

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ ANTİ-THEILERIAL İLAÇLARIN GELİŞTİRİLMESİ İÇİN *THEILERIA*
ANNULATA PEPTİDİL PROLİL İZOMERAZ GENİNİN KLONLANMASI VE
İNHİBİTÖR ADAYLARININ *IN SILICO* İNCELENMESİ

SEZEN SPAHİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK TURGUT-BALIK

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ ANTİ-THEILERIAL İLAÇLARIN GELİŞTİRİLMESİ İÇİN *THEILERIA*
ANNULATA PEPTİDİL PROLİL İZOMERAZ GENİNİN KLONLANMASI VE
İNHİBİTÖR ADAYLARININ *IN SILICO* İNCELENMESİ**

Sezen SPAHİ tarafından hazırlanan tez çalışması 13.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Özkan DANIŞ
Marmara Üniversitesi

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, karşılaştığım her türlü zorluk karşısında sabırla çözüm üreten, akademik hayatıma ilk adımımı sağlayan, akademik hayatım dışında da fikir ve deneyimlerini paylaştan değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK'a,

Tez çalışmasının yürütülmesine destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne ve bölümdeki tüm hocalarıma,

Tez çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanmasında destek ve katkılarını esirgemeyen Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Özal Mutlu'ya,

Biyomühendislik Bölümü, Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım, Araş. Gör. Emrah Sarıyer, Uzman Dr. Ayşegül Erdemir, Sinem Yakarönmez, Osman Mutluhan Uğurel, Erennur Uğurel, Burcu Ata, Sena Karaosmanoğlu ve Tuğba Gül İnci ile birlikte bölümde bulunan diğer yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisansım süresince de sabır, ilgi ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme,

Bana ve bu teze emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

Aralık 2017

Sezen SPAHİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTIMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xviii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Theileriosis.....	1
1.1.2 Theileria.....	3
1.1.2.1 <i>Theileria annulata</i>	4
1.1.3 <i>Theileria</i> ile Konak Hücre Manipülasyonu.....	5
1.1.4 İnsan Peptidil Prolil <i>cis/trans</i> İzomeraz Enzimi.....	6
1.1.5 İnsan PIN1 ve Kanser Arasındaki Metabolik İlişki.....	8
1.1.5.1 İnsan PIN1 Tarafından FBW7 Tümör Baskılayıcı Fonksiyonunun Negatif Düzenlenmesi	8
1.1.6 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimi ve Mutasyonuna Bağlı İlaç Direnci	14
1.1.7 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı.....	19
1.1.8 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı.....	20
1.1.8.1 Hedef Belirlenmesi	20
1.1.8.2 Homoloji Modelleme.....	22
1.1.8.3 Yüksek Verimde Sanal Tarama ve Moleküler Kenetlenme	24
1.1.8.4 Moleküler Dinamik Simülasyonu.....	25
1.2 Tezin Amacı	26
1.3 Hipotez	27
BÖLÜM 2	

MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
2.1 Materyaller	28
2.1.1 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	28
2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	29
2.1.3 İfade Vektörü.....	30
2.1.4 <i>Escherichia coli</i> Soyu.....	31
2.1.5 Genomik DNA.....	32
2.1.6 Primerler.....	32
2.1.7 Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	32
2.1.8 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar.....	33
2.2 Yöntem.....	35
2.2.1 Genomik DNA'dan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Geninin Amplifikasyonu.....	35
2.2.1.1 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisine Spesifik Primerlerin Tasarlanması	35
2.2.1.2 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisine Spesifik Primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu	35
2.2.2 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi.....	36
2.2.3 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılması.....	36
2.2.3.1 aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) Sistemine Uygun Primerlerin Tasarlanması.....	37
2.2.3.2 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin LIC Sistemine Spesifik Primerler ile Amplifikasyonu	37
2.2.3.3 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Klonlanması ve <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS Hücrelerine Transformasyonu.....	38
2.2.3.4 Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR ile Kontrolü	39
2.2.4 Yönlendirilmiş Mutagenез ile <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İntronun Uzaklaştırılması.....	41
2.2.4.1 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İntronun Uzaklaştırılması için Mutagenез Primerlerin Tasarlanması.....	41
2.2.4.2 <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İntronun Uzaklaştırılması için Mutagenез Primerler ile PCR.....	42
2.2.4.3 Kinaz-Ligaz-Dpn1 Reaksiyonu	43
2.2.4.4 İntronu Uzaklaştırılan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Kompetan <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerine Transformasyonu.....	44
2.2.4.5 İntronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü.....	44
2.2.5 İntronu Uzaklaştırılan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu ve Koloni PCR ile Kontrolü.....	45

2.2.6	İntronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile PCR Kontrolü.....	45
2.2.7	Yabancıl Tip ve Mutant <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimlerin Homoloji Modellenmesi.....	45
2.2.8	Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi İçin Moleküler Kenetlenme Temelli Sanal Tarama.....	46
2.2.9	Moleküler Dinamik Simülasyon Çalışmaları.....	48
2.2.9.1	Yabancıl Tip ve Mutant <i>Ta</i> PIN1 Homoloji Modellerin Moleküler Dinamik Simülasyonu	49
2.2.9.2	Kenetli Bileşiklerin Moleküler Dinamik Simülasyonu	52

BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....53

3.1	Sonuçlar	53
3.1.1	Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genomik DNA'dan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Geninin Amplifikasyonu.....	53
3.1.2	<i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılarak Alt Klonlanması.....	54
3.1.2.1	<i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin LIC Sistemine Spesifik Primerler ile Amplifiye Edilmesi.....	54
3.1.2.2	<i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Klonlanması ve Rekombinant Plazmid DNA'nın <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS Hücrelerine Transformasyonu	55
3.1.2.3	Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR Metodu ile Kontrolü.....	55
3.1.3	Yönlendirilmiş Mutagenез ile <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İntronun Uzaklaştırılması ve Kompetan <i>E. coli</i> DH5α Hücresine Transformasyonu.....	56
3.1.3.1	İntronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü.....	57
3.1.4	İntronu Uzaklaştırılan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücresine Transformasyonu ve Koloni PCR ile Kontrolü.....	58
3.1.5	İntronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile Kontrolü.....	59
3.1.6	Yabancıl Tip ve Mutant <i>Theileria annulata</i> Peptidil Prolil İzomeraz Proteinlerin Homoloji Modellenmesi ve Validasyonu.....	62
3.1.7	Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi İçin Moleküler Kenetlenme Temelli Sanal Tarama.....	71
3.1.8	Seçilen Öncü Ligandlar ile Moleküler Dinamik Simülasyon Çalışmaları	79

BÖLÜM 4

DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER.....	92
4.1 Değerlendirme	92
4.2 Öneriler	95
KAYNAKLAR	97
EK A	
DİZİLEME KROMATOGRAMI.....	109
EK B	
LİGANDLARIN İKİ BOYUTLU YAPILARI.....	113
EK C	
ÖNCÜ LİGANDLARIN ADME DEĞERLERİ.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	122

SİMGE LİSTESİ

μm	Mikrometre
3B	Üç boyutlu
Å	Angstrom
CaCl_2	Kalsiyum klorür
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum klorür dihidrat
CUL1	Cullin 1
Da	Dalton
DD	Dimerizasyon domain
dH_2O	Distile su
dk	Dakika
E3 SCF	SKP1, CUL1 ve F-box protein kompleksi
FBW7	F box ve WD tekrar alanı içeren 7
g	Gram
Hbağ	Hidrojen bağ
HCl	Hidroklorik asit
hPIN1	İnsan Peptidil prolil cis/trans izomeraz NIMA ile etkileşen protein
ID	Kimlik
kcal	Kilokalori
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
l	Litre
M	Molarite
mA	Miliamper

mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgCl ₂ .6H ₂ O	Magnezyum klorür heksahidrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum klorür
ns	Nanosaniye
°C	Derece birimi Celsius
OD	Optik yoğunluk
pSer/Thr-Pro	Prolinden önce gelen fosfo Serin veya Treonin
RBX1	RING box 1
SKP1	S-faz kinaz ile ilişkili protein 1
SMYD3	SET VE MYND alanı içeren 3 histo metiltransferaz
sn	Saniye
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ΔG	Toplam serbest bağlanma enerjisi
φ	phi
ψ	psi

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADMET	Absorbsiyon, dağılım, metabolizma, salınım ve toksisite
bç	Baz çifti
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent assay
FDA	Food and drug administration
HTVS	Yüksek verimli sanal tarama
IFAT	Dolaylı immünofloresan testi
KLD	Kinaz-Ligaz-Dpnl enzim
LAMP	Halka aracılı izotermal amplifikasyon
LIC	Ligation Independent Cloning
MD	Moleküler dinamik
MM/GBSA	Moleküler Mekanik / Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı
mTaPIN1	Mutant <i>Theileri annulata</i> Peptidil prolil cis/trans izomeraz enzimi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIN1	Peptidil prolil cis/trans izomeraz NIMA ile etkileşen protein
PPlaz	Peptidil-prolil izomeraz
RLB	Reverse Line Blot
RMSD	Root mean square deviation
RMSF	Root mean square fluctuation
SP	Standart hassasiyet
<i>T. annulata</i>	<i>Theileria annulata</i>
<i>T. mutans</i>	<i>Theileria mutans</i>
<i>T. orientalis</i>	<i>Theileria orientalis</i>
<i>T. taurotragi</i>	<i>Theileria taurotragi</i>
TaPIN1	<i>Theileri annulata</i> Peptidil prolil cis/trans izomeraz
TBL3	<i>Theileria</i> – enfekte sığır B lenfosarkoma hücreleri
Ub	Ubikuitin
wTaPIN1	Yabanıl tip <i>Theileri annulata</i> Peptidil prolil cis/trans izomeraz
XP	Ekstra hassasiyet

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 <i>Theileria</i> parazitlerin yaşam döngüsü	4
Şekil 1.2 PIN1 tarafından katalizlenen pSer/Thr-Pro motiflerinin konformasyonel geçişi.....	7
Şekil 1.3 İnsan PIN1 protein bölgelerinin şematik gösterimi	8
Şekil 1.4 E3 SCF (SKP1, CUL1 ve F-box protein kompleksi) ubiquitin ligaz enziminin şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.5 FBW7 gen organizasyonu ve protein izoformları.	10
Şekil 1.6 İki degron yoluyla dimerik FBW7 bağlı siklin E modeli	10
Şekil 1.7 Dimerizasyon ile FBW7 trans-otoubikuitinasyon modeli	11
Şekil 1.8 FBW7 tanımlanan D-domain ve F-box motifinin şematik gösterimi ve PIN1 bağlanma bölgesi	11
Şekil 1.9 PIN1 ile FBW7 otoubikuitinasyonu ve FBW7 dimer oluşumunun inhibisyonu şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.10 Onkogen Ras ve Neu proteinlerini ifade edecek şekilde oluşturulan MCF10A (meme hücresi) hücrelerinden elde edilen tüm-hücre lizatlarının immüno blot analizleri	13
Şekil 1.11 PIN1 aracılı FBW7 aktivitesini baskılanarak tümör oluşumuna neden olan muhtemel yolun şematik gösterimi	13
Şekil 1.12 <i>Homo sapiens</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> ve <i>Theileria annulata</i> PIN1 dizi karşılaştırması.....	15
Şekil 1.13 Endojen <i>Ta</i> PIN1 FBW7α ile etkileşime girmektedir.	16
Şekil 1.14 <i>Ta</i> PIN1 aracılı konak FBW7 aktivitesinin baskılanarak enfekte hayvanlarda tümör oluşumuna neden olan yolun şematik gösterimi.	16
Şekil 1.15 <i>T. annulata</i> yabancıl tip (<i>Ta</i> PIN1 WT) ve buparvaquone dirençli mutant (<i>mTa</i> PIN1) nükleotid dizi karşılaştırması.....	17
Şekil 1.16 hPIN1 ile benzerliğe dayanarak <i>Ta</i> PIN1 ve <i>Ta</i> PIN1 (A53P) mutantı için homoloji modelleri ve PIN1 aktif bölgeleri ile juglone ve buparvaquone moleküllerinin kenetlenme çalışmaları.....	18
Şekil 1.17 Yabancıl tip <i>Ta</i> PIN1 (WT) ve mutant <i>Ta</i> PIN1 (A53P)'in buparvaquone, juglone ve DTM'e karşı katalitik PPlaz aktivitesi	18
Şekil 1.18 Yapıya dayalı ilaç tasarımının iş akış şeması	21
Şekil 1.19 Homoloji modelleme sürecinin ana hatları ve ilaç keşfinde uygulamaları...	22
Şekil 1.20 Moleküler dinamik simülasyonun iş akış şeması.....	26

Şekil 1.21	Molekül hareketlerini yöneten atomik kuvvetler ve bu kuvvetlerden kaynaklanan enerjinin matematiksel hesaplanması.....	26
Şekil 2.1	pLATE31 vektör elementleri	31
Şekil 2.2	pLATE 31 ifade vektörü	31
Şekil 2.3	T4 DNA polimeraz ve dGTP ile ilgili gen üzerinde yapışkan uçların oluşturulması	37
Şekil 2.4	Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit protokolü akış şeması	41
Şekil 2.5	Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit için delesyon primerlerin tasarımı	42
Şekil 3.1	Gen dizisine spesifik primerler ile amplifiye edilen intron bölgesi içeren TaPIN1 PCR ürünü.	53
Şekil 3.2	LIC sistemine spesifik primerler ile amplifiye edilen saf PCR ürünü.....	54
Şekil 3.3	Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR sonrası elde edilen jel elektroforez görüntüsü.	56
Şekil 3.4	Koloni PCR sonrası elde edilen intronsuz PCR ürünü.....	57
Şekil 3.5	İntronlu ve intronsuz rekombinant plazmid DNA'dan PCR sonrası elde edilen jel görüntüsü	58
Şekil 3.6	Transformasyon sonuçları.....	59
Şekil 3.7	Koloni PCR sonrası elde edilen jel görüntüsü	59
Şekil 3.8	LIC 5' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile <i>Theileria annulata</i> PIN1'in referans dizisinin eşleştirme sonucu.....	60
Şekil 3.9	LIC 3' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile <i>Theileria annulata</i> PIN1'in referans dizisinin eşleştirme sonucu.....	61
Şekil 3.10	TaPIN1 gen dizisinden intronun uzaklaştırıldığını gösteren kromatogram görüntüsü.	62
Şekil 3.11	<i>Theileria annulata</i> PIN1'in ve sadece PPlaz alanı içeren insan PIN1'in amino asitleri arasında eşleştirme	63
Şekil 3.12	Hedef ve kalıp protein arasındaki benzerlik ve elde edilen homoloji modeli ile uygulama alanları	63
Şekil 3.13	Yabanıl tip (a) ve mutant (b) TaPIN1 için seçilen en iyi modeller.....	64
Şekil 3.14	Yabanıl tip ve mutant TaPIN1 modeller ile sadece PPlaz alanı içeren hPIN1 proteinin süperimpozisyonu	65
Şekil 3.15	Model yabanıl tip TaPIN1'in enerji minimizasyonu öncesi ERRAT sonucunun görüntüsü.	66
Şekil 3.16	Model yabanıl tip TaPIN1'in enerji minimizasyonu sonrası ERRAT sonucunun görüntüsü.	66
Şekil 3.17	Model mutant TaPIN1'in enerji minimizasyon öncesi ERRAT sonucunun görüntüsü.	67
Şekil 3.18	Model mutant TaPIN1'in enerji minimizasyon sonrası ERRAT sonucunun görüntüsü.	67
Şekil 3.19	Enerji minimizasyon sonrası yabanıl tip (a) ve mutant (b) TaPIN1 modellerin z-skor sonucu.	68
Şekil 3.20	Enerji minimizasyon sonrası yabanıl tip (a) ve mutant (b) TaPIN1 modellerin enerji düzeyi grafiği.	69
Şekil 3.21	Enerji minimizasyon sonrası yabanıl tip TaPIN1 modelinin Ramachandran diyagramı.....	70

Şekil 3.22	Enerji minimizasyon sonrası mutant <i>TaPIN1</i> modelinin Ramachandran diyagramı.....	71
Şekil 3.23	Yabanıl tip <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile 5304752 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi.....	77
Şekil 3.24	Mutant <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile 5304752 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi.....	77
Şekil 3.25	Yabanıl tip <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile 9993782 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi.....	78
Şekil 3.26	Mutant <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile 9993782 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi.....	78
Şekil 3.27	Yabanıl tip <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile buparvaquone ilacının kenetlenmiş kompleksi.	79
Şekil 3.28	Mutant <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile buparvaquone ilacının kenetlenmiş kompleksi.	79
Şekil 3.29	Ligand bağlı olmadan yabanıl tip ve mutant <i>TaPIN1</i> modellerin 50 ns MD simülasyonu sonucu elde edilen RMSD grafiği.	80
Şekil 3.30	Yabanıl tip ve mutant <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapıları ile kenetlenmiş öncü bileşiklerin 100 ns boyunca MD simülasyonu sonucu elde edilen RMSD grafiği	81
Şekil 3.31	Ligand bağlı olmadan yabanıl tip ve mutant <i>TaPIN1</i> proteinlerin 50 ns MD simülasyonu sonucu elde edilen tüm rezidülerine ait RMSF değerleri.	82
Şekil 3.32	Öncü ligandların varlığında yabanıl tip ve mutant <i>TaPIN1</i> proteinlerin 100 ns MD simülasyonu sonucu elde edilen tüm rezidülerine ait RMSF değerleri.	82
Şekil 3.33	(a) 5304752 ligand bağlı yabanıl tip <i>TaPIN1</i> kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu. (b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.....	86
Şekil 3.34	(a) 5304752 ligand bağlı mutant <i>TaPIN1</i> kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu.(b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.....	86
Şekil 3.35	(a) 9993782 ligand bağlı yabanıl tip <i>TaPIN1</i> kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu. (b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.....	87
Şekil 3.36	(a) 9993782 ligand bağlı mutant <i>TaPIN1</i> kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu. (b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.....	87

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 Hastalığa neden olan <i>Theileria</i> türleri	2
Çizelge 2.1 Tez çalışmasında kullanılan primerler.	32
Çizelge 2.2 LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri hazırlanması için gereken bileşenler.....	32
Çizelge 2.3 LB (Luria-Bertani) Agar hazırlanması için gereken bileşenler.....	33
Çizelge 2.4 SOC Medium (25 ml) hazırlanması için gereken bileşenler.....	33
Çizelge 2.5 2M Mg ⁺² hazırlanması için gereken bileşenler.	34
Çizelge 2.6 CaCl ₂ solüsyonu hazırlamak için kullanılan bileşenler.	34
Çizelge 2.7 50 x TAE Tampon Çözeltilisini (Tris-Asetat-EDTA) hazırlamak için kullanılan bileşenler.....	34
Çizelge 2.8 <i>TaPIN1</i> gen amplifikasyonu için gerekli olan bileşenler.	35
Çizelge 2.9 LIC sistemine alt klonlanması amacıyla <i>TaPIN1</i> 'in amplifiye edilmesi için kullanılan bileşenler.	38
Çizelge 2.10 <i>TaPIN1</i> geninde yapışkan uçların oluşturulması için gereken reaksiyon bileşenleri.....	38
Çizelge 2.11 Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR için gerekli olan bileşenler.	40
Çizelge 2.12 Site-Directed Mutagenesis Kit ile <i>TaPIN1</i> 'den intronun uzaklaştırılması için kullanılan PCR bileşenleri.	43
Çizelge 2.13 Kinaz-Ligaz- DpnI Reaksiyon bileşenleri.....	43
Çizelge 2.14 Koloni PCR için kullanılan bileşenler.....	44
Çizelge 2.15 Enerji minimizasyonu için koşulların tanımlandığı sistem girdileri.	49
Çizelge 2.16 Sistemin ısıtılması için koşulların tanımlandığı sistem girdi bilgileri.	50
Çizelge 2.17 MD simülasyon koşullarının tanımlandığı sistem girdisi.	51
Çizelge 3.1 Mutant <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile kenetlenmiş 10 tane bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)	73
Çizelge 3.2 Yabanıl tip <i>TaPIN1</i> 'in öngörülen yapısı ile kenetlenmiş 10 tane bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG)	74
Çizelge 3.3 5304752, 9993782 ligandların ve buparvaquone ilacının yabanıl tip (<i>wTaPIN1</i>) enzimi ile kenetlenmesi sonucu etkileşim gösterdiği rezidüler.75	
Çizelge 3.4 5304752, 9993782 ligandların ve buparvaquone ilacının mutant (<i>mTaPIN1</i>) enzimi ile kenetlenmesi sonucu etkileşim gösterdiği rezidüler	75
Çizelge 3.5 <i>TaPIN1</i> katalitik rezidüler ile, 5304752-yabanıl tip (<i>wTaPIN1</i>) kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.....	88

Çizelge 3.6	<i>Ta</i> PIN1 katalitik rezidüler ile, 5304752 - mutant (<i>mTa</i> PIN1) kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.....	89
Çizelge 3.7	<i>Ta</i> PIN1 katalitik rezidüler ile, 9993782 – yabanıl tip (<i>wTa</i> PIN1) kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.....	90
Çizelge 3.8	<i>Ta</i> PIN1 katalitik rezidüler ile, 9993782 – mutant (<i>mTa</i> PIN1) kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.....	91



YENİ ANTI-THEILERIAL İLAÇLARIN GELİŞTİRİLMESİ İÇİN *THEILERIA ANNULATA* PEPTİDİL PROLİL İZOMERAZ GENİNİN KLONLANMASI VE İNHİBİTÖR ADAYLARININ *IN SILICO* İNCELENMESİ

Sezen SPAHİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Geleneksel yöntemlerle yeni ilaçların geliştirilmesi pahalıdır ve uzun yıllar sürmektedir. Son yıllarda, bilgisayar destekli ilaç tasarımı, maliyet ve zaman gereksinimlerini önemli ölçüde azalttığı için yeni ilaç keşfi ve geliştirilmesi alanında büyük önem kazanmıştır. *T. annulata*, dünya çapında milyonlarca sığırı tehdit eden tropikal theileriosis'e neden olmaktadır. Theileriosis'in tedavisinde anti-theilerial ilaç olan buparvaquone kullanılmaktadır. Ancak, son zamanlarda *Theileria annulata*'nın ilaç direncinin bildirilmesi, theileriosis'in tedavi edilmesi için yeni ilaç adaylarının keşfedilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır.

Tez çalışmasında, ileri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanılmak üzere *Theileria annulata* peptidil prolil *cis/trans* izomeraz geni (*TaPIN1*) klonlanmış olup, inhibitor kütüphanesi *in silico* taranarak ilaç direnci rapor edilmiş *TaPIN1*'in inhibisyonuna yönelik aday moleküllerin belirlenmesi ve önerilen yaklaşımın aşırı ifade edilmiş Ras/Neu proteinlerce indüklenen insan PIN1 enzim kaynaklı kanserlerin tedavi edilmesine yönelik kurgunun yapılması gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının klonlama aşamasında ilk olarak, *Theileria annulata* peptidil prolil *cis/trans* izomeraz enzimini kodlayan dizi polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye

edilmiştir. Ardından, pLATE31 vektör sistemine aktararak, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. İntron bölgesi, Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit ile uzaklaştırılıp intronsuz rekombinant DNA *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilmiştir. İntronun uzaklaştırıldığı ve doğru gen dizisinin insersiyonu, DNA dizilime ile teyit edilmiş ve ileri çalışmalar için hazır hale getirilmiştir.

