Tarihi: 20 Ekim 2019
- [261] L. Lebioda ve B. Stec, "Crystal structure of enolase indicates that enolase and pyruvate kinase evolved from a common ancestor," *Nature*, vol. 333, p. 683, 1988.

DİZİLEME KROMATOGRAMI

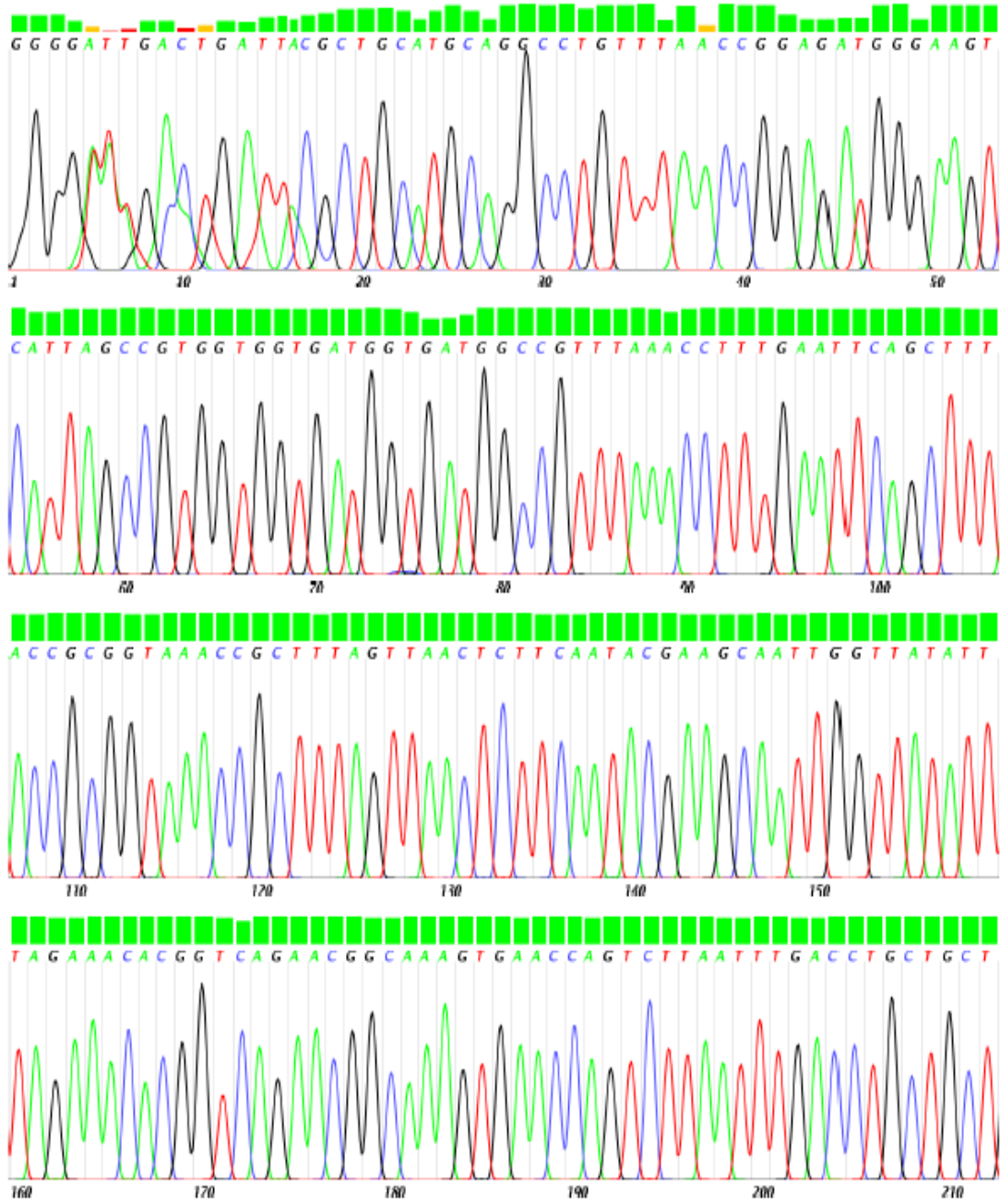
Tablo EK-A1 T7 forward primer ile dizileme sonucu elde edilen kromatogram