Tez çalışmasının bilgisayar destekli ilaç keşfi aşamasının ilk adımında, mutant ve yabanıl tip TaPIN1'in homoloji modelleri, MODELLER v9.15 yazılımı ile belirlenmiş olup, modellerin doğruluğu, çeşitli web sunucuları kullanılarak teyit edilmiştir. PubChem veri bankası kullanılarak oluşturulan 2979 naftokinon türevlerini içeren sanal kütüphane mutant TaPIN1'e karşı Schrödinger Glide HTVS, SP ve XP kenetlenme metodolojilerine göre taranmıştır. Kenetli bileşikler Glide Extra Precision (XP) skora fonksiyonu ile sıralanmış ve serbest bağlanma enerjileri Prime MM-GBSA yöntemi ile hesaplanmıştır. XP skor sıralamasına göre ilk iki sırada yer alan kenetli bileşikler (5304752 ve 9993782 Pubchem numaralı bileşikler) moleküler dinamik simülasyon çalışmalarında kullanılmıştır. AMBER programı kullanılarak, ligand bağlı olmadan yabanıl tip ve mutant TaPIN1'in simülasyonu 50 ns, ligand bağlı yapıların simülasyonu 100 ns'de gerçekleştirilmiştir. 5304752 PubChem numaralı ligandın hem yabanıl tip hem mutant TaPIN1'in aktif bölgesinde bulunduğu gözlenmiştir ve potansiyel inhibitör olarak değerlendirilebileceği öngörülmüştür. 9993782 PubChem numaralı ligandın yabanıl tip TaPIN1'in aktif bölgesinin dışında konumlandığı gözlenmiştir, fakat mutant TaPIN1'in aktif bölgesine yakın bir yerde bulunduğu gözlenmiştir ve mutant enzime karşı potansiyel inhibitör olarak değerlendirilebileceği öngörülmüştür. Ayrıca, bu sonuçlar doğrultusunda, öngörülen inhibitörler, TaPIN1 ile aynı mekanizmayı kullanarak, insanlarda kanser oluşumuna neden olan insan peptidil prolil enzimi (hPIN1) için de potansiyel inhibitörler olabileceği öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Theileria annulata*, TaPIN1, ilaç direnci, klonlama, biyoinformatik, moleküler kenetlenme, MD simülasyon.

ABSTRACT

***THEILERIA ANNULATA* PEPTIDYL PROLYL ISOMERASE GENE CLONING AND *IN SILICO* ANALYSIS OF CANDIDATE INHIBITORS FOR NEW ANTI- THEILERIAL DRUG DESIGN**

Sezen SPAHI

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

The development of new drugs with conventional methods is expensive and takes many years. Computer-aided drug discovery has gained great importance in the field of new drug discovery and development due to reduced cost and time requirements significantly in recent years. *T. annulata* causes the tropical theileriosis which threatens millions of cattle worldwide. Anti-theilerial drug buparvaquone is used to treat theileriosis. However, drug resistance reports in *Theileria annulata* suggest that new drug candidates need to be discovered to treat theileriosis.

In the thesis study, *TaPIN1* was cloned to be used for further *in vitro* characterization and inhibitor testing studies, inhibitor library was screened *in silico* for identification of candidate molecules to inhibit drug resistant *TaPIN1* and the treatment of human peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase enzyme derived cancers has been devised with proposed approach.

In the first step of the cloning phase, peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase coding sequence was amplified by PCR from *T. annulata* genome, then amplified gene was cloned into pLATE31 vector system and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. After that a non-coding region intron was removed by using Q5® Site-Directed Mutagenesis

Kit and the recombinant DNA was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. Removal of intron and insertion of the correct gene sequence was confirmed by DNA sequencing and was made ready for further studies.

In the first step of computer aided drug discovery, comparative models of the mutant and wild-type of *TaPIN1* were predicted by MODELLER v9.15 software and structure validation was performed by using various types of web-servers. Library of naphthoquinone derivatives was downloaded from the PubChem and was screened by the Schrödinger Glide HTVS, SP and XP docking methodologies. The docked compounds were ranked by the Glide Extra Precision (XP) scoring function and binding free energy of the docked compounds was calculated by Prime MM-GBSA method. The two highest ranks of the docked compounds (Pubchem IDs: 5304752 and 9993782) were used for molecular dynamic (MD) simulations studies. MD simulations for ligand unbound and bound proteins were performed for 50 ns and 100 ns respectively by using AMBER software. 5304752 ligand was located in the active site of both wild type and mutant *TaPIN1* enzymes, accordingly 5304752 was predicted as potential inhibitor. 9993782 ligand was located outside of the active site binding pocket of the wild-type *TaPIN1* enzyme. However, the presence of the ligand near the active site of the mutant *TaPIN1*, suggests that ligand can be predicted as a potential inhibitor for mutant enzyme. Also, identified ligands were speculated as potential inhibitors against human peptidyl prolyl isomerase enzyme which causes cancer in humans by using the same mechanism as *TaPIN1*.

Keywords: *Theileria annulata*, *TaPIN1*, drug resistance, cloning, bioinformatic, molecular docking, MD simulation.

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Theileriosis

Parazitler dünyada var olan en eski organizmalardır [1]. İnsanlar ve hayvanlarda meydana gelen önemli hastalıklardan sorumlu olan birçok parazit vektör kaynaklı olarak tanımlanmaktadır [2]. Keneler, beslenme sırasında virüs, bakteri ve parazit gibi patojenleri konak hücrelerine aktarabilen ikinci en yaygın eklem bacaklı vektör olarak kabul edilmektedir [3]. Kene kaynaklı hastalıklar, tüm dünyada etki gösterirken, en fazla tropikal ve sub-tropikal ülkelerde hüküm sürmektedir ve dünya sığır nüfusunun %80'ini etkilemektedir [4].

Theileriosis, *Theileria* cinsi protozoanların (familya: Theileriidae, sınıf: Sporozoa veya Apikompleksa) neden olduğu kene kaynaklı bir sığır hastalığıdır [5]. Başlıca geviş getiren hayvanlarda olmak üzere at ve köpeklerde de hastalığa neden olan *Theileria* cinsi parazitler Çizelge 1.1'de yer almaktadır [6]. Çizelgede de gösterildiği üzere 8 tür *Theileria* cinsi parazit sığırlarda hastalığa neden olurken keçi ve koyun gibi küçükbaş hayvanlarda 5 tür *Theileria* cinsi protozoan etki etmektedir. Ancak Tropical theileriosis'e neden olan *Theileria annulata* (*T. annulata*) ve Doğu Sahilleri Humması hastalığına neden olan *Theileria parva* (*T. parva*) sığır ve diğer geviş getiren hayvanlarda en fazla görülen patojenik türler olup, *T. mutans*, *T. taurotragi* ve *T. orientalis* sığır konak grubunda asemptomatik enfeksiyonlara neden olmaktadır [7]. Koyunlarda ise en fazla

görülen *Theileria lestoquardi* yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır [8].

Çizelge 1.1 Hastalığa neden olan *Theileria* türleri [6].

Tür	Konak	Tahmini/kanıtlanmış vektör keneler	Coğrafik dağılımı
<i>T. annae</i>	Köpek, tilki	<i>Ixodes, Rhipicephalus</i>	Avrupa
<i>T. annulata</i>	Sığır, Asya mandası, bizon	<i>Hyalomma</i>	Afrika, Avrupa, Asya
<i>T. buffeli</i>	Sığır, Afrika mandası, Asya mandası	<i>Haemaphysalis</i>	Asya, Avustralya, Avrupa, Afrika, Amerika
<i>T. equi</i>	At, eşek, katır	<i>Amblyomma, Dermacentor, Hyalomma, Rhipicephalus</i>	Asya, Avustralya, Avrupa, Afrika, Amerika
<i>T. lestoquardi</i>	Koyun ve keçiler	<i>Hyalomma</i>	Avrupa, Asya, Afrika
<i>T. luwenshuni</i>	Koyun ve keçiler	<i>Haemaphysalis</i>	Asya
<i>T. mutans</i>	Sığır, Afrika mandası	<i>Amblyomma</i>	Afrika
<i>T. orientalis</i>	Sığır	<i>Haemaphysalis</i>	Asya, Avustralya, Avrupa, Afrika, Amerika
<i>T. ovis</i>	Koyun ve keçiler	<i>Rhipicephalus</i>	Avrupa, Asya, Afrika
<i>T. parva</i>	Sığır, Afrika mandası, Asya mandası, antilop	<i>Rhipicephalus</i>	Afrika
<i>T. separata</i>	Koyun ve keçiler	<i>Rhipicephalus</i>	Afrika
<i>T. sergenti</i>	Sığır, Asya mandası	<i>Haemaphysalis</i>	Asya
<i>T. taurotragi</i>	Sığır, koyun, keçi, antilop	<i>Rhipicephalus</i>	Afrika
<i>T. uilenbergi</i>	Koyun ve keçiler	<i>Haemaphysalis</i>	Asya
<i>T. velifera</i>	Sığır, Afrika mandası	<i>Amblyomma</i>	Afrika

Apicomplexa parazitleri arasında *Theileria* cinsi konak hücrelerini transforme etme yeteneğine sahip olup, hücrelerde kontrolsüz proliferasyon, apoptoza direnç, hücresel göç ve metastazda artış ile malign fenotip oluşmasına neden olmaktadır [9]. Enfeksiyon döngüsü *Theileria* başlığı altında daha detaylı incelenmiş olup (Şekil 1.1) [10], kısaca vektör kenelerin beslenmesi sırasında 0,75-1,5 µm sporozitlerin konak hücreye inokulasyonu ile başlamaktadır. Ardından sporozoitler 5 dakika içinde konak lökositleri istila ederek makroşizont yapılarını oluşturmaktadırlar. Makroşizont enfekte lökositler apoptoza dirençli hale gelerek devamlı çoğalırlar ve farklı organlara yayılarak konağın ölümüne sebep olmaktadır [11].

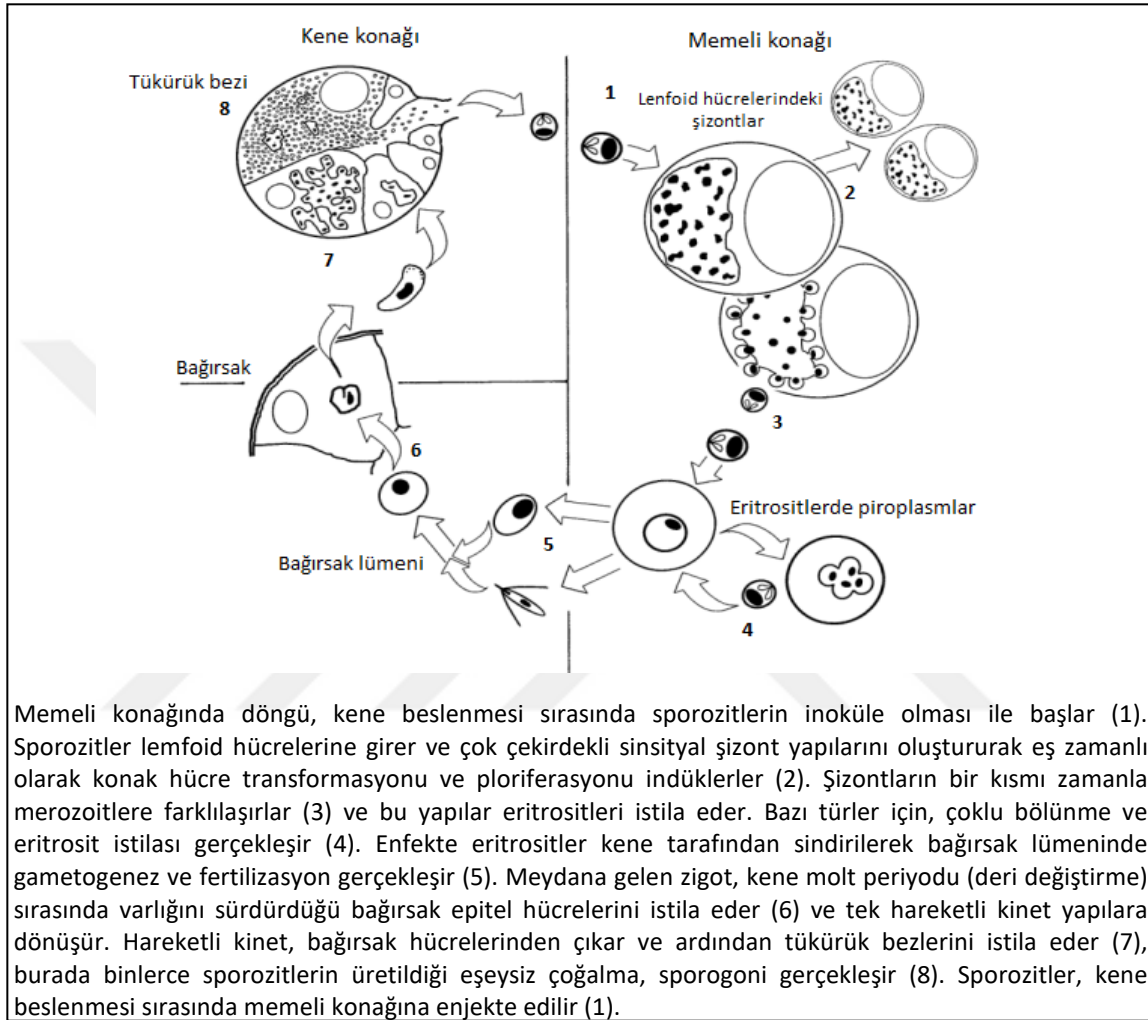
Theileria türlerinin teşhisi için kullanılan yöntemlerden biri Giemsa ile boyanmış kan/lenf nodu veya dalak yaymalarında parazitin mikroskopik incelenmesidir [12]. Yöntem ucuz ve kolay olmasına karşın, enfekte hayvanlar farkedilememektedir ve *Theileria* türlerinin morfolojik yapıları birbirine çok benzer olduğu için bu yöntemle ayrımları zordur [13]. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için, daha hızlı ve doğru sonuçlar veren moleküler yöntemler geliştirilmiştir [14]. Moleküler yöntemler arasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) [15] ve PCR varyasyonları [6], [16], Reverse Line Blot (RLB) hibridizasyon [14], halka aracılı izotermal amplifikasyon (a loop-mediated isothermal amplification-LAMP) [17] gibi yöntemler yer almaktadır. Mikroskopik incelemelere kıyasla daha hassas sonuç veren dolaylı floresans antikor testi (indirect fluorescence antibody test-IFAT) [18] ve enzim bağımlı immüno sorbent deneyi (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) [19] serolojik testler arasında yer almaktadır.

Theileria enfekte hayvanların tedavisinde tek doz 2,5 mg/kg buparvaquone (Butalex®) [20] ve 48 saat aralıkla iki doz 20 mg/kg parvaquone (Clexon®) ilaçları başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [21].

1.1.2 *Theileria*

Theileria, dünyada çapında yabani ve domestik toynaklılara bulaşan, ixodid kene kaynaklı, hücre içi protozoan parazitler olup, canlı hayvan sağlığı ve üretimi üzerindeki etkileri nedeniyle büyük ekonomik kayıplara sebep olan hastalıkları oluşturmaktadır [22], [23], [24]. Veterinerlik açısından endişe oluşturan *Theileria* türleri Çizelge 1. 1’de listelenmiştir [6].

Theileria parazitlerinin hem kene hem de memeli konaklarında morfolojik olarak farklı gelişim aşamalarını içeren karmaşık yaşam döngüleri vardır (Şekil 1.1). Ancak, gelişim süreçlerindeki varyasyonlar, replikasyon döngülerindeki bazı farklılıklar ve aşamalarda meydana gelen boyut farklılıkları dışında tüm türlerin yaşam döngüleri benzerdir [25].



Şekil 1.1 *Theileria* parazitlerin yaşam döngüsü [25].

1.1.2.1 *Theileria annulata*

Protozoan paraziti *Theileria annulata*, Güney Avrupa ve Kuzey Afrika'dan başlayıp, Ortadoğu ve Güney Rusya boyunca Hindistan'a ve muhtemelen Güney Çin'e kadar geniş bir alanı kapsayarak yabani ve evcil hayvanları enfekte etmektedir [26]. Parazit iki veya üç *Hyalomma* cinsi konak kene kaynaklı, sığırlarda tropikal theileriosis hastalığına neden olup ekonomik olarak önemli kayıplara yol açmaktadır [27].

T. annulata, yaklaşık 250 milyon sığırı tehdit etmektedir ve birçok gelişmekte olan ülkede hayvancılık üretiminde önemli bir engel oluşturmaktadır [28]. Tedavi yokluğunda ise enfekte egzotik ırk sığırların %40-50 oranında ölüm ile sonuçlandığı bildirilmiştir [29]. Tropikal theileriosis, tek başına dünya çapında yıllık kayıplara bağlı olarak 800 milyon dolar maliyete neden olmaktadır [30]. Hastalık, en fazla endemik bölgelerde bulunan egzotik sığırları etkilemekte olup sadece Hindistan'da 384,3 milyon dolar ekonomik kayba yol açmaktadır [31].

T. annulata'nın yaşam döngüsü diğer *Theileria* türleri ile benzer olup Şekil 1.1' de gösterilmiştir. *T. annulata* monosit ve B hücrelerini enfekte etmektedir [32]. Enfekte hayvanlarda lenf bezlerinde şişme, ateş, solunum yetmezliği, burun akıntısı, kornea opaklaşması, kırmızı kan hücrelerinde azalma ve anemi ortaya çıkmaktadır [33], [34], [35].

T. annulata parazitin tanınması için kullanılan moleküler yöntemler arasında RLB [36], süspansiyon dizisi [37] ve serolojik tanı yöntemleri arasında IFAT ve ELISA [38] yer almaktadır. Tropikal theileriosisin tedavisi, anti-theilerial ilaçlar ile özel tedavi ve semptomatik tedavi ile sağlanmaktadır. Parvaquone (Parvexon ND, Bimeda) şizontlara karşı aktif anti-theilerial ilaç olup tek doz veya iki doz 20 mg/kg etkili olurken, buparvaquone (Butalex ND, Schering-Plough; Teldex ND, Médivet) hem şizont hem de piroplazmlara karşı etkinlik gösterip tek doz 2,5 mg/kg etkili olmaktadır. Semptomatik tedavide ise detaylı bir klinik muayeneden sonra enfekte hayvanın durumuna bağlı olarak tedavisi gerçekleştirilmektedir [39].

1.1.3 *Theileria annulata* ile Konak Hücre Manipülasyonu

Protozoan parazitleri, enfekte konak hücrenin fenotipini belirleyen moleküler yolları manipüle etmektedir [40]. Parazitler, konak lenfositlerini transforme ederek ve hücre bölünmesini senkronize ederek yavru lenfosit hücrelerinde enfeksiyonun muhafaza edilmesini sağlayan benzersiz bir kabiliyete sahiptir [41]. 'Transformasyon' enfekte hücrelerde kontrolsüz çoğalma, hücre farklılaşma belirteçlerin kaybı ve fonksiyon kaybı olarak karakterize edilmektedir ve *Theileria* parazitlerin memeli konağında yaşam döngüsü sırasında (Şekil 1.1) makroşizont yapıların oluşumu ile eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir [40]. Transformasyona bağlı meydana gelen fenotipik değişiklikler

hiperproliferasyon, hücre immortalizasyonu ve yayılımı gibi önemli kanser benzeri özellikleri göstermektedir [42], [43]. Kanser benzeri özellik gösteren hücrelerin oluşmasına neden olan *Theileria* enfeksiyonu, lösemi gibi tümör araştırmaları için makul bir model olarak değerlendirilmektedir [44].

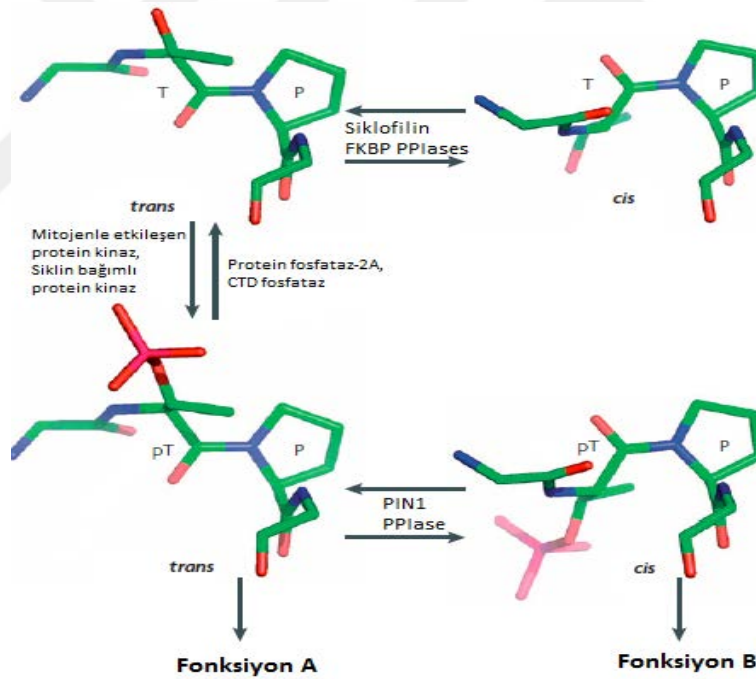
İnsan kanser oluşumuna neden olan Ras/Neu onkogenik sinyal yolağında, Ha-Ras ve Neu proteinleri insan peptidil prolil izomerazının (hPIN1) aşırı ifade edilmesine [45], bu bulguyu takiben PIN1'in ifade edildiği Ras/Neu-ekspresyon hücrelerinde açık bir şekilde endojen tümör baskılayıcı FBW7 protein seviyesindeki azalma, c-Jun gibi protoonkogen seviyesinin artışına dolayısıyla tümör oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir [46]. Ayrıca, *Theileria* parazitleri tarafından enfekte edilen hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar ile transforme edilmiş sığır lökositlerinde c-Jun protoonkogen seviyesinin arttığı gözlenmiştir [47]. Bu iki sonuç J. Marsolier ve arkadaşlarını *Theileria annulata* parazit peptidil prolil izomerazın (*Ta*PIN1) sığır FBW7 proteini ile etkileşebileceği fikrine yöneltmiş olup, *in vitro* çalışmalar sonucunda, *Theileria* enfekte sığır hücrelerinde *Ta*PIN1'in konak FBW7 ile etkileşime girererek kararlılığını bozarak kanser benzeri fenotipin ortaya çıkmasına neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *Ta*PIN1 enziminin, etkili anti-theilerial ilaç olan buparvaquone'a direnç gösteren A53P mutasyonu içerdiği bildirilmiştir [48]. İnsan peptidil prolil izomeraz enzimi ve kanser arasındaki metabolik ilişki, insan PIN1 ile aynı mekanizmayı kullanarak enfekte hayvanlarda kanser benzeri fenotipin ortaya çıkmasına neden olan *T. annulata* peptidil prolil izomeraz enzimi ve mutasyonuna bağlı ilaç direnci tez içeriğinde ayrı ayrı incelenmiştir.

1.1.4 İnsan Peptidil Prolil *cis/trans* İzomeraz Enzimi

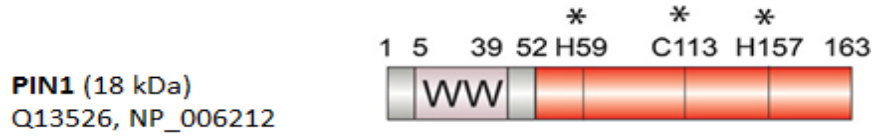
Peptidil prolil izomerazlar (PPlaz), prolin *cis/trans* izomerizasyonunu katalizleyerek protein katlanması ve düzenlenmesinde yaygın olarak rol alan FK506 bağlanma proteinleri, siklofilinler ve parvulinleri içeren şaperon süper ailesinden oluşmaktadır [49]. Bu üç aile yapısal olarak birbirlerinden farklıdır [50]. Parvulinler PPlaz'ın en küçük ailesini teşkil etmektedir ve peptidil prolil *cis/trans* izomeraz NIMA ile etkileşen protein 1 (PIN1), parvulin-14 ve parvulin-17 proteinlerinden oluşmaktadır [49]. PIN1, diğer PPlaz'lardan farklı olarak özellikle prolinden önce gelen fosfo serin veya treonin (pSer/Thr-Pro) peptid dizisini tanımaktadır (Şekil 1.2) [51]. pSer/Thr-Pro fosforilasyon

motifi hücrelerde önemli düzenleyicilerdir ve PIN1'in fosforilasyona spesifik bir peptidil prolil izomeraz olarak tanımlanması, fosforilasyondan sonra substratların konformasyonunu katalizleyerek daha ileri protein fonksiyon kontrolünü düzenlemektedir [52].

İnsan PIN1'i 163 amino asit içeren küçük bir protein olup iki tane yapısal bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1.3). N terminal WW belgesi, 39 amino asit rezidüsü içermektedir ve tahmini substrat bağlanma bölgesidir [53]. C terminal ise *cis/trans* katalitik peptidil prolil izomeraz PPlaz bölgesidir [53], [54]. WW bölgesinin varlığı, enzim katalitik aktivitesini veya substratın katalitik bölgeye bağlanmasını önemli ölçüde etkilememektedir [55], [56]. Lys63, Arg68 ve Arg69 rezidüleri temel olarak substrat fosfat bağlanmasından sorumludur [55], [57]. Katalitik aktiviteden sorumlu olan rezidüler ise His59, Cys113 ve His157'dir (Şekil 1.2) [58].



Şekil 1.2 PIN1 tarafından katalizlenen pSer/Thr-Pro motiflerinin konformasyonel geçişi [52]. CTD fosfataz; RNA polimeraz-II C-terminal domain fosfataz.



Şekil 1.3 İnsan PIN1 protein bölgelerinin şematik gösterimi [58]. Protein büyüklüğü parantez içinde belirtilmiştir. UniProtKB/Swiss-Prot veritabanı ve NCBI Referans Dizi erişim numaraları verilmiştir. Katalitik bölge kırmızı ile işaretlenmiştir. WW, WW tahmini substrat tanıma bölgesi; * kataliz için önemli olan amino asit rezidüleri.

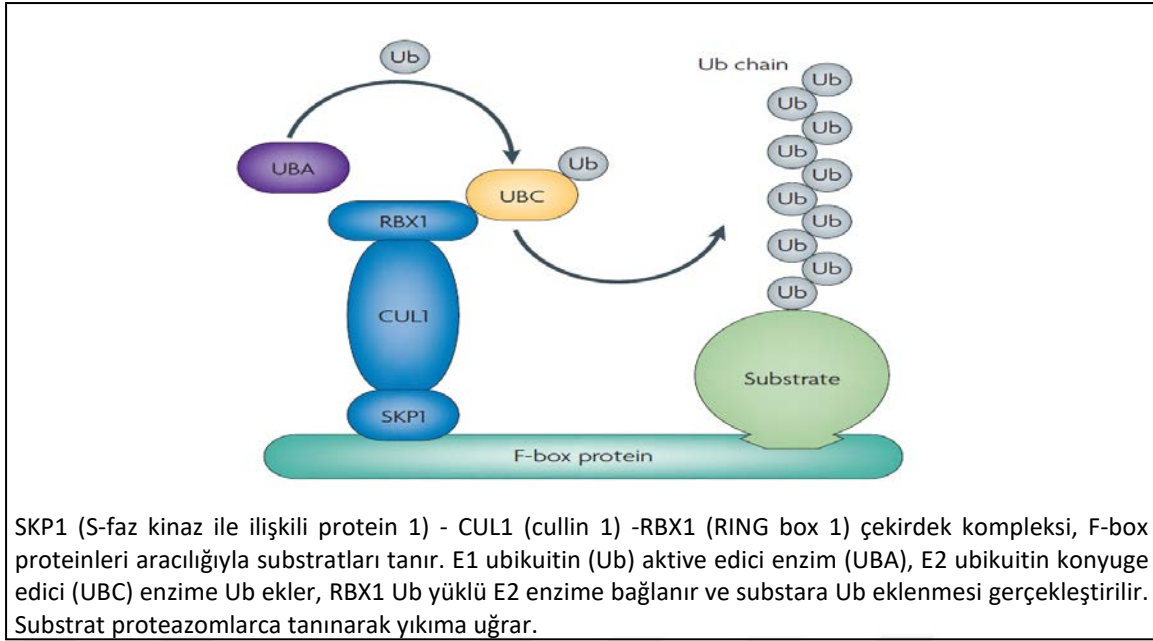
1.1.5 İnsan PIN1 ve Kanser Arasındaki Metabolik İlişki

PIN1, birçok fosforile protein ile etkileşime girerek protein stabilitesinin, enzim aktivitesinin, protein etkileşimlerinin, protein işlenmesinin, translasyon sonrası modifikasyonların veya lokalizasyonun düzenlenmesinde rol oynar [52], [58]. PIN1'in, özellikle proline yönelik fosforilasyonun düzenlenmesindeki önemli rolü göz önüne alındığında, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir ve buna bağlı olarak dereglasyonu çeşitli patolojik koşullara, en önemlisi kansere neden olmaktadır. PIN1, tümör baskılayıcı fonksiyona sahip Fbw7 proteini ile etkileşime girerek negatif düzenlenmesinde rol alıp tümör oluşumuna katkıda bulunmaktadır [46].

1.1.5.1 İnsan PIN1 Tarafından FBW7 Tümör Baskılayıcı Fonksiyonunun Negatif Düzenlenmesi

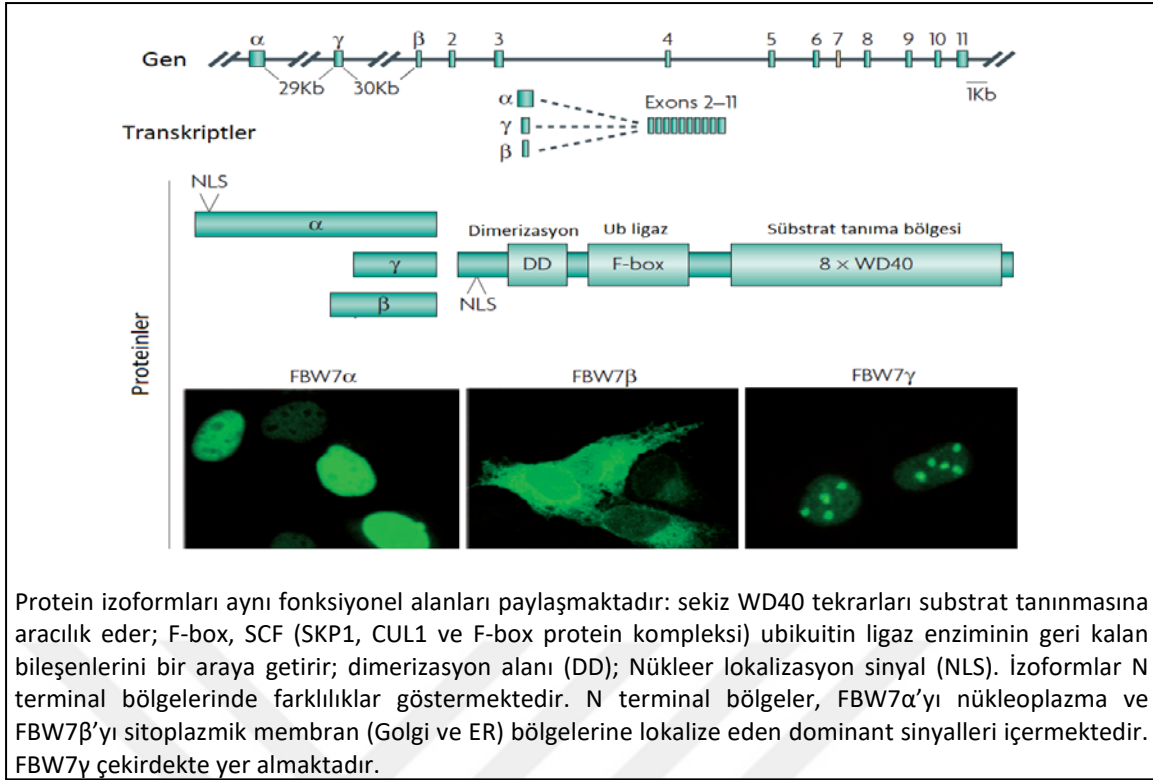
FBW7'nin Tümör Baskılayıcı Görevi

Ubikuitin – proteazom sistemi tarafından protein yıkımı çok çeşitli hücresel proseslerin kontrolünde yer almaktadır. Ubikuitin aracılı proteolizin başlaması, substratın proteazom tarafından tanınması ve degradasyonu için sinyal oluşturan K48 poliubikuitin zincirlerin substrata eklenmesi ile sağlanmaktadır [59]. Protein ubikuitin eklenmesi, sırasıyla ubikuitin- aktive edici (E1), ubikuitin-konjuge edici (E2) ve ubikuitin – protein ligaz (E3) enzimlerin aktiflik göstermesiyle gerçekleşmektedir [60]. SCFs (Skp1, Cullin-1, F-box protein) (Şekil 1.4) kanser biyolojisinde önemli role sahip olan E3 enzim sınıfında yer almaktadır. SCFs, Cullin-1'i yapı iskelesi ve F-box proteinlerini substrat reseptörü olarak kullanmaktadır [59].



Şekil 1.4 E3 SCF (SKP1, CUL1 ve F-box protein kompleksi) ubiquitin ligaz enziminin şematik gösterimi [61].

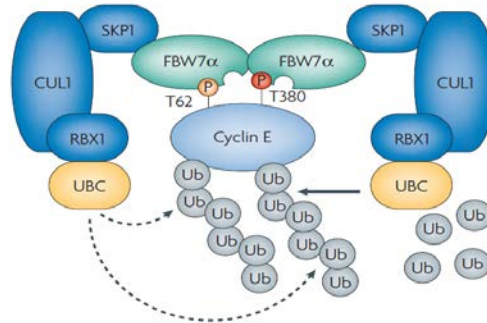
FBW7 (F box ve WD tekrar alanı içeren 7), SCF ubiquitin ligaz kompleksinin substrat tanıma bileşenidir. SCF^{FBW7} ubiquitin ligaz, MYC, siklin E, Notch ve JUN gibi hücreyel büyüme ve bölünme yollarında fonksiyon gören proto-onkojenleri parçalar. İnsan FBW7, 4. kromozomda yer alan 200 kb (kilobaz) uzunluğunda bir genidir. Alternatif uçbirleştirme ile üç tane transkripti kodlamaktadır: FBW7 α , β ve γ . Her mRNA, üç protein izoformunu oluşturan, izoforma özgü ilk ekzonu içermektedir ve ilk ekzona bağlı ortak olarak paylaşılan 10 ekzon bulundurmaktadır (Şekil 1.5) [61].



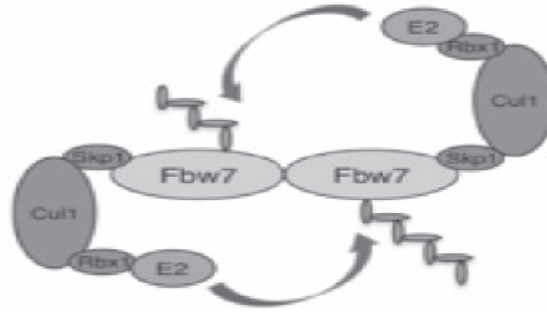
Şekil 1.5 FBW7 gen organizasyonu ve protein izoformları [61].

FBW7 Dimerizasyonu ve Önemi

Dimerizasyon ile FBW7, birbirinden bağımsız iki tanıma bölgesi ile substratı hedef alır böylece substrat degradasyon etkinliği artar (Şekil 1.6) [61], [62]. Ayrıca, monomerleri etkisiz kılan mutasyonlar ortamında dimerizasyon FBW7'nin fonksiyonunu koruyarak dayanıklılığını arttırmaktadır. Son olarak, dimerizasyon FBW7 *trans*-otoubikuitinasyonuna (*trans* formunda kendi kendine ubiquitin ekleme) (Şekil 1.7) destekleyerek hücre içerisinde FBW7 seviyesinin dengede olmasına katkı sağlar [62].



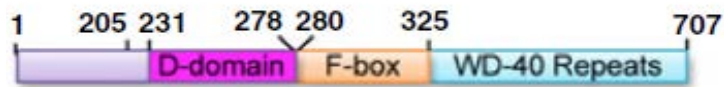
Şekil 1.6 İki degron yoluyla dimerik FBW7 bağlı siklin E modeli [61]. Siklin E hiperfosforilasyon bölgeleri (T62 VE T380), her iki bölgeye bağlanma imkanı sağlayan, FBW7 için yüksek afinite oluşturur.



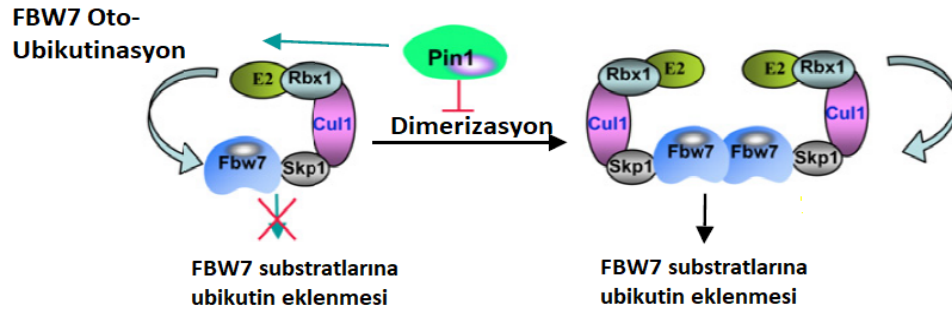
Şekil 1.7 Dimerizasyon ile FBW7 *trans*-otoubikuitinasyon modeli [62].

İnsan PIN1'in FBW7 Dimerizasyonunu Bozarak Kararlılığını Düzenlemesi

FBW7 dimerizasyonu birçok SCF E3 ligaz kompleksinde E3 ubiquitin ligaz enziminin substrata karşı aktivite göstermesinin yanı sıra hücre içerisinde FBW7 seviyesinin dengede olmasına katkı sağlar. Evrimsel olarak korunmuş olan D-domain (dimerizasyon domain) FBW7 proteininde F-box motifinin hemen yanında yer almaktadır ve Şekil 1.8'de görüldüğü üzere PIN1 bağlanma bölgesi pThr205-Pro (T205) D-domainine yakın bir yerde bulunmaktadır. Daha da önemlisi, Fbw7'nin fonksiyonel SCF kompleksini oluşturmasında yardımcı olan F-box motifinin çıkartılması PIN1'in Fbw7 ile etkileşimine etki etmemektedir. Buna göre, PIN1, Fbw7'nin aktif SCF E3 ligaz kompleksini oluşturmasını inhibe etmemektedir. Sonuç olarak Pin1'in Fbw7 kararlılığını düzenleyebilme kabiliyetinin Fbw7 dimerizasyonunu engelleme yeteneğinden kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki Fbw7 monomerleri, substratları etkin bir şekilde ubiquitin eklenmesini sağlayan aktif SCF^{Fbw7} kompleksin oluşmasına destek sunar. Bu açıdan, PIN1, FBW7'de konformasyonel değişikliğe neden olup dimerizasyonunu bozmakta, monomerleri inaktive etmekte ve E3 ligaz aktivitesinin kendisine doğru aktifleşip oto-ubikuitinasyonunu arttırmaktadır (Şekil 1.9). Proteazomlarca tanınan ubiquitin yüklü FBW7 yıkıma uğratılarak, hücre ortamında FBW7 seviyesi azalır [46].



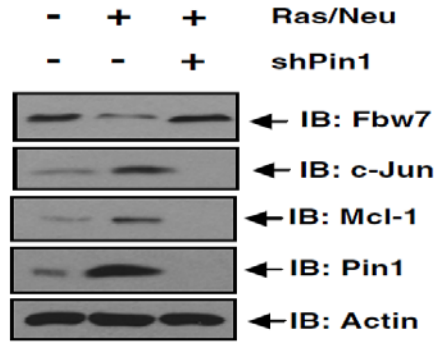
Şekil 1.8 FBW7 tanımlanan D-domain ve F-box motifinin şematik gösterimi ve PIN1 bağlanma bölgesi [46]



Şekil 1.9 PIN1 ile FBW7 otoubikuitinasyonu ve FBW7 dimer oluşumunun inhibisyonu şematik gösterimi [46]

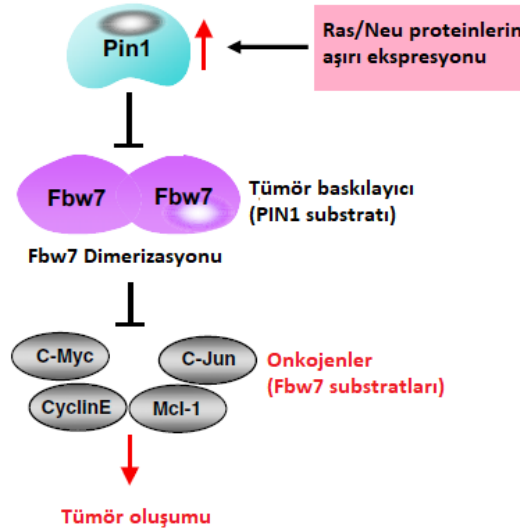
Ras/Neu Proteinleri Tarafından İndüklenen İnsan PIN1 Aracılı FBW7 Baskılanması ile Tümör Oluşumu

FBW7 tümör baskılayıcı fonksiyonunun düzenlenmesinde PIN1'in kritik rolü göz önüne alındığında, kanser gibi patolojik durumlarda, sinyal yollarında yanlış düzenlenmeler sonucu PIN1'in aşırı ekspresyonu FBW7 tümör baskılayıcı fonksiyonunun inaktive olmasına neden olabilir. Meme kanser hücrelerinde, aktif Neu ve Ras proteinleri, E2F transkriptör proteinin aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir [63]. PIN1 promotörü, E2F transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilmektedir ve meme kanser hücrelerinde seviyesi oldukça artmış durumdadır. Bu durum göze alındığında, Ras ve Neu proteinleri E2F aracılığı ile PIN1 promotor aktivitesini arttırdığını düşündürmektedir. Kanserli ve sağlıklı meme epitel hücreleri (MCF-7 ve MCF10A sırasıyla) ile ve meme tümör virüsü-Neu veya meme tümör virüsü-Ras transgenik fareleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, Ras ve Neu proteinleri tek başına PIN1'in E2F transkriptör protein bağlanma bölgesine bağlanarak PIN1'in aşırı ifade edilmesine neden olduğu gibi, E2F transkripsiyon faktörü ile birlikte Ras/Neu proteinlerin transfeksiyonu sonucunda PIN1 seviyesinde daha ileri artış gözlenmiştir [45]. Bu bulguları takiben, PIN1'in aşırı ifade edilmesine neden olacak şekilde oluşturulan Ras/Neu-ekspresyon hücrelerinde açık bir şekilde endojen FBW7 protein seviyesinde azalma, FBW7 substratları olan c-Jun ve Mcl-1 proto-onkojen seviyelerinde artma gözlenmiştir (Şekil 1.10) [46].



Şekil 1.10 Onkojen Ras ve Neu proteinlerini ifade edecek şekilde oluşturulan MCF10A (meme hücresi) hücrelerinden elde edilen tüm-hücre lizatlarının immünoiblot analizleri. ShPIN1 lentiviral vektör endojen PIN1 baskılanması için ve Aktin kontrol amaçlı kullanılmıştır [46].

Önemli olarak, Ras/Neu-ekspresyon hücrelerinde PIN1'in baskılanması FBW7 ekspresyon seviyesinin onarımına ve bunu takiben çeşitli FBW7 substrat seviyesinde azalmaya yol açmaktadır. Onkojenik Ras/Neu yolağı aracılığı ile FBW7 aktivitesini baskılayan PIN1, tümör oluşumuna neden olan muhtemel yol olabilir (Şekil 1.11). Buna bağlı olarak, yapılan çalışma ile tümör hücrelerinde PIN1'in aşırı ekspresyonu FBW7 dimer oluşumunu bozarak, tümör oluşumunu kolaylaştıran FBW7 E3 ligaz aktivitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmektedir [46].

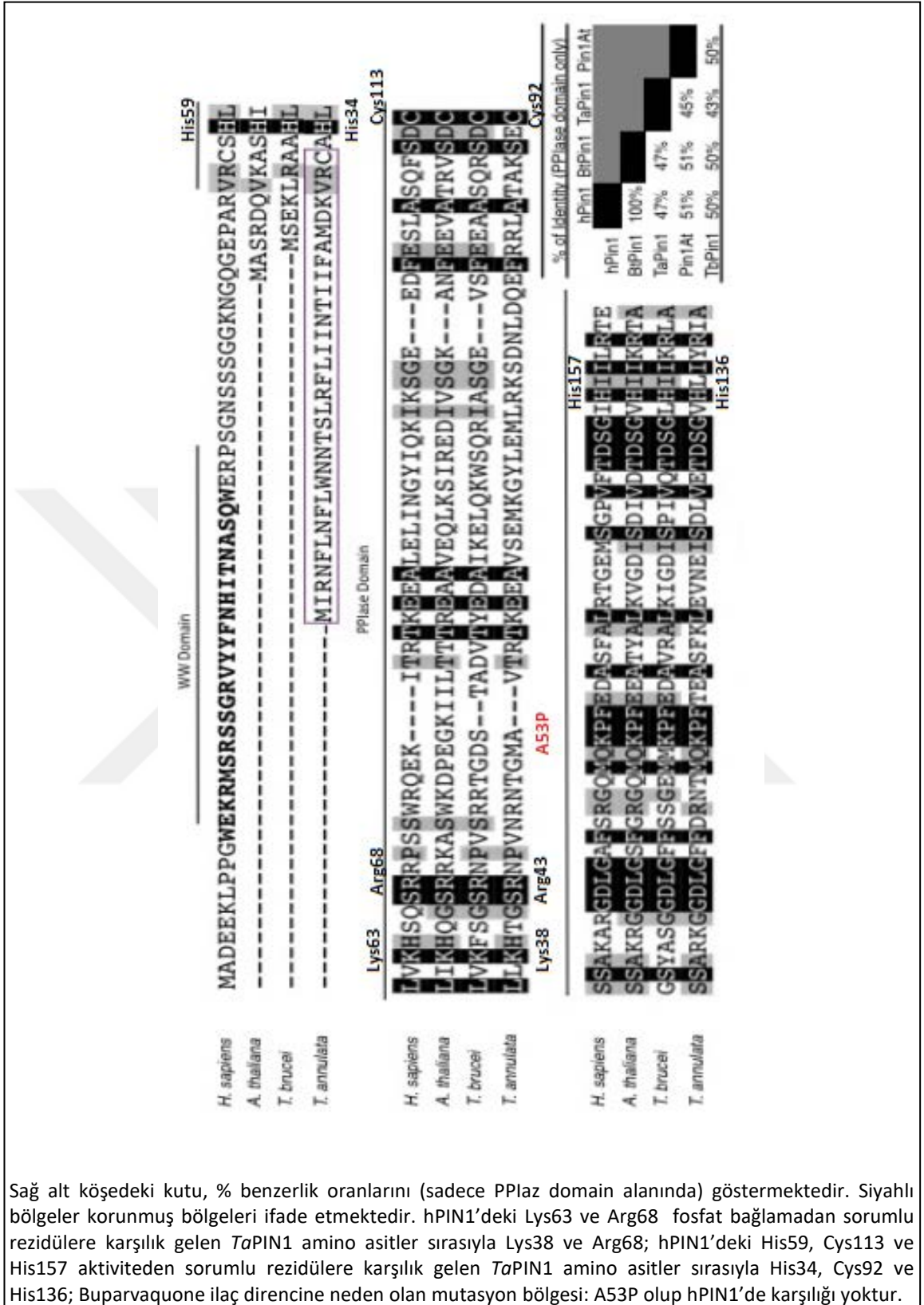


Şekil 1.11 PIN1 aracılı FBW7 aktivitesini baskılanarak tümör oluşumuna neden olan muhtemel yolun şematik gösterimi. PIN1'in aşırı ekspresyonu, Fbw7 tümör fonksiyonunu, Fbw7 dimerizasyonunu baskılamak suretiyle negatif düzenleyerek onkojen seviyelerin artmasına neden olmaktadır [46].

1.1.6 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimi ve Mutasyonuna Bağlı İlaç Direnci

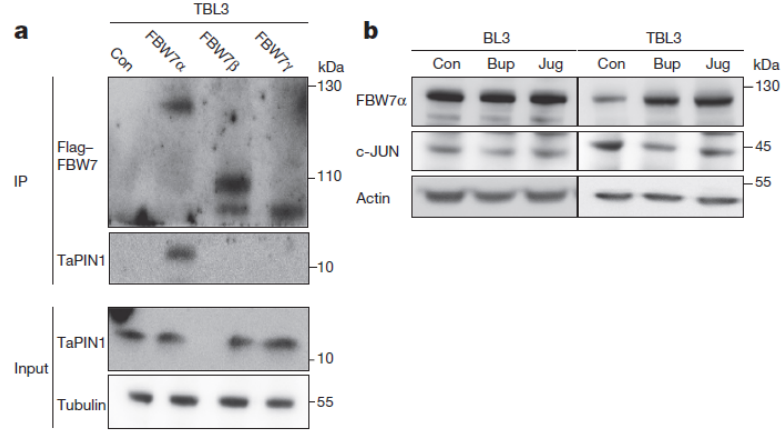
J. Marsolier ve ark. *T. annulata* tarafından hücre konağına salgılanan proteinleri tanımlamak için, parazit genomunun *in silico* görüntülemesini gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda, insan parvulin (hPIN1) homologu olan *Theileria annulata* peptidil prolil izomeraz TaPIN1 proteini belirlenmiştir. TaPIN1, bir tane intron içeren 572 baz çiftli küçük bir gendir. TaPIN1 proteini, PPlaz bölgesi içerisinde hPIN1 ile %47'den fazla özdeşlik sergilemektedir. PIN1 homologu olan *Arabidopsis thaliana* PIN1At ve *Trypanosoma brucei* BtPIN1'de olduğu gibi TaPIN1'de de enzim katalitik aktivitesini veya substrat bağlanmasını etkilemeyen WW tahmini substrat tanıma bölgesinden yoksundur (Şekil 1.12) [48]. hPIN1'de yer alan, temel olarak substrat fosfat bağlanmasından sorumlu olan rezidülere karşılık gelen TaPIN1 amino asitler Lys38 ve Arg43 olup korunmuş bölgelerdir. hPIN1'de katalitik aktiviteden sorumlu rezidülere karşılık gelen TaPIN1 amino asitler His34, Cys92 ve His136 korunmuş bölgelerdir (Şekil 1.12).