Tablo EK-A1 T7 primeri ile dizileme sonucu elde edilen kromatogram
(devamı)

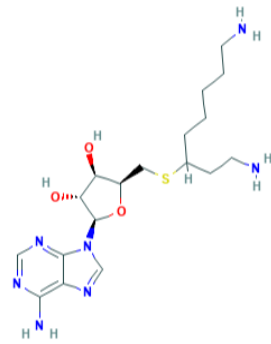


Tablo EK-A2 pQE-FP primeri ile dizileme sonucu elde edilen kromatogram

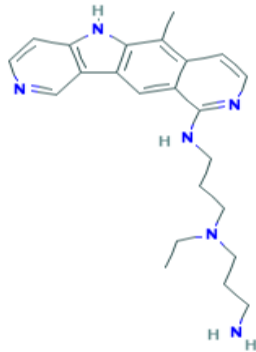


LİGANDLARIN İKİ BOYUTLU YAPILARI

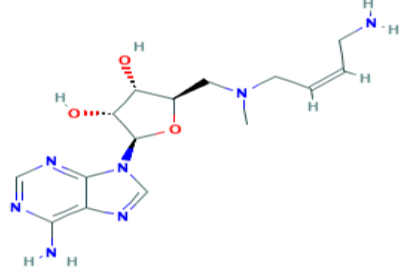
Tablo EK-B1 AbENO açık konformasyon için öngörülen modelin aktif bölgesi ve muhtemel ilaç bağlanma bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşik arasında GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjilerine göre en iyi bileşik olarak seçilen 100766 numaralı bileşiğin iki boyutlu yapısı

PubChem ID	Bileşik adı	İki Boyutlu Yapıları
100766	(2R,3R,4S,5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(1,8-diaminooctan-3-ylsulfanylmethyl)oxolane-3,4-diol	

Tablo EK-B2 AbENO kapalı konformasyon için öngörülen aktif bölgeye en yakın bölge olan PO bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşik arasında GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjilerine göre en iyi bileşik olarak seçilen 3068866 numaralı bileşiğin iki boyutlu yapısı

PubChem ID	Bileşik adı	İki Boyutlu Yapı
3068866	N'-ethyl-N'-[3-[(2-methyl-6,13,17-triazatetracyclo[8.7.0.0 ^{3,8} .0 ^{11,16}]heptadecan-1(10),2,4,6,8,11(16),12,14-octaen-7-yl)amino]propyl]propane-1,3-diamine	

Tablo EK-B3 AbENO kapalı konformasyon için öngörülen modelin P3 muhtemel ilaç bağlanma bölgesi ile yanaştırılmış 10 bileşik arasında GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjilerine en iyi bileşik olarak seçilen 6436013 numaralı bileşiğin iki boyutlu yapısı

PubChem ID	Bileşik adı	İki Boyutlu Yapı
6436013	(2R,3S,4R,5R)-2-[[[(Z)-4-aminobut-2-enyl]-methylamino]methyl]-5-(6-aminopurin-9-yl)oxolane-3,4-diol	

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: anilata8@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. A. Ata, E. Uğurel, O. M. Uğurel, T. G. İnci, D. Balık, “ Cloning of The Gene Encoding the Enolase from *Acinetobacter baumannii* ”, Eurasian Congress on Molecular Biotechnology (ECOMB2019) September 19 – 21, 2019.

Projeler

1. *Acinetobacter Baumannii* Enolazının Klonlanması ve *In Silico* Analizi

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Dilek BALIK

Araştırmacı: Anıl ATA

Proje Kodu: 3496