İnsan PIN1 ile FBW7 etkileşiminin incelenmesi sonucunda tümör oluşumuna katkı sağlayan c-Jun gibi protoonkogen seviyesinin arttığı [46] ve *Theileria* parazitleri tarafından enfekte hayvanlarda yapılan çalışmalar ile transforme edilmiş sığır lökositlerinde c-Jun seviyesinin arttığı gözlenmiştir [47]. Bu iki sonuç J. Marsolier ve arkadaşlarını TaPIN1'in sığır FBW7 proteini ile etkileşebileceği fikrine yöneltmiştir. *In vitro* çalışmalar sonucunda *Theileria* enfekte sığır hücrelerinde TaPIN1'in konak FBW7 ile etkileşime girererek kararlılığını düzenlediği belirlenmiştir. Parazitli hücrelerde, TaPIN1 ile özel olarak FBW7α izoformunun birlikte immün çöktürmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.13a). TBL3 (*Theileria* enfekte sığır B lenfosarkoma) hücrelerinde enfekte olmayan hücrelere göre FBW7α protein seviyesinin azalmış ve substratı olan c-JUN seviyesinin artmış durumda olduğu gözlenmiştir (Şekil 1.13b). Farmakolojik olarak TaPIN1 inhibisyonu FBW7 protein ekspresyon seviyesini onarken c-Jun seviyesi azalmıştır (Şekil 1.13b) [48]. Sonuç olarak, TaPIN1 konak hücrenin FBW7 aktivitesini baskılayarak, enfekte hayvanlarda protoonkogen seviyesinin artmasına ve tümör benzeri fenotipin oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 1.14).

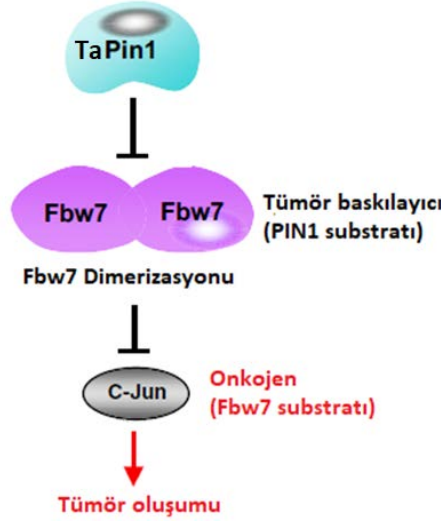


Sağ alt köşedeki kutu, % benzerlik oranlarını (sadece PPLase domain alanında) göstermektedir. Siyahlı bölgeler korunmuş bölgeleri ifade etmektedir. hPIN1'deki Lys63 ve Arg68 fosfat bağlamadan sorumlu rezidüleri karşılık gelen TaPIN1 amino asitler sırasıyla Lys38 ve Arg68; hPIN1'deki His59, Cys113 ve His157 aktiviteden sorumlu rezidüleri karşılık gelen TaPIN1 amino asitler sırasıyla His34, Cys92 ve His136; Buparvaquone ilaç direncine neden olan mutasyon bölgesi: A53P olup hPIN1'de karşılığı yoktur.

Şekil 1.12 *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Trypanosoma brucei* ve *Theileria annulata* PIN1 dizi karşılaştırması [48].



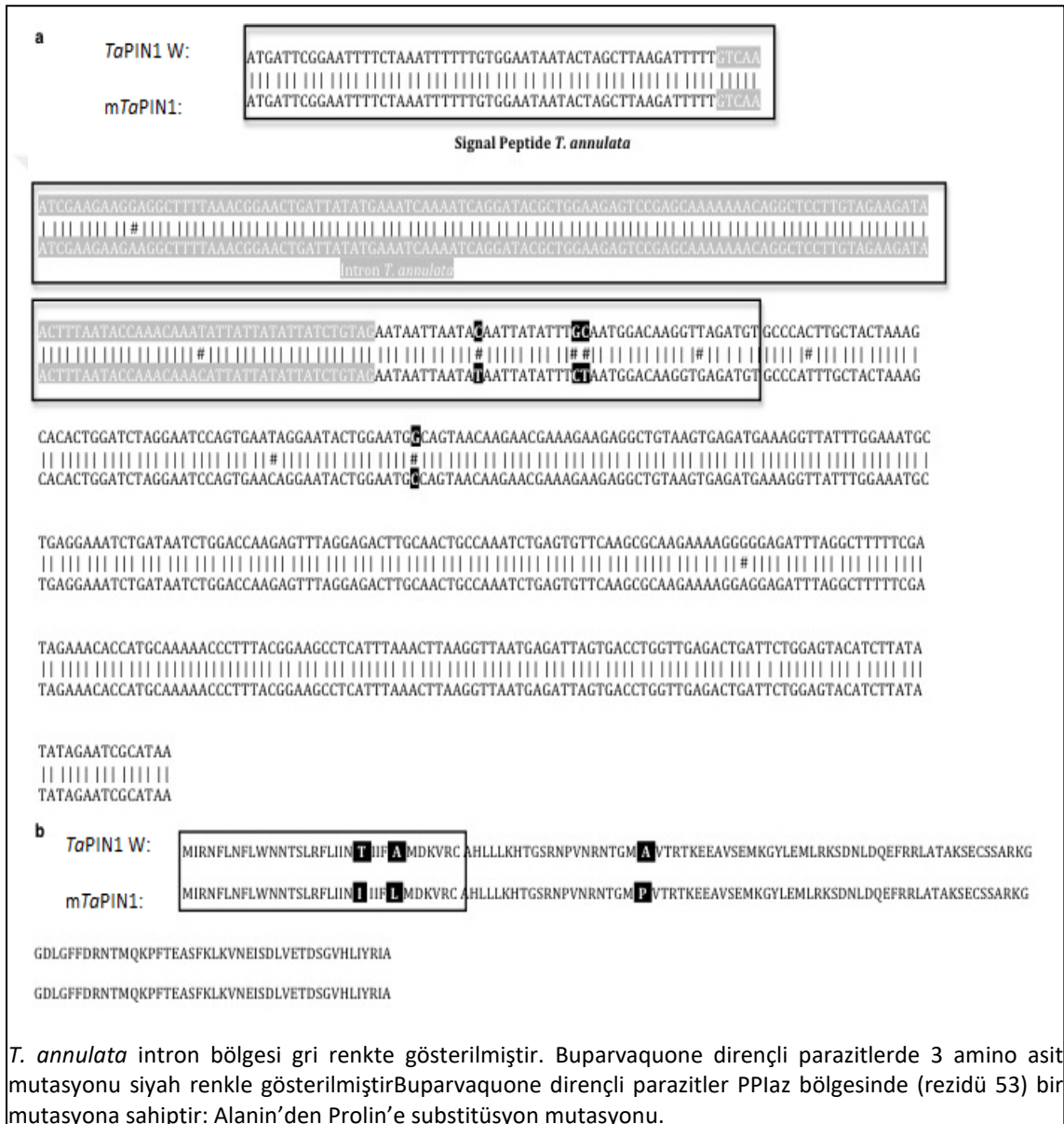
Şekil 1.13 **a** Endojen TaPIN1, FBW7α ile etkileşime girmektedir. **b** TBL3 (*Theileria* – enfekte sığır B lenfosarkoma) hücrelerinde TaPIN1 buparvaquone (Bup) ve veya juglone (Jug) inhibisyonu FBW7α protein seviyesinin artmasına ve c-JUN ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olmaktadır [48].



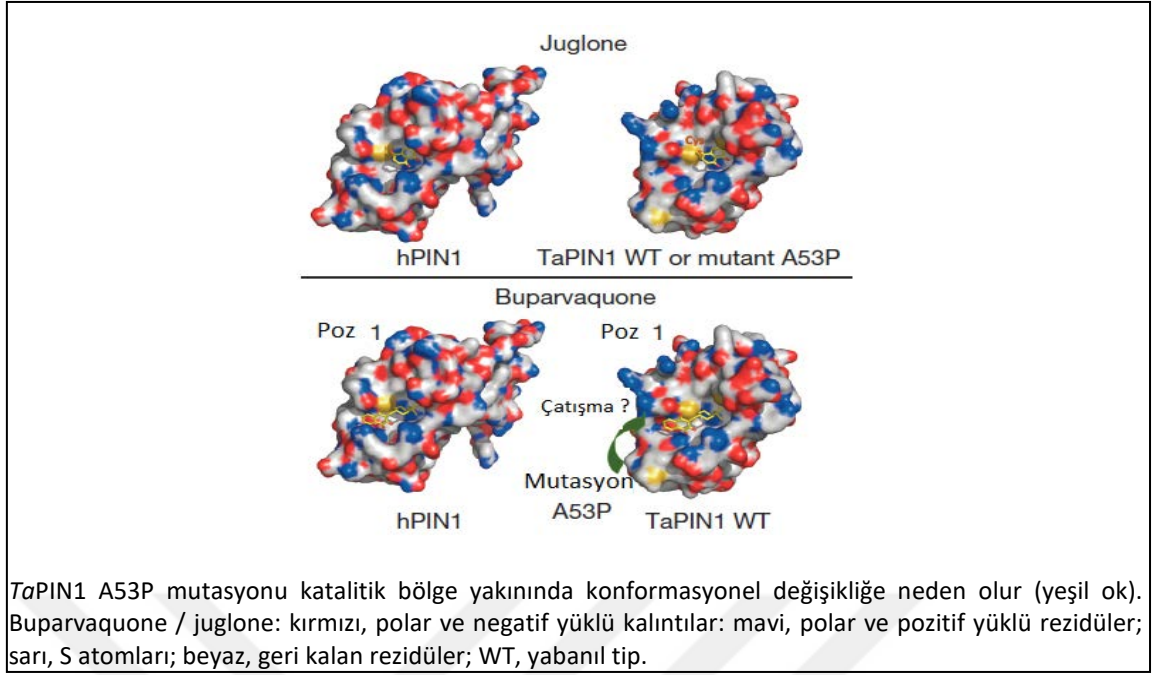
Şekil 1.14 TaPIN1 aracılı konak FBW7 aktivitesinin baskılanarak enfekte hayvanlarda tümör benzeri fenotipin oluşmasına neden olan yolun şematik gösterimi [46] kaynağından esinlenerek hazırlanmıştır. TaPIN1, Fbw7 tümör fonksiyonunu, Fbw7 dimerizasyonunu baskılamak suretiyle negatif düzenleyerek c-JUN onkojen seviyesinin artmasına neden olmaktadır.

J. Marsolier ve arkadaşları, ilaç direnci gösteren enfekte sığırlardan elde ettikleri izolattan TaPIN1 DNA dizileme sonucunda, genin katalitik bölgesinde A53P substitüsyon mutasyonunu belirlediler (Şekil 1.15). Yapısal modelleme, bu mutasyonun yakınındaki katalitik bölgeyi etkileyebileceğini ve ligand bağlanmasını rahatsız edebileceğini öne sürmektedir. Moleküler kenetlenme çalışmalarına göre, küçük bir molekül olan juglone (moleküler ağırlığı 176 Dalton) hPIN1, TaPIN1 ya da mutant

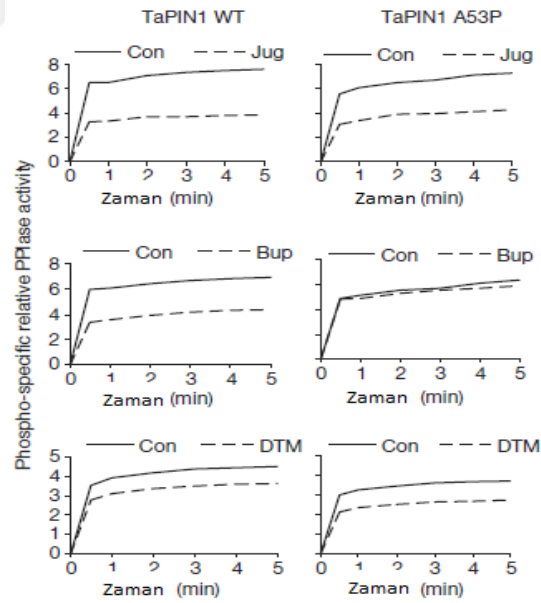
*Ta*PIN1 (A53P) ile etkileşime girebileceğini gösterirken, A53P mutasyonu, daha büyük buparvaquone bileşiğinin (moleküler ağırlığı 326 Dalton) mutant *Ta*PIN1 hidrofobik kısmı ile etkileşimini engellediği ve böylece modifiye yapıdaki rezidüler ile inhibitörler arasında sterik çatışmalara neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 1.16). Mutant *Ta*PIN1 (A53P) katalitik olarak PIN1 substratına karşı aktiflik göstermektedir. Juglone ve DTM (dipentametilen tiuram monosulfit) inhibitörleri tarafından inhibe edilirken, buparvaquone'a karşı direnç göstermektedir (Şekil 1.17) [48].



Şekil 1.15 *T. annulata* yabancıl tip (*Ta*PIN1 WT) ve buparvaquone dirençli mutant (*mTa*PIN1) (a) nükleotid ve (b) protein dizi karşılaştırması [48].



Şekil 1.16 hPIN1 ile benzerliğe dayanarak *TaPIN1* ve *TaPIN1* (A53P) mutantı için homoloji modelleri ve PIN1 aktif bölgeleri ile juglone ve buparvaquone moleküllerinin kenetlenme çalışmaları [48].



Şekil 1.17 Yabanıl tip *TaPIN1* (WT) ve mutant *TaPIN1* (A53P)'in buparvaquone, juglone ve DTM'e karşı katalitik PPlaz aktivitesi [48]. Con, kontrol solüsyonu.

Bütün bunlara istinaden, önerilen tez çalışmasında, *TaPIN1* tarafından, konak hücre içerisinde seviyesi azalmış tümör baskılayıcı FBW7 protein seviyesinin onarılacak substratı olan tümör oluşumuna neden olan artmış c-JUN protoonkojen seviyesinin azaltılması amacıyla mutant *TaPIN1* enzimini inhibe edecek potansiyel inhibitörlerin belirlenmesi ve belirlenen inhibitörler ile insan kanserlerinde Ras/Neu onkojenik sinyal yolağında, aşırı ifade edilmiş Ras/Neu proteinlerce indüklenen hPIN1 enzimi tarafından hücre içi seviyesi azalmış FBW7 tümör baskılayıcı protein seviyesinin onarılıp, tümör oluşumuna neden olan artmış c-Jun ve Mcl-1 protoonkojen seviyelerinin azaltılması için ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarında kullanılması amacıyla yabancı tip ve mutant *TaPIN1* enzimleri ile bilgisayar destekli ilaç tasarım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1.1.7 Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

Geleneksel yöntemlerle yeni ilaç geliştirilmesi çok uzun yıllar sürmektedir ve başarısızlık maliyeti de eklenince 2,6 milyar dolar maliyete neden olmaktadır [64]. İlaç keşfi ve geliştirme sürecinde başarısızlık olasılığı oldukça yüksektir ve klinik araştırmalara giren ilaçların %90'ı tüketici pazarına sunulmak için Amerikan gıda ve ilaç yönetimi FDA (food and drug administration) onayını alamamaktadır. Bu sonuçlara göre maliyetin yaklaşık %75'i ilaç keşfi boyunca meydana gelen başarısızlıklardan kaynaklanmaktadır [65]. Zamanla, ilaç keşfi konusunda yeni bir yaklaşım olan bilgisayar destekli ilaç tasarımı ortaya çıkarak, ilaç olma potansiyeline sahip öncü adayların aktivite ve seçiciliğinin erken değerlendirilmesi ayrıca farmakolojik etkilerinin ve toksisitelerinin incelenmesi gerçekleştirilebilmektedir. Bu durum yeni moleküllerin başarılı bir şekilde geliştirilmesini hızlandırırken maliyetin de azaltılmasına yardımcı olmaktadır. Bu yaklaşımın temeli, yeni moleküler yapıların keşfedilmesinde kolaylık sağlayan hesaplamalı tekniklerin uygulanmasıdır [66]. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı genellikle üç amaç için kullanılır: 1) Büyük bileşik kütüphanelerini, deneysel olarak test edebilmek amacıyla öngörülen aktif bileşiklerden oluşan küçük setlere filtrelemek; 2) ADMET (emilim, dağılım, metabolizma, salınım ve toksisite) bilgilerini içeren ilaç metabolizmasının ve farmakokinetik özelliklerinin optimizasyonuna rehberlik etmek ve 3) yeni bileşikler tasarlamak [67]. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı yapıya ve liganda dayalı olarak iki kategoride sınıflandırılabilir. Yapıya dayalı ilaç tasarımı, potansiyel

ligandların taranması veya oluşturulması için hedef molekülün (enzim/reseptör) üç boyutlu (3B) yapı kullanımını takiben sentezlenmesi, biyolojik testlerin gerçekleştirilmesi ve optimizasyonunu içermektedir. Buna karşın, liganda dayalı ilaç tasarımı, teorik olarak öngörülen modelin oluşturulması için, çeşitli yapılardaki ve potansiyeli bilinen molekülleri hesaplamalı modelleme yöntemlerine tabi tutan yaklaşımdır. [68]. Tez içeriğinde, çalışmada kullanılan yapıya dayalı ilaç tasarımına yer verilmiştir.

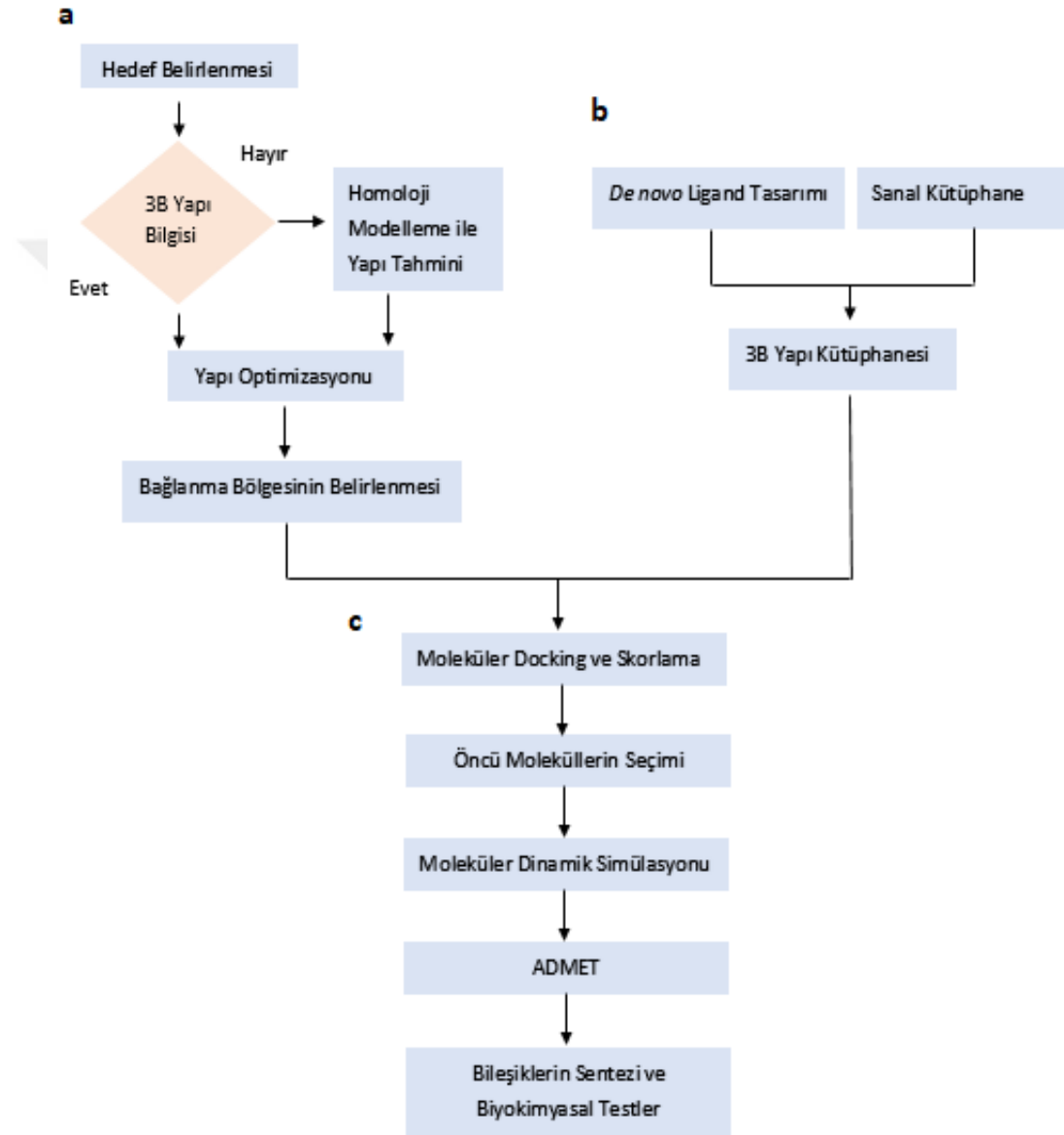
1.1.8 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı

Yapıya dayalı ilaç tasarımında, 3B makromolekül yapının ligand ile öngörülen etkileşimleri temel alınıp ligand tasarımı ve değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bu yüzden, ilaç hedefinin (enzim/reseptör) belirlenmesi ve yapı bilgisinin elde edilmesi yapıya dayalı ilaç tasarımının ilk adımını oluşturmaktadır [68], [69], [70]. Yapıya dayalı ilaç tasarımının akış şeması Şekil 1.18'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere yapıya dayalı ilaç tasarımının temel amacı ilaç olmaya aday öncü moleküllerin belirlenmesidir [71]. Yapıya dayalı ilaç tasarım yöntemleri, sanal tarama ve *de novo* ilaç tasarımı içermektedir [72]. Sanal tarama genel olarak, ardışık filtre kademelerinden oluşmaktadır ve belirlenen ilaç hedefine karşı potansiyel biyolojik etkinliğe sahip bileşiklerden oluşan bir set elde edilir. İncelenen bileşikler ticari olarak üretilmemiş olabilir ve test edilmeleri herhangi önemli madde materyali tüketmez. Bu açıdan, herhangi bir molekül, teorik olarak sanal tarama yöntemi ile değerlendirilebilir [73]. Buna karşın moleküler *de novo* ilaç tasarımı, istenilen farmakolojik özelliklere sahip, daha önce sentezlenmemiş yeni moleküler yapıların sıfırdan üretilmesine imkan sunar [74]. Çalışmada yapıya dayalı ilaç tasarım yöntemlerinden sanal tarama kullanılmış olup tez içeriğinde bu yöneme yer verilmiştir.

1.1.8.1 Hedef Belirlenmesi

İlaç tasarımının ilk adımı ilaç hedef molekülünün belirlenmesidir [75]. Bu amaçla, belirlenen ligand molekülü için tüm olası bağlayıcı hedef proteinleri tanımlamak amacıyla çeşitli web sunucuları geliştirilmiştir [76]. Hedef molekül belirlendikten sonraki aşama 3B yapı eldesidir. 3B yapı belirlenmesi için genellikle x-ray kristalografi,

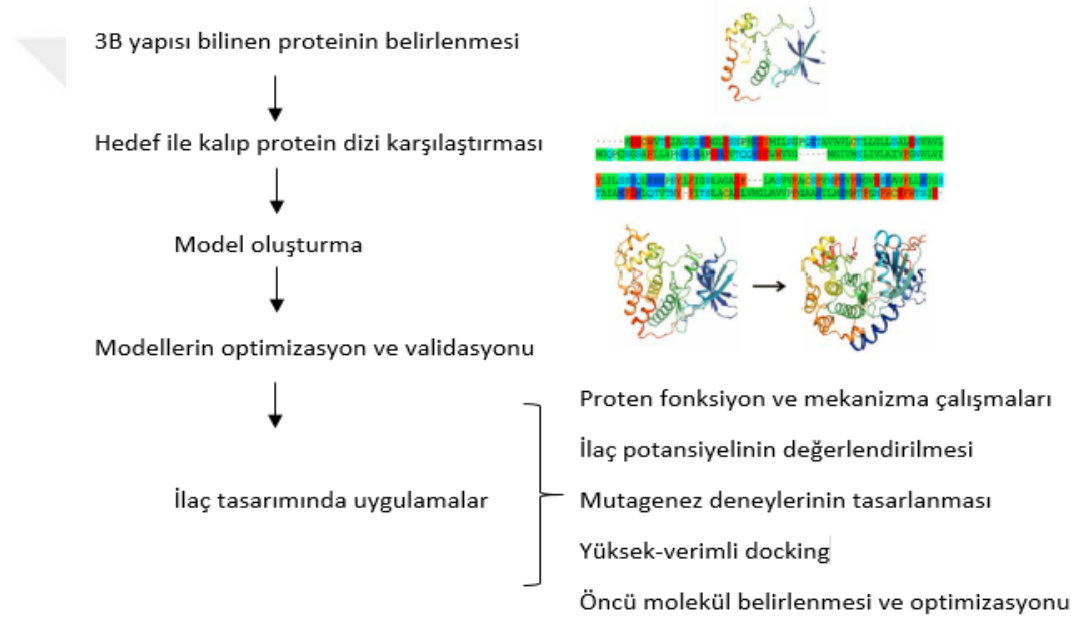
nükleer manyetik rezonans NMR ve homoloji modelleme veya karşılaştırmalı modelleme yöntemleri kullanılmaktadır. Homoloji modelleme, bilinen homolog protein yapısına dayanılarak, yapısı bilinmeyen proteinler için 3B yapıların elde edilmesine olanak sağlayan hedef yapı tahmini için en güvenilir yöntemdir [65], [68], [71], [75]. Çalışmada hedef molekül *Theileria annulata* peptidil prolil izomeraz TaPIN1 enzimi olup 3B yapısını belirlemek amacıyla homoloji modelleme uygulanmıştır.



Şekil 1.18 Yapıya dayalı ilaç tasarımının iş akış şeması [71] kaynağından modifiye edilmiştir. a, Hedef yapı belirlenmesi ve bağlanma bölgesinin analizi; b, sanal kütüphanenin hazırlanması; c, hedef molekül bağlanma bölgesi ile bileşiklerin kenetlenme çalışmaları.

1.1.8.2 Homoloji Modelleme

Homoloji veya karşılaştırmalı modelleme, deneysel olarak yapısı belirlenmiş bir proteini, benzer amino asit dizisine sahip farklı bir proteinin yapısını belirlemek amacıyla kullanır [77]. Homoloji modelleme 4 aşamadan oluşmaktadır (Şekil 1.19): (1) Kalıp görevi alabilecek, 3B yapısı bilinen proteinin belirlenmesi; (2) kalıp ile hedef protein dizi eşleştirmesi; (3) kalıp proteinin 3B yapısına ve eşleştirmeye dayalı hedef protein için model oluşturma; (4) modellerin düzeltilmesi ve validasyonu. Bu adımlar tatmin edici model oluşturulana kadar tekrarlanabilir [78].



Şekil 1.19 Homoloji modelleme sürecinin ana hatları ve ilaç keşfinde uygulamaları [104].

Birinci aşamada, program veya sunucu kullanılarak yapısı bilinmeyen dizi ile Protein Veri Bankasında yer alan yapısı bilinen protein dizi eşleştirmesi ile kalıp belirlenir [79]. Protein Veri Bankası, deneysel olarak 3B yapıları belirlenmiş birçok makromoleküllerin yapı bilgisini sunan küresel bir kaynaktır ve 2016 yılından itibaren yaklaşık 120.000 makromolekül yapısını içermektedir [65]. Kalıp proteini belirlemek amacıyla kullanılan en popüler sunucu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aracıdır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Blast ile veritabanında yapılan arama sonucunda, dizi ile eşleşen yapısı bilinen protein listesi elde edilir [79]. Ardından, PSI-

BLAST, FastA, Multalign ve Spdbviewer gibi yazılım programları veya sunucular kullanılarak, amino asit residüleri ile kalıplar arasındaki 3B yapı benzerliğini saptamak için, amino asit dizi eşleştirmesi gerçekleştirilir [80]. Yüksek doğrulukta karşılaştırmalı modeller, hedef proteinin kalıp proteine %50'den fazla dizi benzerliğine dayanır. Orta doğrulukta ise %30-50 arasında ve son olarak düşük doğrulukta karşılaştırmalı modelleme ise %30'dan daha az dizi benzerliğinden kaynaklanmaktadır [81]. Buna göre %30 ve üstü dizi benzerliğindeki kalıp ile hedef protein için model oluşturma aşamasına geçilebilir. Model oluşturulmasında genel olarak 4 yöntem kullanılmaktadır; (1) katı gövde birleştirme; (2) segment eşleştirme; (3) boyutsal engellerin tamamlanması ve (4) yapay evölasyon [82], [83]. Tüm boyutsal engeller-tabanlı yaklaşımlarda, ilgili yapı ile eşleştirme sırasında hedef dizideki mesafe ve/veya dihedral açı engelleri çıkartılır, bağ uzunlukları, bağ açıları ve dihedral açıları gibi kovalent topoloji (stereokimyasal engeller) tarafından belirlenen engeller tamamlanır ve tüm engellerdeki ihmalleri hesaplayarak minimizasyon gerçekleştirildikten sonra model hesaplanması yapılır [84]. Model oluşturulmasında kullanılmak üzere çeşitli program ve yazılımlar geliştirilmiştir [85]. MODELLER sunucusu, boyutsal engellerin tamamlanması yöntemini uygulayan araç olup homoloji modellemek amacıyla tez çalışmasında kullanılmıştır. Temel olarak, program girdileri, modellenen proteinin a.a. dizisi, kalıp protein yapısı, kalıp protein atomik koordinatları ve komut dosyasıdır [86]. MODELLER daha sonra modern bir PC ortamında birkaç dakika içinde ve herhangi bir kullanıcı müdahalesi olmadan, hidrojen olmayan atomların tümünü içeren bir modeli otomatik olarak hesaplamaktadır [87]. Hedef protein için oluşturulan birden fazla modelin yapı değerlendirilmesi gerçekleştirmek amacıyla DOPE [88] veya SOAP [89] skoru uygulanarak en iyi model seçilir. Seçilen modeli deneysel hedef yapısına yakınlaştırmak için, modellerin çözünürlüğünü artırabilmek amacıyla protein yapı optimizasyonu gerçekleştirilebilir. Bu amaçla kullanılan yöntemler bilgi temelli ve fizik-temelli yaklaşımlara ayrılmaktadır. Bilgi temelli yöntemler istatistiksel potansiyellere ve protein veri bankasındaki çözülmüş yapılardan elde edilen kalıp bilgilerine dayanmaktadır [90]. Fiziksel temelli yaklaşımlarda, AMBER [91] ve CHARM [92] gibi moleküler mekanik kuvvet alanları ile yapı optimizasyonu gerçekleştirilir [90]. Bu işlemten sonraki aşama oluşturulan

modelin doğrulanmasıdır ve bu amaçla geliştirilmiş birçok program ve sunucu bulunmaktadır [82], [85], [87]

1.1.8.3 Yüksek Verimde Sanal Tarama ve Moleküler Kenetlenme

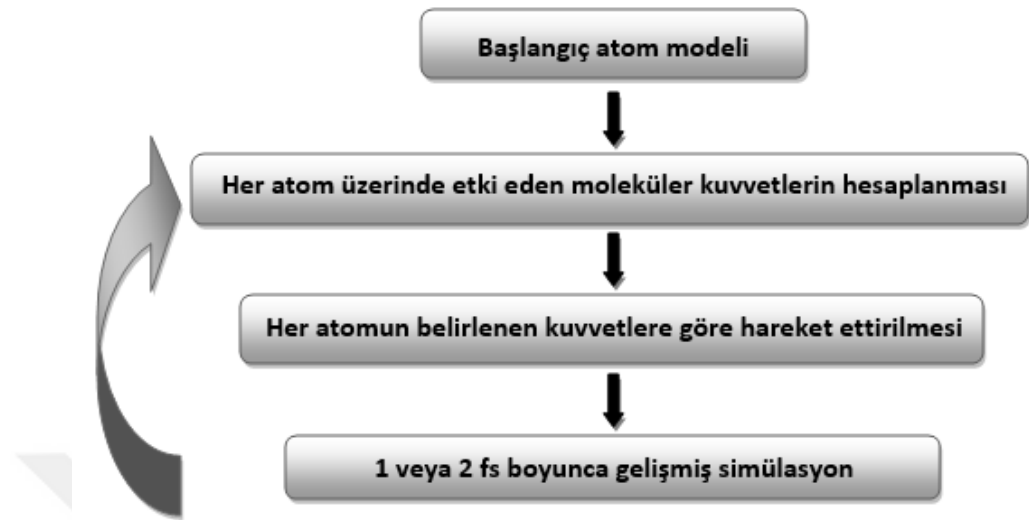
Küçük molekküllerden oluşan kütüphanelerden öncü ligandların belirlenmesi amacıyla, moleküllerin hedef reseptörün aktif bölgesine kenetlenmesi, sanal taramada en yaygın kullanılan yapıya dayalı ilaç tasarım yöntemidir [93], [94]. Moleküler kenetlenme, ligand ve hedef molekül arasındaki etkileşimi belirler ve kararlı bir kompleks yapı oluşturmaları için ligand bağlanma afinitesini tanımlar [95]. Moleküler kenetlenmenin temel metodolojisi 3 şekilde sınıflandırılabilir: (1) Esnek kenetlenme (indüklenmiş fit kenetlenme): Hem ligand hem de reseptör esnektir. Ligand, esnek bir şekilde reseptör aktif bölgesine bağlanır.; (2) Kilit ve anahtar kenetlenme: Ligand ve reseptör rijid yapıda olup sıkı bağlantı gösterir.; (3) Toplu kenetlenme: Ligand kenetlenmesi için çoklu protein yapıları kullanılır [95], [96]. Genel olarak, klasik moleküler kenetlenme programları iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım, ligandın hedef proteine bağlanması için uygun konformasyonun belirlenmesi ve ikinci kısım skor fonksiyonu uygulanarak bağlanma serbest enerjisinin hesaplanmasıdır [97]. Bu amaçla, çeşitli algoritmalar ve skor fonksiyonu içeren GOLD [98], DOCK [99], Surflex [100], GLIDE [101], AutoDock [102], v.b. program veya sunucuları geliştirilmiştir. Tez çalışmasında, esnek kenetlenme metodolojisine sahip Schrödinger tarafından sunulan GLIDE programı kullanılarak moleküler kenetlenme temelli sanal tarama gerçekleştirilmiştir. GLIDE esnek kenetlenme metodolojisine sahip olmasına rağmen, ligandın esnek ama reseptörün rijid olduğu yani kenetlenme sırasında reseptör koordinatlarının sabit tutulduğu yöntemi uygulamaktadır [101]. Rijid reseptör yaklaşımı, ligand kenetlenme işleminin hızlı bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlar [103]. Glide, reseptörün aktif bölgesi içindeki ligandın muhtemel yerlerini araştırmak için bir dizi hiyerarşik filtre kullanır [101]. Bu program, üç seçenek vasıtasıyla sanal tarama için rasyonel bir iş akışı sağlar: yüksek verimli sanal tarama (HTVs - high-throughput virtual screening) modu, standart hassasiyet (SP - standart precision) modu ve ekstra hassasiyet (XP - extra precision) modu. HTVS modu, bağlanmaya elverişli ligandlar taranarak büyük molekül kütüphanelerini küçültmek amacıyla filtre olarak kullanılır ve ardından diğer modlarla

daha doğru kenetlenme hesaplamaları yapılır [104]. SP modu, ligand serbest enerjilerini kullanarak, ligand pozlarını diğer ligandlarla karşılaştırır ve bağlanmaya elverişli olan ligandları belirler [101], [103]. SP skorlamadan sonraki adım olan XP GlideScore, protein - ligand etkileşimlerinin, titizlikle değerlendirilmesine dayanan skorlama fonksiyonudur. SP modunda sadece en yüksek puanı alan ligandlar XP modunda kenetlenme işlemine tabi tutulur [105].

1.1.8.4 Moleküler Dinamik Simülasyonu

Kimyasal ve biyolojik sistemlerin davranışlarının altında yatan mekanizmaları anlamak, uzaysal ve zamansal çözünürlüklerde incelemeyi gerektirir [106]. Moleküler dinamik (MD) simülasyon, Newton fizik kurallarına göre molekül ve atomların etkileşimlerini ve hareketlerini incelemektedir [107]. Moleküler kenetlenme sırasında, ligand tarafından indüklenmiş hedef moleküller, ikincil ve üçüncül yapılarında önemli değişikliklere uğrayabilir ve bu değişiklikler MD simülasyonun sağladığı olanaklar ile incelenebilir [108]. Ayrıca, MD simülasyon ligand-hedef kompleks yapı stabilitesinin değerlendirilmesine ve oluşturulan yapının optimize edilmesine imkan sağlayan, yapıya dayalı ilaç tasarım yaklaşımının geliştirilmesine yönelik yaygın kullanılan bir yöntemdir [109]. Şekil 1.20’de görüldüğü üzere MD simülasyon işleminde ilk olarak, hedef molekül yapısı veya ligand-hedef kompleksi sistemi başlangıç modeli olarak belirlenir [110]. Ardından sistemde yer alan her bir atom üzerinde etki eden moleküler kuvvetler tanımlanır [111]. Kuvvet alanı, molekül içi ve moleküller arası etkileşimlerden kaynaklanan enerjinin matematiksel ifadesidir. Molekül içi etkileşim enerjileri kimyasal bağlardan ve atomik açılardan (bağ gerilimi, bağ bükülmesi ve dihedral burulma), moleküller arası etkileşim enerjileri bağ olmayan van Der Waals ve elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır (Şekil 1.21) [112]. Belirtilen moleküler etkileşimlerin tanımlandığı AMBER [113], CHARMM [114] ve GROMOS [115] kuvvet alanları MD simülasyonda yaygın kullanılmaktadır. Sistem atomları üzerindeki kuvvet alanı tanımlandıktan sonra, atomlar Newton’nun hareket yasasına göre hareket ettirilerek simülasyon gerçekleştirilir [107], [110]. Simülasyon adımı çok fazla hesaplamalar içerdiğinden dolayı milyon kez tekrarlanabilir [111]. Yaygın kullanılan MD

simülasyon yazılımları genellikle kuvvet alanları ile aynı adı taşımaktadır: AMBER [116], CHARMM [117], GROMOS [118] ve NAMD [119].



Şekil 1.20 Moleküler dinamik simülasyonun iş akış şeması [110]. fs; femtosaniye.

$$E_{total} = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Şekil 1.21 Molekül hareketlerini yöneten atomik kuvvetler ve bu kuvvetlerden kaynaklanan enerjinin matematiksel hesaplanması [110].

1.2 Tezin Amacı

Önerilen tez çalışmasının amacı, ileri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanılmak üzere TaPIN1 genin klonlanması, inhibitor kütüphanesi *in silico* taranarak ilaç direnci rapor edilmiş TaPIN1'in inhibisyonuna yönelik aday moleküllerin belirlenmesi ve önerilen yaklaşımın aşırı ifade edilmiş Ras/Neu proteinlerce indüklenen insan PIN1 enzim kaynaklı kanserlerin tedavi edilmesine yönelik kurgunun yapılmasıdır.

1.3 Hipotez

Buparvaquone, etkili bir hidroksinaftakinon anti-theilerial ilaçtır ve bu ilaca karşı *TaPIN1* mutasyonu kaynaklı direnç rapor edilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda *in silico* çalışmalar ile hem kullanılmakta olan buparvaquone hem de *TaPIN1*'in yabanıl ve mutant formları dikkate alınarak yeni aday inhibitörlerin belirlenebileceği ve belirlenecek potansiyel ilaç adaylarının *TaPIN1* ile aynı mekanizmayı kullanarak insanda tümör oluşumuna neden olan insan PIN1 enziminin aşırı ekspresyonunun düşürülmesi için de ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarında kullanılabileceğinin önerilmesi öngörülmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyaller

2.1.1 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile kalıp DNA'yı amplifiye etmek için kullanılan Long PCR Enzyme Mix ve tampon çözeltisi Thermo Scientific'den (ABD) ve Taq DNA Polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve $MgCl_2$ solüsyonu Fermantas'tan (Litvanya) temin edilmiştir.

PCR ürünlerini saflaştırmak için kullanılan Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kiti ve Plazmid DNA izolasyonu için kullanılan Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Kiti Promega'dan (ABD) temin edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen DNA'yı görüntülemek için kullanılan Novel Juice DNA Staining Reagent GeneDireX (Çin), DNA'nın baz büyüklüğünü belirlemek için marker olarak kullanılan O'GeneRuler DNA Ladder Mix Fermantas (Litvanya) ve konstrasyonunu belirlemek için kullanılan Lambda DNA/Hind III Digest marker ise Amersham Pharmacia Biotech (ABD) firmalarından temin edilmiştir.

Theileria annulata peptidil prolil izormeraz enziminin klonlanması için kullanılan pLATE31 vektörü, T4 DNA Polimeraz ile tampon çözeltisi ve EDTA içeren aLICator Ligation Independent Cloning and Expression Kiti Thermo Scientific'den (ABD) temin edilmiştir.

Theileria annulata peptidil prolil izomeraz enzimini kodlayan genden intronun uzaklaştırılması için kullanılan Kinaz-Ligaz-Dpn1 enzim karışımı, tampon çözeltisi, Puc19 vektörü ve DH5α kompetan *E. coli* hücrelerini içeren Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit'i New England Biolabs - NEB'den (ABD) sağlanmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH (Almanya), Sigma (Almanya), Merck (Almanya), Raedel De Haume (Almanya), Promega (ABD), Roche (İsviçre) firmalarından temin edilmiştir.

Amplifikasyon ve DNA dizileme için kullanılan primerler İontek (Türkiye) ve Biogen (Türkiye) firmalarından temin edilmiştir. Klonlanan genlerin dizi analizleri Biogen firmasına yaptırılmıştır.

2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Su Banyosu – Kerman

Çalkalamalı İnkübatör – GFL

pH Metre – CyberScan

Ultrasonikasyon – Bandelin

Mikrodalga Fırın – Beko

Etüv – Binder

Hassas Terazı – Ohaus

Buz Makinası – Optic Ivymen System

Distile Su Cihazı – GFL

Otoklav – Systec

-20 °C Buzdolabı – Beko

-80 °C Buzdolabı – Beko

+4 °C Buzdolabı – Beko

Kabin

Mikrosantrifüj – Sigma

Soğutmalı Santrifüj – Sigma

UV Visible Spektrofotometre – Thermo Scientific

Termal Döndürücü – Eppendorf

Vorteks – Heidolph

Şarjlı Pipet Ünitesi – Hirschmann

Manyetik Karıştırıcı – Heidolph

Dikey Elektroforez Sistem – BioRad

Çalkalayıcı – Labn

PCR Çalışma Kabini – Esco

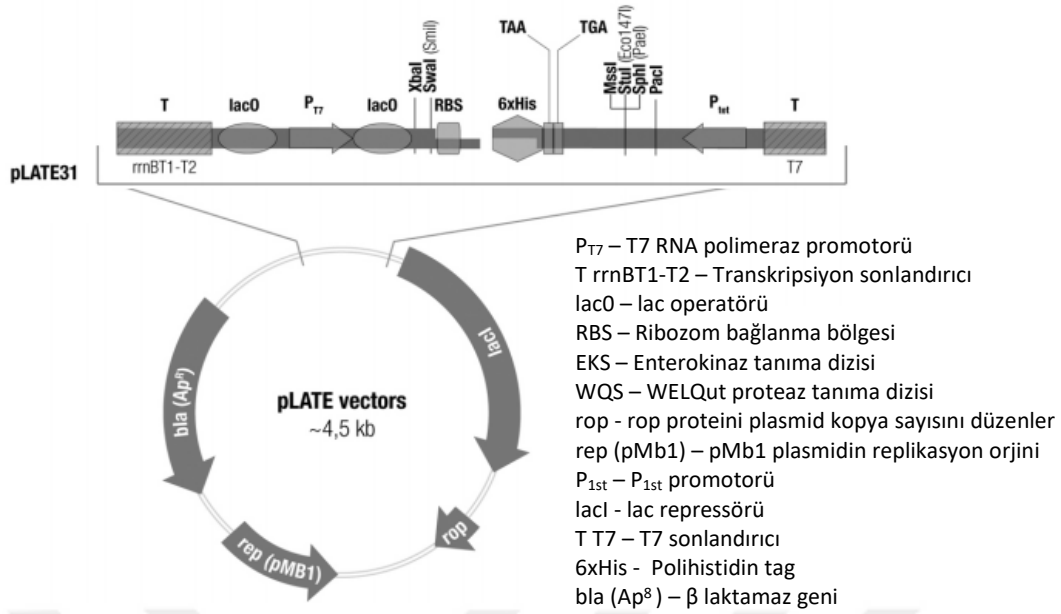
Yatay Elektroforez Sistem – BioRad

Jel Görüntüleme Sistemi – Biorad

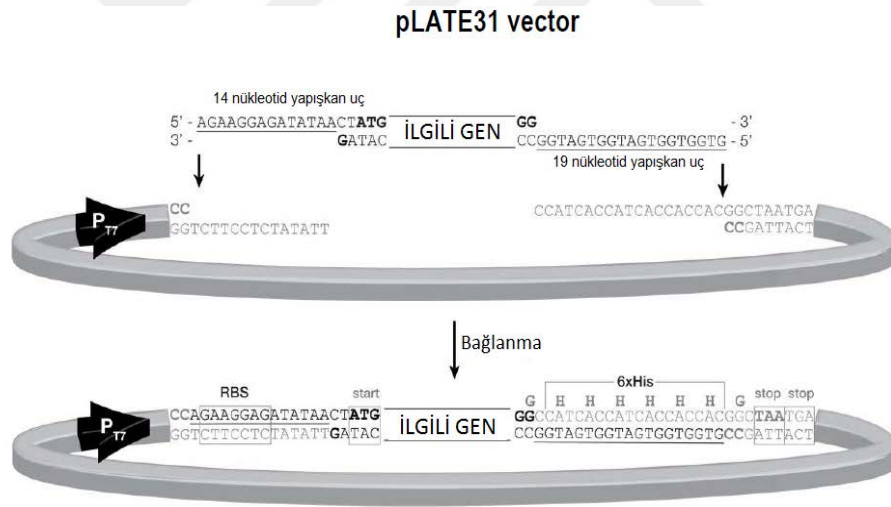
Trans-Blot Semy-Dry – BioRad

2.1.3 İfade Vektörü

Escherichia coli suşlarında yer alan genlerin ekspresyonunu sağlamak için pLate31 ifade vektörü üzerinde bakteriyofaj T7 elementleri yer almaktadır. Bu elementler ve vektör üzerindeki yeri Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Ayrıca vektörde bulunan gen ile ligasyonu sağlayan yapışkan uç bölgeleri ve IPTG indüklemesi ile gen ekspresyonunu sağlayan T7 promotör bölgesi Şekil 2.2’ de belirtilmiştir.



Şekil 2.1 pLATE31 vektör elementleri [120].



Şekil 2.2 pLATE 31 ifade vektörü [120].

2.1.4 Escherichia coli Soyu

fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS genotipine sahip BL21 (DE3) *Escherichia coli* soyu transformasyon için kullanılmıştır.

2.1.5 Genomik DNA

Theileria annulata genomik DNA'sı; Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Münir Aktaş tarafından temin edilmiştir.

2.1.6 Primerler

Çizelge 2.1 Tez çalışmasında kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer Dizisi	Kullanım Alanı
STaPIN1 F1	ATGATTCGGAATTTTCTAAAT	Genin 5' ucu primeri
TaPIN R1	TTATGCGATTCTATATATAAG	Genin 3' ucu primeri
TaPIN1 LICF	AGAAGGAGATATAACTATGATTCGGAATTTTCTA AATTTTTGTGG	Geni ifade vektörüne aktarmak için tasarlanan 5' ucu primeri
TaPIN1 LICR	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTTATGCGATTCT ATATATAAG	Geni ifade vektörüne aktarmak için tasarlanan 3' ucu primeri
TaPIN1 F	AATAATTAATACAATTATATTGCAATGG	Genden intronu uzaklaştırmak için tasarlanan 5' primeri
TaPIN1 R	AAAAATCTTAAGCTAGTATTAATTCC	Genden intronu uzaklaştırmak için tasarlanan 3' primeri

2.1.7 Bakteriyolojik Gelişim İçin Besiyerleri ve Solüsyonlar

Çizelge 2.2 LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri hazırlanması için gereken bileşenler.

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

Otoklav ile 121 °C'de sterilize edilir.

Çizelge 2.3 LB (Luria-Bertani) Agar hazırlanması için gereken bileşenler.

Bileşenler	Miktar
Maya Ekstraktı	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

Otoklav ile 121 °C'de 15 dk sterilize edilir.

Çizelge 2.4 SOC Medium (25 ml) hazırlanması için gereken bileşenler.

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

Trypton ve maya ekstraktı tartıldıktan sonra gerekli miktarda 1M NaCl ve 1M KCl eklenir. 23 ml'ye kadar distile su ile çözdürülür ve 121 °C'de otoklav ile sterilize edilir. Çözelti sıcaklığı, oda sıcaklığına ulaşınca 2 M Mg²⁺ ve 2 M Glikoz eklenerek son hacmin 25 ml olmasına dikkat edilir. pH 7 olmalıdır.

2.1.8 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Amfisilin (100 mg/ml) hazırlanışı:

1 ml'de 100 mg amfisilin olacak şekilde sulandırılır ve filtre ile sterilize edilir. Hazırlanan stok amfisilin -20 °C'de saklanır.

Çizelge 2.5 2M Mg⁺² hazırlanması için gereken bileşenler.

Bileşenler	Miktar
MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33 g/100ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65 g/100ml

Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır ve filtre ile sterilize edilir.

2 M Glukoz hazırlanışı:

3,60 g Glukoz tartılarak distile su ile 10 ml'ye tamamlanır ve filtre ile sterilize edilir.

Çizelge 2.6 CaCl₂ solüsyonu hazırlamak için kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar
100 mM CaCl ₂ .2H ₂ O	14,702 g/l
5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0165 g/l
5 mM Tris HCl (pH : 7,6)	5 ml

Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklav ile 121 °C'de 15 dk sterilize edilir.

Çizelge 2.7 50 x TAE Tampon Çözeltisini (Tris-Asetat-EDTA) hazırlamak için kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar
Trisma Base	242 g/l
Asetik Asit	57,1 ml/l
0,5 M EDTA (pH: 8,0)	100 ml/l

dH₂O ile 1xTAE'ye seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Genomik DNA'dan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Geninin Amplifikasyonu

Tezin ilk çalışması, *Theileria annulata* peptidil prolil izomeraz enzimini kodlayan *TaPIN1* geninin laboratuvarımızda mevcut bulunan *Theileria annulata* genomundan amplifiye edilmesidir. Bu amaçla, genin başlatıcı ile sonlandırıcı nükleotidleri belirlendikten sonra diziye spesifik 5' ve 3' primerler tasarlanmıştır.

2.2.1.1 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisine Spesifik Primerlerin Tasarlanması

Theileria Annulata peptidil prolil izomeraz gen dizisine spesifik tasarlanan primerler:

TaPIN1F1 5' ATGATTCGGAATTTTCTAAAT 3'

TaPINR1 5' TTATGCGATTCTATATATAAG 3'

2.2.1.2 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisine Spesifik Primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Diziye spesifik tasarlanan primerler ile Long PCR Enzyme Mix polimeraz enzimi kullanılarak Çizelge 2.8'de yer alan bileşenlerle *TaPIN1* genin polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kalıp olarak *Theileria annulata* genomik DNA'sı kullanılmıştır. Polimeraz enzimi eklenmeden önce 95 °C'de 5 dk ön denatürasyon gerçekleştirilmiştir. Enzim eklendikten sonra 30 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1,5 dk, 50 °C'de 2 dk ve 72 °C'de 2 dk polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.8 *TaPIN1* gen amplifikasyonu için gerekli olan bileşenler.

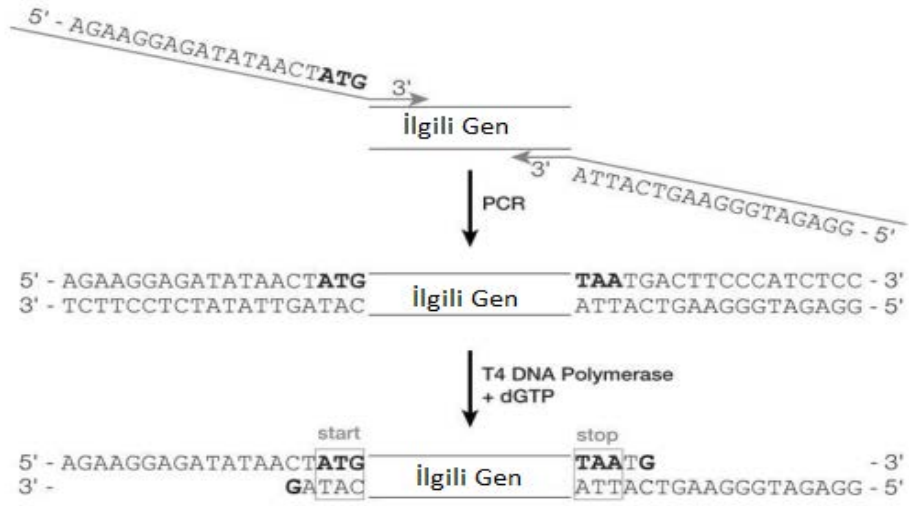
Bileşenler	Miktar
10 x Long PCR Enzyme Mix polimeraz tamponu + MgCl ₂	5 µl
dNTPmix	5 µl
<i>TaPIN1F1</i>	2,5 µl (20 pmol/µl)
<i>TaPINR1</i>	2,5 µl (20 pmol/µl)
Kalıp DNA	1 µl
10 x Long PCR Enzyme Mix polimeraz enzim	1 µl
dH ₂ O	33 µl

2.2.2 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

PCR sonrası DNA büyüklüğünü görüntülemek için %1'lik agaroz jel hazırlandı. Çözelti içerisinde son konsantrasyon %1 olacak şekilde agaroz tartılarak 1xTAE içerisinde mikrodalgada çözünürleştirilmiştir. Çözeltiye etidyum bromür eklendikten sonra, jel tepsisine dökülüp donması beklenmiştir. Jel tepsi elektroforez tankına yerleştirilerek tank tamponu (1xTAE) eklenmiştir. Yükleme tamponu ile muamele edilen PCR örnekleri, tank tamponu içeren elektroforez tankındaki jele yüklenerek 45 mA'de 40 dk yürütülmüştür. Jelde yürütülen DNA bantları ultraviyole transilluminatöründe görüntülenmiştir.

2.2.3 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılması

aLICator LIC (Ligation Independent Cloning) Klonlama ve Ekspresyon Kit sistemi ekspresyon vektörüne klonlamayı hızlandıran ligasyondan bağımsız klonlama teknolojisini kullanmaktadır. LIC teknolojisi, ligasyon ve restriksiyon enzim kesim adımlarına ihtiyaç duymadan %95'in üzerinde klonlama verimliliği sağlar. Hedef genin ifade vektörüne aktarılabilmesi için, ilk önce sistem protokolüne uygun 5' ve 3' primerler ile hedef genin amplifikasyonu yapılmalıdır. Amplifiye edilen PCR ürünü, vektöre ligasyon işlemi için kullanılır. LIC sistemi, 5'-3' polimeraz aktivitesi ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip T4 DNA polimeraz enzimini kullanır. Ekzonükleaz aktivitesi DNA'nın 3' ucuna hatalı eklenmiş nükleotidleri uzaklaştırırken polimeraz aktivitesi kalıp olarak komplementer DNA'yı ve dNTP'leri kullanarak doğru nükleotidlerin eklenmesini sağlar. LIC protokolü, sarmaldaki ilk sitozin oluşumunu engellemek amacıyla sadece dGTP kullanır (Şekil 2.3) [120].



Şekil 2.3 T4 DNA polimeraz ve dGTP ile ilgili gen üzerinde yapışkan uçların oluşturulması [120].

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

Sisteme uygun primerlerin dizaynı, kit protokolünde önerilen şekilde pLATE31 vektör için verilen kalıp diziler kullanılarak tasarlanmıştır. Primerlerin 5' ucu vektöre spesifik diziler içerirken, 3' ilgili gen dizisinin 5' ve 3' dizilerini içermektedir.

*Ta*PIN1LICF 5'AGAAGGAGATATAACTATG - ilgili gene spesifik dizi 3'

*Ta*PIN1LICR 5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCC - ilgili gene spesifik dizi 3'

2.2.3.2 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin LIC Sistemine Spesifik Primerler ile Amplifikasyonu

Peptidil prolil izomeraz enzimini kodlayan genin LIC Sistemine alt klonlanması için Long PCR Enzyme Mix polimeraz enzimi kullanılarak Çizelge 2.9'da yer alan bileşenler ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Kalıp DNA olarak, gen dizisine spesifik primerler ile amplifiye edilen PCR ürünü kullanılmıştır.

Çizelge 2.9 LIC sistemine alt klonlanması amacıyla *TaPIN1*'in amplifiye edilmesi için kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar
10 x Long PCR Enzyme Mix polimeraz tamponu + MgCl ₂	5 µl
dNTPmix	5 µl
<i>TaPIN1</i> LICF	2,5 µl (20 pmol/µl)
<i>TaPIN1</i> LICR	2,5 µl (20 pmol/µl)
Kalıp DNA	1 µl
10 x Long PCR Enzyme Mix polimeraz enzim	1 µl
dH ₂ O	33 µl
	50 µl

LIC sistemine alt klonlanması amacıyla, LIC sistemine uygun primerler ile amplifiye edilen *TaPIN1* PCR ürünü Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit protokolü uygulanarak saflaştırılmıştır [121]. Saflaştırılan PCR ürünü, GeneDirex DNA Ladder ile muamele edildikten sonra %1'lik etidyum bromür içermeyen agaroz jelde yürütülerek PCR sonucu kontrol edilmiştir.

2.2.3.3 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Klonlanması ve *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Hücrelerine Transformasyonu

aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) Sistemin'de verilen tablodaki nükleotid uzunluğuna göre LIC reaksiyonu için kalıp DNA olarak kullanılacak saf PCR ürün miktarı belirendikten sonra, Çizelge 2.10'da miktarı belirtilen bileşenler ile karıştırılarak, yapışkan uçların oluşturulması sağlanmıştır.

Çizelge 2.10 *TaPIN1* geninde yapışkan uçların oluşturulması için gereken reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
5 x LIC Tampon	2 µl
PCR Ürünü	4 µl
Water nuclease-free	3 µl
T4 DNA Polimeraz	1 µl
	10 µl

Reaksiyon karışımı, 3-5 sn. vortekslelendikten sonra, 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 0,6 µl EDTA (0,05 M) eklenmiştir. Uzama reaksiyonunun başlaması için, T4 DNA polimeraz ile muamele edilmiş PCR ürününe 1 µl pLATE eklendikten sonra tekrar 3-5 sn. vortekslenmiştir. Reaksiyon karışımı 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra doğrudan transformasyon için kullanılmıştır.

-80 °C'de yer alan *E. coli* BL21 (DE3) pLysS stoğundan agar petrilere sürme ekim yapılmıştır. Petriler inkübatörde 1 gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. Gelişen bakterilerden tek koloni seçilerek 5 ml LB sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. 37 °C'de çalkalamalı etüvde 120 devirde 1 gece inkübe edilmiştir. Kültürün 500 µl'si 50 ml LB sıvı besiyerine aktarılarak 37 °C'de 180 devirde, UV görünür spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) absorbans değeri 0.3-0.4'e ulaşana kadar inkübe edilmiştir. OD değerine ulaşan kültür 25 ml olacak şekilde falkon tüplerine ayrılıp, 5000 devirde 5 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, pelletler 25 ml CaCl₂ solüsyonu ile çözündürülmüştür. 30 dk buzda bekletildikten sonra tekrar 5000 devirde 5 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, pellet 1 ml CaCl₂ ile çözündürülmüştür. 2 saat buzda bekletildikten sonra hazırlanan kompetan hücreler doğrudan transformasyonda kullanılmıştır.

Hazırlanan LIC reaksiyon örneğinin üzerine 200 µl *E. coli* BL21 (DE3) pLysS kompetan hücre eklenerek 4-6 kez ters yüz edilmiştir. 30 dk buzda bekletildikten sonra, 42 °C'de 90 sn. ısı şoku uygulanmıştır. Tekrar 2 dk buzda bekletilerek 800 µl SOC Medium solüsyonu eklenmiştir. Karışım 4-6 kez ters yüz edilerek 30 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından amfisilin içeren LB agar petrilere farklı hacimlerde ekim yapılarak 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir [120].

2.2.3.4 Klonlanan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR ile Kontrolü

Transformasyonun kontrolü için rekombinant plazmid izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen ürün ile PCR gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonu için Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Kit protokolü uygulanmıştır. Petrilerde gelişen pozitif beyaz renkteki tek koloniye kürdanla dokunulup amfisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerine eklenmiştir. Bakteri gelişimi için 37 °C'de 180 devirde bir gece çalkalamalı

etüvde inkübasyonu sağlanmıştır. Gelişen kültürden 1.4 ml kültür örneği alınarak 12.000 devirde sentrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak, pellet 250 µl Hücre Re-süspansiyon Solüsyon'u (Cell Resuspension Solution) ile çözündürülmüştür. 250 µl Hücre Lizis Solüsyon'u (Cell Lysis Solution) eklenerek 4 kere ters yüz edilip karıştırılmıştır. 10 µl Alkalın Proteaz Solüsyon'u (Alkaline Protease Solution) eklenerek 4 kere ters yüz edilerek tekrar karıştırılmıştır. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 350 µl Neutralization Solution eklenmiştir. 4 kere ters yüz edilerek karıştırılması sağlanmıştır. 10 dk 12.000 devirde santrifüj edilmiştir. Spin kolonu toplama tüpüne yerleştirilip, elde edilen lizat spin kolonun içine dökülmüştür. 1 dk 12.000 devirde oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Toplama tüpündeki flowthrough atılarak spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Aynı işlem 250 µl Wash Solution eklendikten sonra tekrarlanmıştır. 2 dk santrifüj edildikten sonra spin kolonu 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. 5-55 µl Nükleaz içermeyen su (Nuclease-free water) eklenerek 1 dk oda sıcaklığında en yüksek hızda santrifüjlenmiştir. Spin kolonu atılarak, ependorf tüpte elde edilen DNA -20 °C'de muhafaza edilmiştir [122].

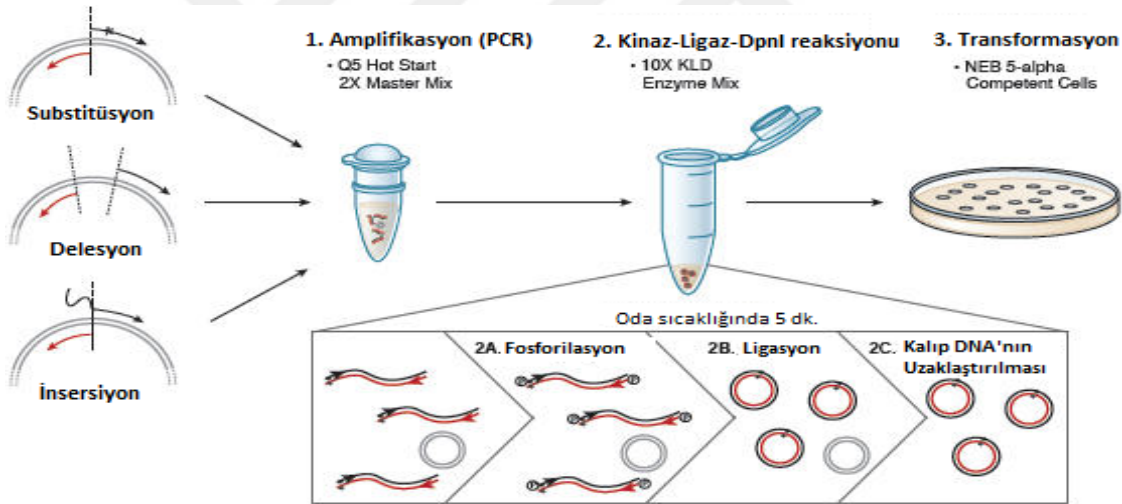
Elde edilen rekombinant plazmid DNA, kalıp olarak kullanılarak Taq DNA polimeraz enzimi ile Çizelge 2.11'de yer alan bileşenlerle amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.11 Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR için gerekli olan bileşenler.

Bileşenler	Miktar
Taq DNA Polimeraz Tamponu + KCl-MgCl ₂	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTPmix	5 µl
TaPIN1LICF	2,5 µl (20 pmol/µl)
TaPINLICR	2,5 µl (20 pmol/µl)
Kalıp DNA	1 µl
Taq DNA Polimeraz	1 µl
dH ₂ O	30 µl
	50 µl

2.2.4 Yönlendirilmiş Mutagenез ile *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İntronun Uzaklaştırılması

T. annulata peptidil prolil izomeraz gen dizisinde tanımlanmış olan bir tane intronun uzaklaştırılması Q5 Site-Directed Mutagenез Kit protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Mutagenез kiti, çift sarmal plazmid DNA üzerinde bölgeye özgü mutagenезin 2 saat gibi kısa bir sürede gerçekleşmesini sağlar. Kit protokolünün ilk adımında çeşitli plazmidlerde insersiyon, delesyon ve substitüsyon mutasyonları oluşturmak için özel Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polimeraz ve özel mutajenik primerler kullanılarak PCR gerçekleştirilir. PCR ürünü Kinaz-Ligaz-DpnI enzim karışımı ile muamele edilerek istenilen mutasyonu içeren plazmid DNA elde edilir ve intronlu kalıp DNA uzaklaştırılır. Son olarak, mutajenik plazmid DNA, yüksek verimde transformasyon elde etmek için kitin önerdiği NEB 5-alpha kompetan *E. coli* hücrelerine trasforme edilir (Şekil 2.4) [123].



Şekil 2.4 Q5 Site-Directed Mutagenез Kit protokolü akış şeması [123].

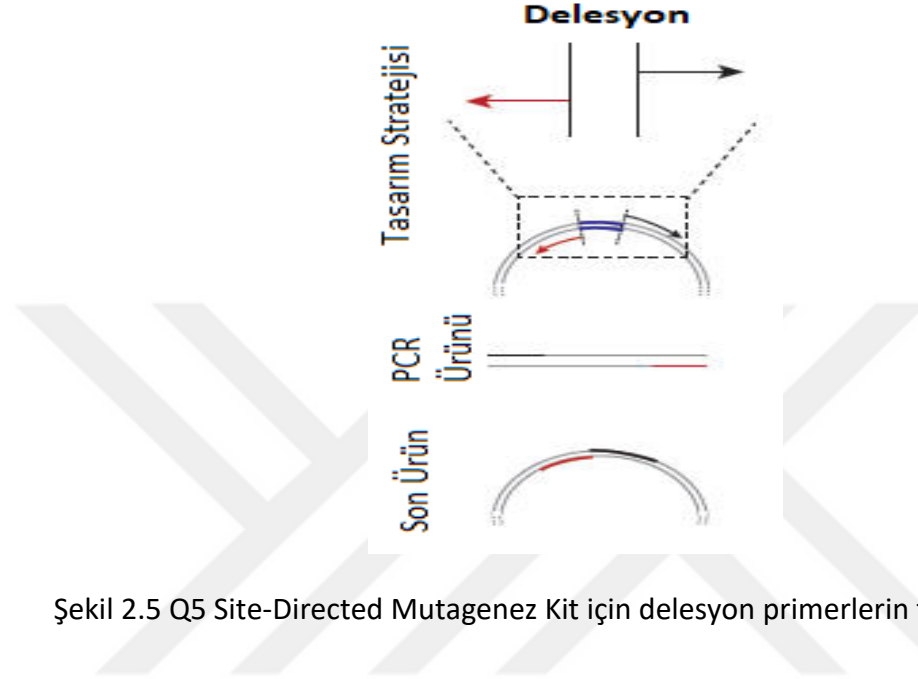
2.2.4.1 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İntronun Uzaklaştırılması için Mutagenез Primerlerin Tasarlanması

T. annulata peptidil prolil izomeraz gen dizisine tanımlanmış olan bir tane intronun uzaklaştırılması için delesyon mutasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Site-Directed Mutagenез Kit protokolün önerdiği NEBaseChanger sunucusu kullanılarak delesyon primerleri tasarlanmıştır. İki primer, Şekil 2.5'te yer aldığı üzere delesyonu

gerçekleştirilicek bölgeye bitişik olan 5' uçlarından ve birbirlerine zıt yönlerde dizayn edilmiştir:

TaPIN1F 5'AATAATTAATACAATTATATTTGCAATGG 3'

TaPIN1R 5' AAAAATCTTAAGCTAGTATTAATTCC 3'



Şekil 2.5 Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit için delesyon primerlerin tasarımı [123]

2.2.4.2 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İntronun Uzaklaştırılması için Mutagenesis Primerler ile PCR

Rekombinant plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak, tasarlanan mutagenesis primerler ile Çizelge 2.12'de yer alan bileşenlerle amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Mutagenesis kit protokolüne göre, hedef geni içeren vektör büyüklüğüne göre uzama sıcaklığı belirlendikten sonra PCR döngü koşulları 98 °C'de 10 sn , 59 °C'de 10 sn ve 72 °C'de 1,40 dk 25 döngü olarak uygulanmıştır. PCR ürününü saf olarak elde etmek amacıyla Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit protokolü uygulanmıştır [121].

Çizelge 2.12 Site-Directed Mutagenesis Kit ile *Ta*PIN1'den intronun uzaklaştırılması için kullanılan PCR bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12.5 µl
10 µM <i>Ta</i> PIN1F	1.25 µl
10 µM <i>Ta</i> PIN1R	1.25 µl
Kalıp DNA	1 µl
Water nuclease-free	9 µl
	25 µl

2.2.4.3 Kinaz-Ligaz-Dpn1 Reaksiyonu

PCR sonrası elde edilen intronsuz DNA ürünü, çift zincirli dairesel plazmid DNA oluşturmak ve ortamdan intronu içeren kalıp DNA'yı uzaklaştırmak için Çizelge 2.13'te yer alan Kinaz-Ligaz-Dpn1 (KLD) reaksiyon bileşenleri ile muamele edilmiştir. Kinaz enzimi, PCR sonrası elde edilen birbirine komplementer DNA zincirlerin 5' uçlarına fosfat grubu ekledikten sonra ligaz enzimi ile çift zincirli dairesel DNA'nın oluşturulması amacıyla ligasyon gerçekleştirir [123]. Dpn1 restriksiyon enzimi ise, metil grubu içeren intronlu kalıp DNA'yı tanıyarak degradasyona uğratıp ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar [124].

Çizelge 2.13 Kinaz-Ligaz- Dpn1 Reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
PCR ürünü	1 µl
2X KLD Reaksiyon Tamponu	5 µl
10X KLD Enzim Karışımı	1 µl
Nuclease-free Water	3 µl
	10 µl

Bileşenler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra doğrudan transformasyonda kullanılmıştır.

2.2.4.4 İtronu Uzaklaştırılan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Kompetan *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu

5 µl KLD örneği 50 µl kompetan *E. Coli* NEB 5-alpha hücrelerine eklendikten sonra 30 dk buzda bekletilmiştir. 42 °C'de 30 sn ısı şoku uygulanıp tekrar 5 dk buzda bekletilmiştir. 950 µl SOC medium solüsyonu eklenmiştir. Karışım 37 °C'de çalkalamalı etüvde 250 devirde 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, amfisilin içeren petrilere farklı hacimlerde ekim yapılarak 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

2.2.4.5 İtronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü

E. coli NEB 5-alpha hücrelerine transformasyon kontrolü koloni PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Petrilere gelişen beyaz tek kolonilere kürdanla dokunulup amfisilin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine eklenmiştir. Bakteri gelişimi için 37 °C'de 180 devirde 1 gece inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerden 100 µl'si 13.000 devirde 7 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, pellet 100 µl dH₂O ile çözündürülmüştür. Çözelti kaynar su buharında 10 dk bekletildikten sonra 13.000 devirde 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kalıp olarak kullanılarak Çizelge 2.14'te verilen bileşenler ile koloni PCR gerçekleştirilmiştir. Pozitif olan koloniler gliserol stoğu hazırlanarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.14 Koloni PCR için kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktar
10x Taq Polimeraz Tamponu +KCl-MgCl ₂	5 µl
MgCl ₂	3 µl
TaPIN1LICF	2,5 µl
TaPIN1LICF	2,5µl
Kalıp DNA	1 µl
Taq Polimeraz	1 µl
dH ₂ O	30 µl
	50 µl

2.2.5 İntronu Uzaklaştırılan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu ve Koloni PCR ile Kontrolü

İleri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanılmak üzere gen ürününün ifade edilmesi ve üretilmesine imkan sunacak *TaPIN1* geni *E. coli* BL21 (DE3) ekspresyon hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyonda kullanılmak üzere Bölüm 2.2.3.3'te yer alan protokole göre CaCl_2 solüsyonu ile kompetan *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri hazırlanmıştır ve intronsuz *TaPIN1* geni kompetan hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu Bölüm 2.2.4.5'te yer alan koloni PCR protokolü uygulanarak kontrol edilmiştir. Pozitif olan koloniler gliserol stoğu hazırlanarak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

2.2.6 İntronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile Kontrolü

TaPIN1 gen dizisinden doğru intron bölgesinin uzaklaştırılıp, doğru gen dizisinin insersiyonu DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir. Bu amaçla pozitif kolonilerde plazmid DNA izolasyonu için Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Kit protokolü uygulanmıştır [122]. Elde edilen plazmid DNA ile LIC sistemine uygun tasarlanan 5' ve 3' primerler dizilemeye gönderilmiştir.

2.2.7 Yabanıl Tip ve Mutant *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimlerin Homoloji Modellenmesi

Yapıya dayalı ilaç tasarımı, 3B makromolekül yapının bağlanma bölgesi belirlenerek ligand ile öngörülen etkileşimleri temel alınıp ligand tasarımı ve değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bu yüzden, ilaç hedefinin (enzim/reseptör) yapı bilgisinin elde edilmesi yapıya dayalı ilaç tasarımının ilk adımını oluşturmaktadır [68], [69], [70]. Tez çalışmasında homoloji modelleme uygulanarak yabanıl tip ve mutant *T. annulata* peptidil prolil izomeraz proteinlerin 3B yapıları öngörülmüştür. Homoloji modelleme, kalıp belirleme, dizi eşleştirme, model oluşturma, yapı düzeltilmesi ve validasyon olmak üzere 4 adımdan oluşmaktadır. *TaPIN1* amino asit dizisi PSI-BLAST (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool) web sunucusuna yüklenerek, PDB'de var

olan proteinler ile dizi eşleştirme sonucuna göre en yüksek benzerlik oranı gösteren protein kalıp olarak belirlenmiştir. MUSCLE sunucusu yardımıyla kalıp protein ile *TaPIN1* amino asit dizi eşleştirmesi gerçekleştirilmiştir [125]. Protein modellemesi, MODELLER v9.15 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [87]. Modelleme işlemi yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* için ayrı uygulanmış olup programa temel girdiler, yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* amino asit dizileri ve kalıp protein 3B yapısıdır. Dizi eşleştirmeleri program tarafından yapılarak her iki tip protein için 50 farklı model oluşturulmuştur. Oluşturulan her iki tip 50 farklı modelden DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) skoru en düşük olanlar model olarak seçilmiştir. Seçilen modelleri, deneysel hedef yapısına yakınlaştırmak amacıyla, enerji optimizasyonu Chimera v1.10.2 programı ile 2000 adımda ve AMBER 14SB kuvvet alanı uygulanarak gerçekleştirilmiştir [126]. Enerji optimizasyonu yapıldıktan sonraki aşama modellerin validasyonudur. Validasyon işlemi için 4 farklı web sunucusu kullanılmıştır. Kullanılan ilk sunucu ERRAT olup, atomik etkileşime dayalı protein yapılarının doğru ve yanlış tanımlanmış bölgeleri istatistiksel olarak belirlenmiştir [127]. Validasyon amaçlı ikinci kullanılan program ProSa olup model proteinler ile X-ray ve NMR aracılığıyla yapısı belirlenen proteinlerin eşleştirilmesine dayanarak elde edilen enerji skoru ile konformasyonları değerlendirilmiştir [128]. Model validasyonu amacıyla kullanılan üçüncü program ProQ ile LGscore belirlenerek protein modellerinin kalitesi değerlendirilmiştir [129]. Son olarak model validasyonu RAMPAGE programı ile gerçekleştirilmiştir ve Ramachandran diagramı oluşturulmuştur [130].

Oluşturulan her iki tip *TaPIN1* modellerin kalıp protein ile süperimpozisyonu Chimera v1.10.2 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.8 Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi İçin Moleküler Kenetlenme Temelli Sanal Tarama

Küçük molekküllerden oluşan kütüphanelerden öncü inhibitörlerin belirlenmesi amacıyla, molekküllerin hedef reseptör/enzim aktif bölgesine kenetlenmesi, sanal taramada en yaygın kullanılan yapıya dayalı ilaç tasarım yöntemidir [93], [94]. Moleküler kenetlenme, Schrödinger Small - Molecule Drug Discovery yazılımı kullanılarak Maestro 2017.1 programı ile gerçekleştirilmiştir. Sanal tarama amacıyla,

Ehb_cc_motif (Yüklü-yüklü hidrojen bağ motifleri): Hem teorik hem de ampirik hususlara dayanarak yüklü-yüklü hidrojen bağlama motiflerini ifade eder;

EPI: pi istifleme ve pi-kasyon etkileşimlerine karşılık gelen terim olup hidrofobik bölgelere yerleştirilen halojen atomlarını ifade eder;

Ehb_pair: çift hidrojen bağının oluşturduğu enerji;

Ephobic_pair: hidrofobik etkileşimlerden oluşan enerji

Epenalty: Bağlanmaya karşı gelen en önemli fiziksel etkiler, ligandın, proteinin veya her ikisinin gerilme enerjisi (Eligand_strain), ligand ve proteinde entropi kaybı ve ligand veya proteinin çözüldüğü ortamdan uzaklaştırılmasıdır (Edesolv). Bu engelleri penalize etmek amacıyla geliştirilen terimlerdir.

Belirlenen ligandların serbest bağlanma enerjileri Prime [137] programı kullanılarak MM-GBSA (Moleküler Mekanik / Poisson-Boltzmann Yüzey Alanı) metodolojisi [138] ile aşağıda yer alan formüle göre hesaplanmıştır.

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

ΔG : toplam serbest bağlanma enerjisi;

E_{Kompleks} : ligand-protein kompleks yapının serbest bağlanma enerjisi;

E_{ligand} : ligand serbest bağlanma enerjisi;

$E_{\text{reseptör}}$: reseptör serbest bağlanma enerjisi.

2.2.9 Moleküler Dinamik Simülasyon Çalışmaları

Moleküler dinamik simülasyonu, yapıya dayalı ilaç tasarımında yaygın kullanılan bir yöntem olup molekül ve atomların etkileşimlerinin ve hareketlerinin incelenmesine imkan sunar [107]. Sağladığı avantaj sayesinde, moleküler kenetlenme sırasında ligand tarafından indüklenmiş reseptör yapısındaki konformasyonel değişikliklerin ve stabilitesinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmektedir [108], [109]. Bu amaçla, ligand bağlı olmadan yabanıl tip ve mutant TaPIN1 öngörülen yapılarının ve ligand bağlı her iki tip TaPIN1 kompleks yapıların MD simülasyonu AMBER yazılım paketi ile gerçekleştirilmiştir [116].

2.2.9.1 Yabanıl Tip ve Mutant TaPIN1 Homoloji Modellerin Moleküler Dinamik Simülasyonu

Yabanıl tip ve mutant TaPIN1 homoloji model yapıları için moleküler dinamik simülasyonu AMBER ff14SB kuvvet alanı uygulanarak gerçekleştirilmiştir [139]. Uygun sıvı ortamı oluşturmak için her iki sisteme 10 Å büyüklüğündeki kübik içerisinde TIP3PBOX [140] su molekülü eklenmiştir. Ardından Cl⁻ ve Na⁺ iyonları ortama eklenerek sistemler nötralize edilmiştir. Enerji minimizasyonu toplamda 10.000 adımda gerçekleştirilmiştir. Sistem girdileri Çizelge 2.15'te yer almaktadır. İlk 1000 adım Steepest Descent ve bunu takiben 9000 adım konjuge gradient algoritmaları ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.15 Enerji minimizasyonu için koşulların tanımlandığı sistem girdileri.

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

imin=1, minimizasyon;

ntx=1, ASCII formatındaki koordinat dosyalarını oku;

irest=0, simülasyonu yeniden başlatma;

maxcyc=10000, maksimum enerji minimizasyonu basamağı;

ncyc=1000, ilk 1000 döngü steepest descent algoritması sonraki basamaklar konjuge gradian algoritması;

ntp=100, çıktıları yaz;

ntwx=0, koordinat dosyalarını yazma;

cut=8.0, Nonbonded cutoff uzaklığı (angstrom) ifade etmektedir.

10000 döngü enerji minimizasyonu yapıldıktan sonra simülasyon öncesi Çizelge 2.16'daki koşullar ile Langevin termostadı [141] uygulanarak sistem ısıtılır.

Çizelge 2.16 Sistemin ısıtılması için koşulların tanımlandığı sistem girdi bilgileri.

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

imin = 0, moleküler dinamik simülasyonu seçimi;
cut = 9, Nonbonded cutoff uzaklığı (angstrom);
ntb = 2, sabit basınç;
nstlim = 100000, MD simülasyon basamak sayısı;
dt = 0.002, adım zamanı (pikosaniye);
ntt = 3, langevin termostat ile sıcaklık kontrolü;
gamma_ln = 1.0, langevin termostat çarpışma frekansı;
tempi = 10.0, başlangıç sıcaklığı;
temp0 = 300.0, son sıcaklık;
ntc = 2, bağ gerilmesinin simülasyonunda SHAKE modu ;
ntf = 2, bağ etkileşmelerinde simülasyonunda SHAKE modu;
ntp = 1, sabit basınç;
ntwx = 200, her 200 basamakta koordinatları yaz;
ntwe = 5, her 5 basamakta enerji ve sıcaklık değerlerini yaz;
ntpr = 5, her 5 basamakta enerji ve tüm enerji değerlerini yaz;

200 pikosaniyelik sistemin ısıtılması sonrası Çizelge 2.17’de yer alan koşullar ile yabanıl tip ve mutant TaPIN1 öngörülen yapıların simülasyonu 50 ns’de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.17 MD simülasyon koşullarının tanımlandığı sistem girdisi.

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

imin = 0, moleküler dinamik simülasyonu seçimi

cut = 9, Nonbonded cutoff uzaklığı (angstrom)

ntb = 2, ntb = 2, sabit basınç

nstlim = 2500000, MD simülasyon basamak sayısı

dt = 0.002, adım zamanı (pikosaniye)

ntt = 1, langevin termostat ile sıcaklık kontrolü

tempi = 10.0, başlangıç sıcaklığı

temp0 = 300.0, son sıcaklık

ntc = 2, bağ gerilmesinin simülasyonunda SHAKE modu

ntf = 2, bağ etkileşimlerinde simülasyonunda SHAKE modu

ntp = 1, sabit basınç

irest = 1, bir önceki simülasyondan devam et

ntx = 5, bir önceki simülasyondan hızı ve koordinatları oku

ntwx = 500, her 500 basamakta kordinatları yaz

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

ntpr = 50, her 50 basamakta tüm enerji değerlerini yaz

&end

&ewald

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

SHAKE algoritması [142] uygulanarak simülasyon sırasında tüm atomların bir arada tutulması sağlanmıştır.

2.2.9.2 Kenetli Bileşiklerin Moleküler Dinamik Simülasyonu

Yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* ile naftakinon bileşiklerin moleküler kenetlenmesi sonrası kenetlenmiş pozlar XP GlideScore'a göre sıralanmıştır. En yüksek bağlanma afinitesi gösteren iki öncü ligand-protein kompleks yapıları için MD simülasyonu AM1-BCC yük modeli [143] ile genel AMBER kuvvet alanı (gaff) uygulanarak gerçekleştirilmiştir [144]. Uygun sıvı ortamın oluşturulması ve sistemlerin nötrleştirilmesi ligand bağlı olmayan homoloji model sistemleri ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. MD simülasyon öncesi enerji minimizasyonu ve sistemin ısıtılması sırasıyla Çizelge 2.15 ve Çizelge 2.16'da verilen koşullar ile gerçekleştirilmiştir. MD simülasyon 100 ns boyunca Çizelge 2.17'de yer alan koşullar ile gerçekleştirilmiştir.

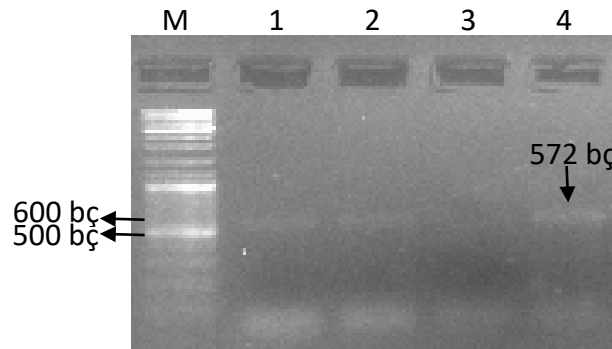


SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Sonuçlar

3.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Genomik DNA'dan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Geninin Amplifikasyonu

Theileria Annulata peptidil prolil izomeraz enzimini kodlayan genin eldesi için intronlu *TaPIN1* gen dizisine spesifik *TaPIN1* 5' ve 3' primerler tasarlanmış ve kalıp olarak *Theileria annulata* genomu kullanılmıştır. Long PCR Enzyme Mix polimeraz enzimi ile Çizelge 2.8'de yer alan bileşenler kullanılarak intronlu *TaPIN1* genin polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İtronlu 572 baz çifti uzunluğunda *TaPIN1* PCR ürünü etidyum bromür içeren jel elektoroforezinde yürütülmüş ve jel görüntüsüne Şekil 3.1'de yer verilmiştir.

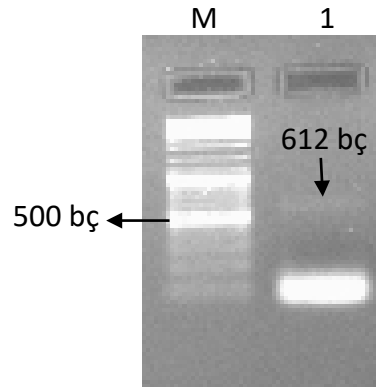


Şekil 3.1 Gen dizisine spesifik primerler ile amplifiye edilen intron bölgesi içeren *TaPIN1* PCR ürünü. Hat M: GeneRuler marker; Hat 1,2 ve 4: İtron bölgesi içeren 572 bç'lik *TaPIN1* geni; bç: baz çifti.

3.1.2 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Aktarılarak Alt Klonlanması

3.1.2.1 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin LIC Sistemine Spesifik Primerler ile Amplifiye Edilmesi

Kodlamayan bölge içeren *TaPIN1*'in pLATE31 vektörüne alt klonlanması için yapışkan uçların oluşturulması amacıyla, LIC sistemine spesifik olarak tasarlanan *TaPIN1LIC* 5' ve 3' primerler ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Kalıp olarak, gen dizisine spesifik primerler ile amplifiye edilen intronlu *TaPIN1* PCR ürünü kullanılmıştır. Long PCR enzimi ile Çizelge 2.9'da yer alan bileşenler kullanılarak Bölüm 2.2.1.2'de verilen protokole göre polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrası intronlu 572 bç'lik *TaPIN1* genin 5' ucuna vektöre spesifik 19 nükleotid ve 3' ucuna vektöre spesifik 21 nükleotid eklenmesiyle 612 bç'lik intronlu *TaPIN1* geni elde edilmiştir. PCR ürünü Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit protokolüne göre saflaştırılmıştır [121]. Saflaştırılan, vektöre spesifik dizileri içeren intronlu 612 bç'lik *TaPIN1* PCR ürünü etidyüm-bromür eklenen jel elektroforezinde yürütülmüş ve jel görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 LIC sistemine spesifik primerler ile amplifiye edilen saf PCR ürünü. Hat M: GeneRuler marker; Hat 1: vektöre spesifik dizileri içeren intronlu 612 bç'lik *TaPIN1*.

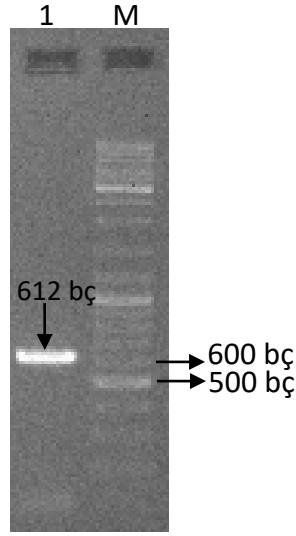
3.1.2.2 *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin İfade Vektörüne Klonlanması ve Rekombinant Plazmid DNA'nın *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Hücrelerine Transformasyonu

Saf PCR ürünü Bölüm 2.2.3.3'te belirtilen sistem protokolüne göre, Çizelge 2.10'da yer alan bileşenler ile karıştırıldıktan sonra pLATE31 ifade vektörüne alt klonlanması gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 2.2.3.3'ye yer alan protokole göre kompetan *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücreleri oluşturulduktan sonra pLATE31 ifade vektörüne aktarılan intronlu *TaPIN1*'in kompetan hücrelere transformasyonu gerçekleştirilmiştir. pLATE31 ifade vektörü pozitif koloni seçimine olanak sağlayan amfisilin direnç geni içermektedir [120]. Buna göre transformasyon sonucunda, amfisilin direnç gen bölgesi içeren rekombinant DNA'yı bulunduran *E. coli* hücrelerinin geliştiği beyaz koloniler pozitif kabul edilmiştir. Tek koloni seçilerek amfisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür gelişimi için 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

3.1.2.3 Klonlanan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR Metodu ile Kontrolü

Geliştirilen kültürlerin kontrolü için, Bölüm 2.2.3.4' te yer alan Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Kit protokolü uygulanarak rekombinant plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak Bölüm 2.2.1.2'de yer alan PCR protokol koşulları uygulanarak Çizelge 2.11'de yer alan bileşenler ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü, etidyum-bromür içeren %1'lik agaroz jel elektroforezde yürütülmüştür. *E. coli* hücrelerine başarılı transformasyon, Şekil 3.3'te yer aldığı üzere vektöre spesifik dizi içeren intronlu 612 bp'lik *TaPIN1* genin gözlenmesiyle teyit edilmiştir.



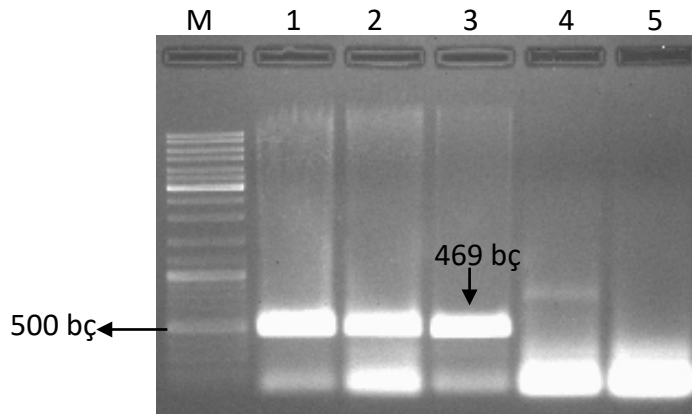
Şekil 3.3 Rekombinant Plazmid DNA'dan PCR sonrası elde edilen jel elektroforez görüntüsü. Hat M: GeneRuler marker; Hat 1: 612 bç'lik intronlu *TaPIN1*.

3.1.3 Yönlendirilmiş Mutagenез ile *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Gen Dizisinden İtronun Uzaklaştırılması ve Kompetan *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu

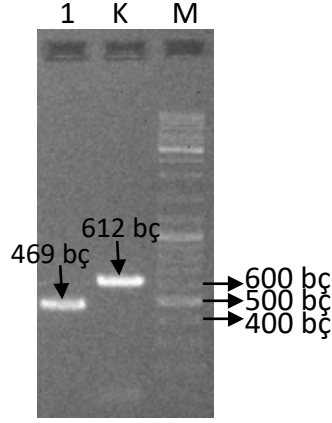
TaPIN1 gen dizisinde tanımlanan bir tane intronun uzaklaştırması için delesyon mutasyonu Q5 Site-Directed Mutagenез Kit protokolüne göre rekombinant plazmid DNA üzerinde gerçekleştirilmiştir. Delesyon, Bölüm 2.2.4.2'de yer alan PCR protokol koşullarına göre ve Çizelge 2.12'de yer alan bileşenler ile gerçekleştirilmiştir. Transformasyonda kullanılmak üzere, yeniden çift zincirli plazmid DNA elde etmek ve ortamdan intronu içeren kalıp DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla Bölüm 2.2.4.3'te yer alan kit protokolüne göre, PCR ürünü kullanılarak Çizelge 2.13'te belirtilen bileşenler ile KLD reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen KLD örneği ile kitin önerdiği hazır kompetan *E. coli* DH5α hücrelerine transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonucunda, amfisilin direnç gen bölgesi içeren rekombinant DNA'yı bulunduran *E. coli* DH5α hücrelerinin geliştiği beyaz koloniler pozitif kabul edilmiştir. Kolonilerden 5 tane seçilerek amfisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür gelişimi için 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

3.1.3.1 İntronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin Koloni PCR Metodu ile Kontrolü

Geliştirilen kültürlerin kontrolü için, Bölüm 2.2.4.5’de yer alan koloni PCR protokolü uygulanarak Çizelge 2.14’te yer alan bileşenler ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, etidyum bromür içermeyen %1’lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmek amacıyla GeneDirex DNA Ladders ile muamele edilmiştir. 143 bç’lik intronun delesyonu ile, pLATE31 vektöre spesifik dizileri (40 nükleotid) içeren intronsuz 469 bç’lik *Ta*PIN1 koloni PCR ürünlerin tamamı jel elektroforezinde yürütülmüştür. Jel görüntüsü Şekil 3.4’te yer almaktadır. Koloni PCR sonucuna göre, 1, 2 ve 3. koloniler pozitif 4 ve 5. koloniler negatif olarak belirlenmiştir. Koloni 1 ile intronsuz rekombinant plazmid DNA’nın izolasyonu Bölüm 2.2.3.4’te yer alan Wizard® Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. İntronsuz rekombinant plazmid DNA kalıp olarak kullanılarak Bölüm 2.2.1.2’de yer alan PCR protokol koşullarına göre Çizelge 2.11’de belirtilen bileşenler ile PCR gerçekleştirilmiştir. Kontrol amaçlı intronlu rekombinant plazmid DNA ile PCR yapılmıştır. PCR ürünleri, GeneDirex DNA Ladder ile muamele edilip, etidyum bromür içermeyen jel elektroforezde görüntülenmiştir (Şekil 3.5).



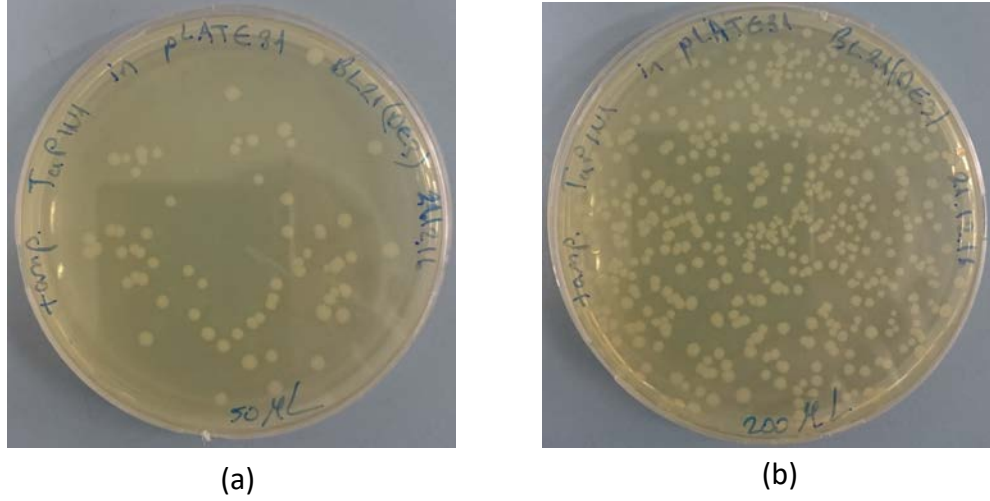
Şekil 3.4 Koloni PCR sonrası elde edilen intronsuz PCR ürünü. Hat M: GeneRuler marker; Hat 1,2,3: Pozitif PCR sonucu; Hat 4 ve 5: Negatif PCR sonucu.



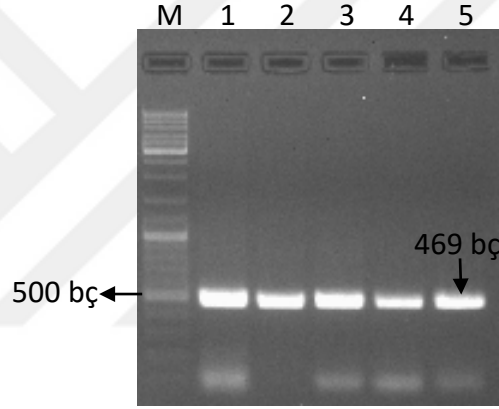
Şekil 3.5 İntronlu ve intronsuz rekombinant plazmid DNA'dan PCR sonrası elde edilen jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler marker; Hat 1: intronsuz 469 bç'lik *TaPIN1*; Hat K: intronlu 612 bç'lik *TaPIN1*.

3.1.4 İntronu Uzaklaştırılan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu ve Koloni PCR ile Kontrolü

İleri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanılmak üzere gen ürününün ifade edilmesi ve üretilmesi amacıyla *TaPIN1* geni *E. coli* BL21(DE3) ekspresyon hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyonda kullanılmak üzere Bölüm 2.2.3.3'te yer alan protokole göre CaCl_2 solüsyonu ile kompetan *E. coli* BL21(DE3) hazırlanmıştır ve intronsuz *TaPIN1* geni kompetan hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonucunda, amfisilin direnç gen bölgesi içeren rekombinant DNA'yı bulunduran *E. coli* hücrelerinin geliştiği beyaz koloniler (Şekil 3.6) pozitif kabul edilmiştir. Beyaz kolonilerden 5 tane seçilerek amfisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür gelişimi için 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerin kontrolü, Bölüm 2.2.4.5'te yer alan koloni PCR protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Koloni PCR ürününün 5 µl'si GeneDirex DNA Ladder ile muamele edildikten sonra, etidyum bromür içermeyen agaroz jel elektroforezde görüntülenmiştir (Şekil 3.7).



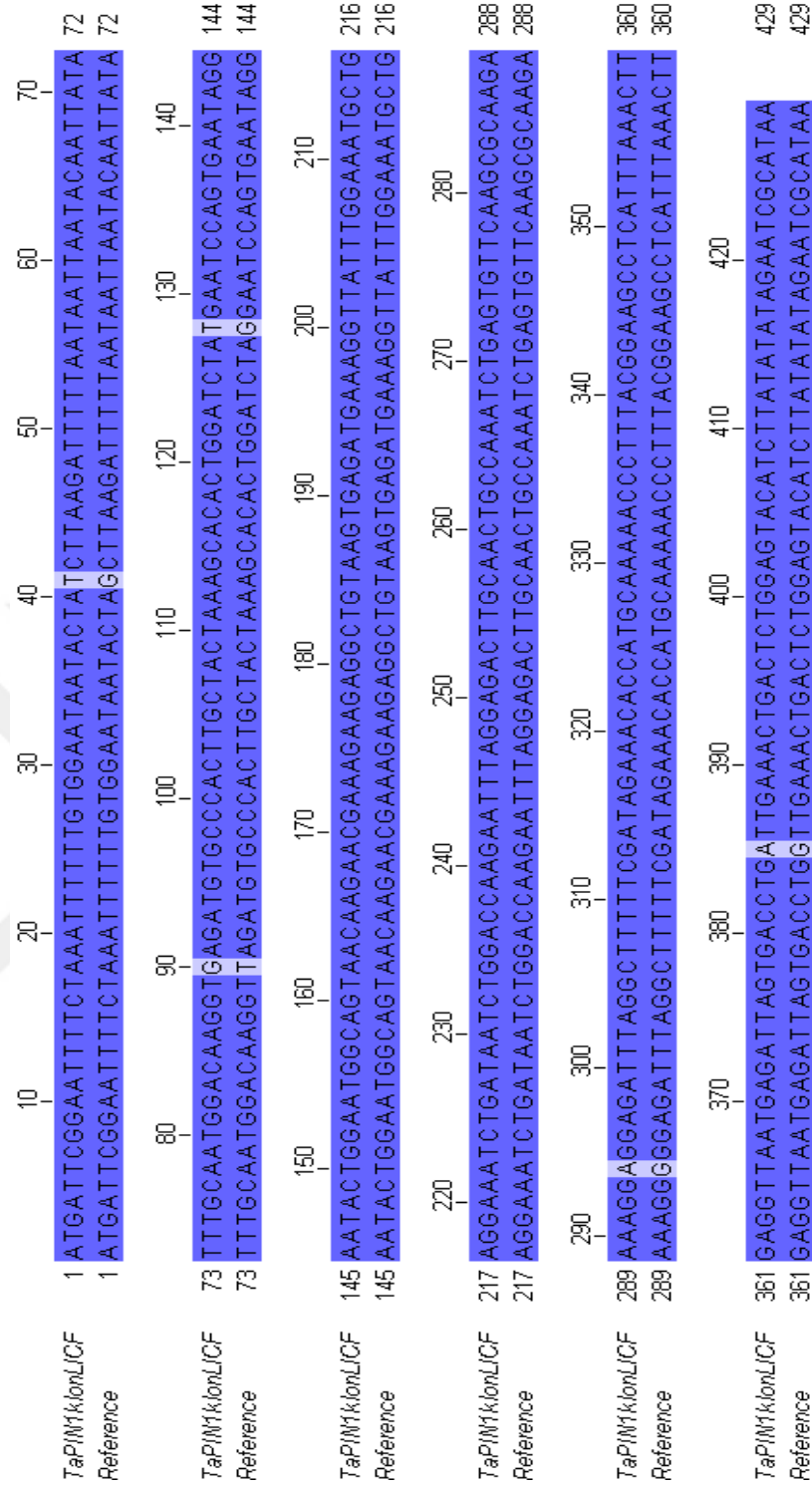
Şekil 3.6 Transformasyon sonuçları. (a) 50 µl transformasyon petrisi; (b) 200 µl transformasyon petrisi.



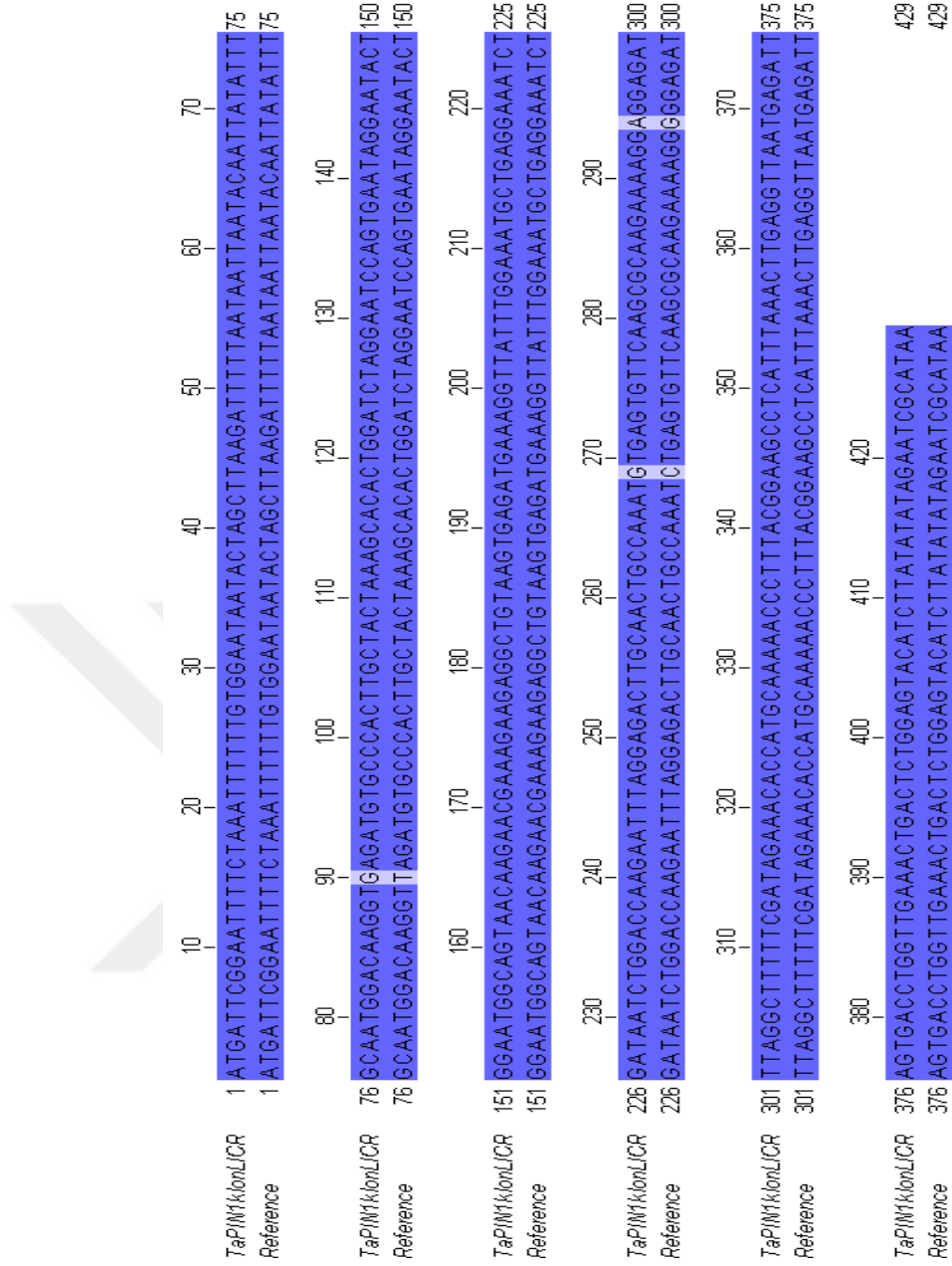
Şekil 3.7 Koloni PCR sonrası elde edilen jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler marker; Hat 1,2,3,4 ve 5: Pozitif PCR sonucu.

3.1.5 İntronu Uzaklaştırılan ve Klonlanan *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Enzimini Kodlayan Genin DNA Dizi Analizi ile Kontrolü

TaPIN1 gen dizisinden intron bölgesinin uzaklaştırılıp, pLATE31 vektöre 429 bp'lık doğru gen dizisinin insersiyonu DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir. Dizileme işlemi için LIC sistemine göre tasarlanmış 5' ve 3' primerler gönderilmiştir. LIC 5' ve 3' primerler kullanılarak elde edilen dizi sonuçları ile referans dizinin eşleştirilmesi MUSCLE sunucusu yardımıyla gerçekleştirilmiştir [125] ve eşleştirme sonuçları sırasıyla Şekil 3.8 ve 3.9'da yer almaktadır.



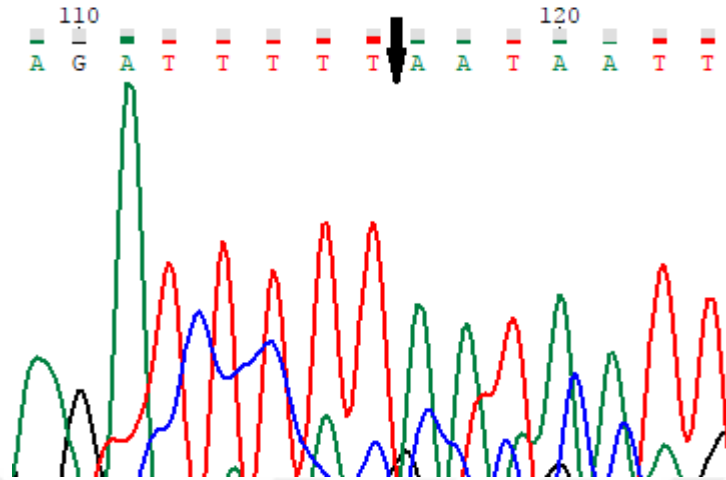
Şekil 3.8 LIC 5' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile *Theileria annulata* PIN1'in referans dizisinin eşleştirme sonucu. 1. sıra: Klonladığımız intronsuz *TaPIN1* gen dizisi; 2. sıra: *Theileria annulata* PIN1 enzimini kodlayan gen dizisi



Şekil 3.9 LIC 3' primerler ile elde edilen klon gen dizisi ile *Theileria annulata* PIN1'in referans dizisinin eşleştirme sonucu. 1. sıra: Klonladığımız intronsuz TaPIN1 gen dizisi; 2. sıra: *Theileria annulata* PIN1 enzimini kodlayan gen dizisi.

Eşleştirme sonucu tanımlanan nükleotid değişikliklerin, LIC 5' ve 3' primerler ile dizileme sonucu elde edilen kromatogram görüntülerin karşılaştırılması ile hatalı dizilemeden kaynaklandığı teyit edilmiştir (EK-A Çizelge A.1 ve A.2).

Şekil 3.10'da yer alan kromatogram görüntüsünde okla belirtilen kısım ile *Ta*PIN1 geninden intronun uzaklaştırıldığı gösterilmiştir.



Şekil 3.10 *Ta*PIN1 gen dizisinden intronun uzaklaştırıldığını gösteren kromatogram görüntüsü.

Önerilen tez çalışmasının *in vitro* aşamasında, *Theileria annulata* peptidil prolil izomeraz enzimini kodlayan gen klonlanmış ve insersiyonu DNA dizileme ile teyit edilmiş olup ileri *in vitro* karakterizasyon ve tez çalışmasında *in silico* çalışmalar sonucunda belirlenmiş potansiyel inhibitörler ile test çalışmalarında kullanılmak üzere gen ürününün ifade edilip üretilmesi için hazır hale getirilmiştir.

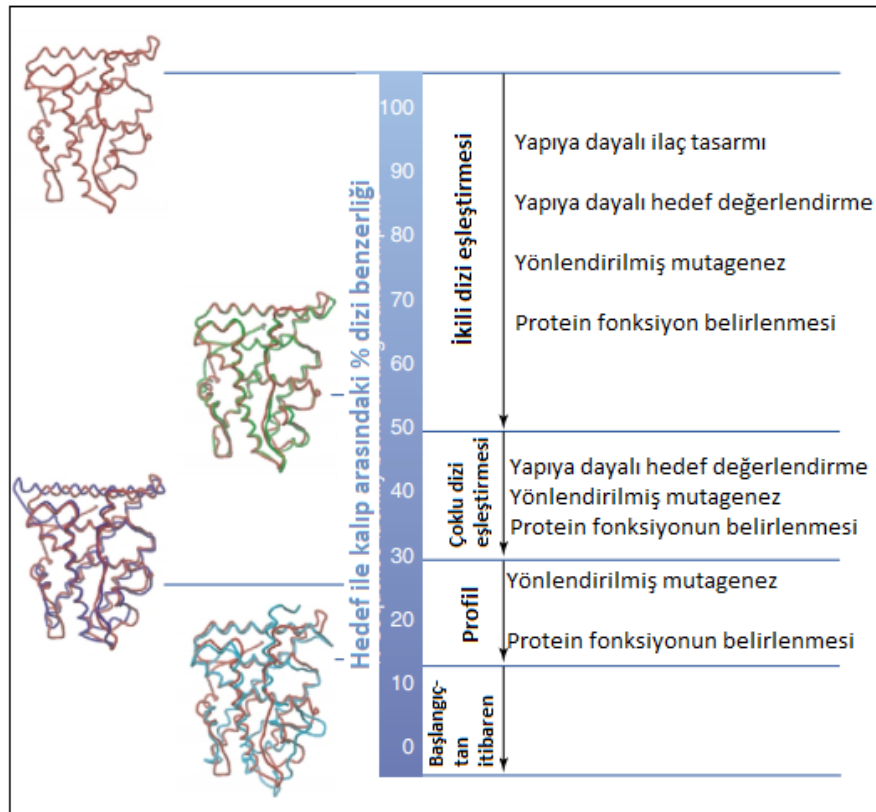
3.1.6 Yabanıl Tip ve Mutant *Theileria annulata* Peptidil Prolil İzomeraz Proteinlerin Homoloji Modellenmesi ve Validasyonu

Potansiyel inhibitörlerin belirlenmesi amacıyla bilgisayar destekli ilaç tasarımı kullanılmak üzere yabanıl tip ve ilaç direnci gösteren mutant *Ta*PIN1'in homoloji modellenmesi gerçekleştirilmiştir. Modelleme işleminin kalıp belirleme ve yapısı bilinen protein dizileri ile benzerlik oranlarının tanımlanması için dizi eşleştirme adımları, pozisyona spesifik PSI-BLAST sunucusu ile gerçekleştirilmiştir. Eşleştirme sonucuna göre %47 dizi benzerliği gösteren 1NMW pdb numaralı sadece peptidil prolil izomeraz (PPIaz) alanı içeren insan PIN1'i yabanıl ve mutant *Ta*PIN1 homoloji modellenmesi için kalıp olarak belirlenmiştir. MUSCLE programı ile %47 oranında dizi benzerliği gösteren kalıp ile *Ta*PIN1 amino asit dizi eşleştirme sonucu Şekil 3.11'de yer almaktadır.

		10		20		30		40		
<i>TaPIN1</i>	1	MIRNFLN	FLVNN	---	TSLRFLI	INTI	IIFAMD	---	---	28
<i>1NMW</i>	1	MADEEKL	PPGW	EKRMSRS	SSGRVYY	FNH	ITNASQ	WERPSGN	SSSSGGKN	47
		50		60		70		80		90
<i>TaPIN1</i>	29	---	KVRCAHLL	LKHTGSR	NPNVNR	NTGMAV	TRTKEE	AVSEMK	GYL	69
<i>1NMW</i>	48	GQGE	PARVRC	SHLLVK	HSQSRP	SSWRQE	-K I	TRTKEE	ALELINGY	I 93
		100		110		120		130		
<i>TaPIN1</i>	70	EMLRKSD	NLDQE	FRRLATA	KSE	CSSARK	G	GGDLGF	FD	RNTMQKPFTEA 116
<i>1NMW</i>	94	QKIKSG	---	EEDFES	LASQF	SDCSSA	KARG	DLGAF	SRGQM	OKPFEDEA 137
		150		160						
<i>TaPIN1</i>	117	SFKLE	VNEI	SDLVET	D	SGVHL	IYRIA			142
<i>1NMW</i>	138	SFALR	TGEM	SGPVF	T	DSGIH	IILRTE			163

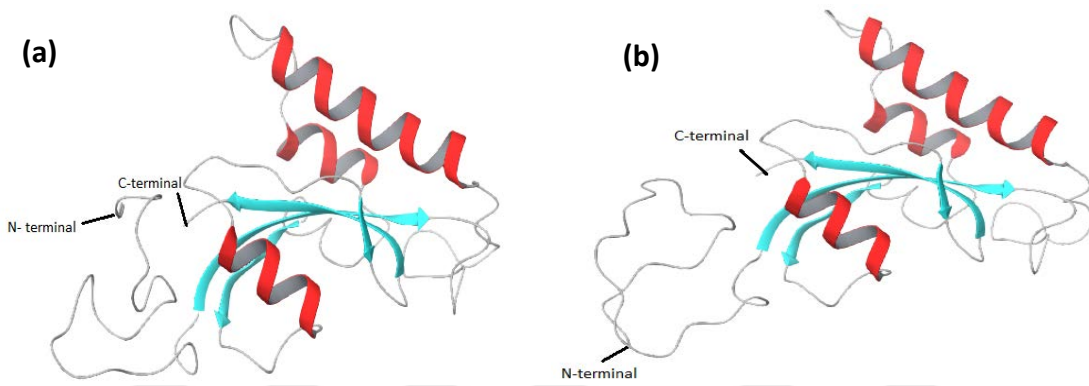
Şekil 3.11 *Theileria annulata* PIN1'in ve sadece PPlaz alanı içeren insan PIN1'in amino asitleri arasında eşleştirme. 1NMW: Kalıp protein a.a. dizisi; *TaPIN1*: *T. annulata* PIN1 a.a. dizisi.

Şekil 3.12'de görüldüğü üzere, hedef protein ile %30 ve üstü dizi benzerliği gösteren kalıp protein ile model oluşturulabilmektedir [77]. Buna göre, *TaPIN1* ile kalıp protein arasındaki %47 homoloji modelleme çalışmaları için iyi bir benzerlik oranıdır.



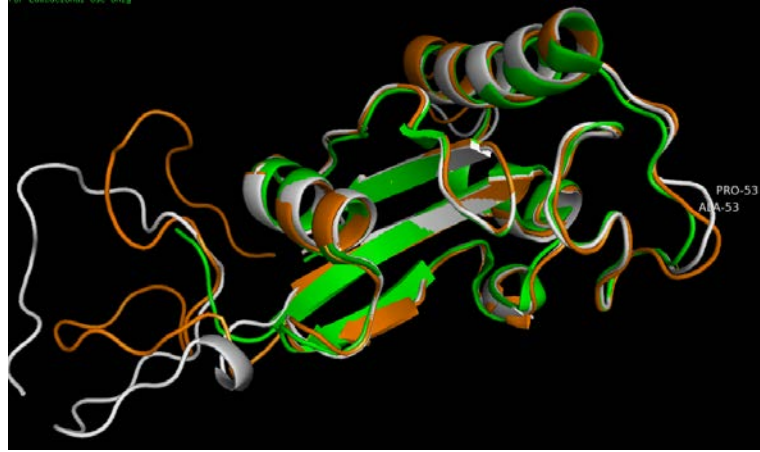
Şekil 3.12 Hedef ve kalıp protein arasındaki benzerlik ve elde edilen homoloji model ile uygulama alanları [77].

Yabanıl tip *TaPIN1* için, *TaPIN1* a.a. dizisi ve kalıp protein pdb dosyası MODELLER v9.15 programına girilerek 50 farklı model oluşturulmuştur. Aynı işlem ilaç direnci gösteren mutant *TaPIN1* için, A53P substitüsyon mutasyonu içeren *TaPIN1* a.a. dizisi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki tip *TaPIN1* için oluşturulan modellerin DOPE skoru hesaplanmıştır. DOPE skoru iç enerji ile ilgilidir ve düşük skora sahip olan yapılar daha kararlıdır. Bu açıdan. Her iki tip *TaPIN1* için, oluşturulan 50 farklı modelden DOPE skoru en düşük olan modeller moleküler kenetlenme çalışmaları için seçilmiştir. Yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* için seçilen en iyi modellerin görüntüleri sırasıyla Şekil 3.13a ve 3.13b’de yer almaktadır.



Şekil 3.13 Yabanıl tip (a) ve mutant (b) *TaPIN1* için seçilen en iyi modeller. Kırmızı ile gösterilen alfa sarmal, mavi ile gösterilen beta tabaka ve gri ile gösterilen tesadüfi kıvrımları ifade etmektedir.

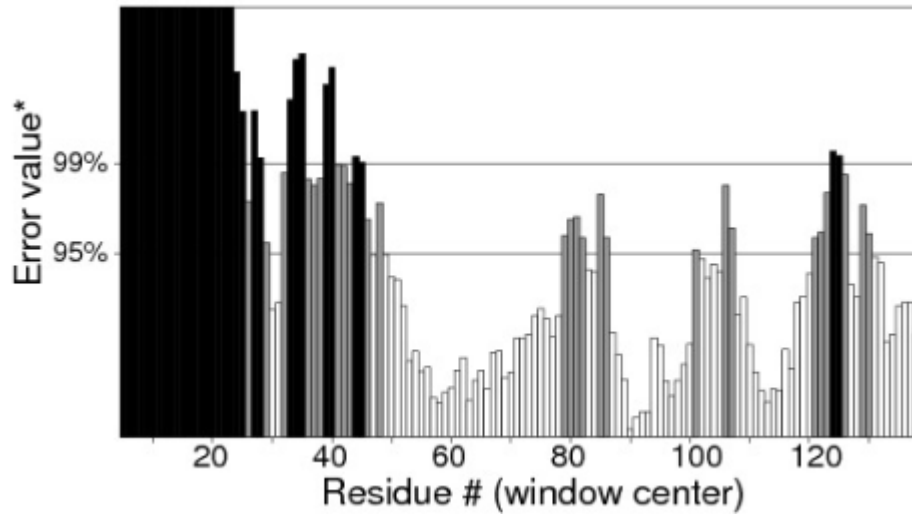
Seçilen modelleri, deneysel hedef yapısına yakınlaştırmak amacıyla, enerji minimizasyonu Chimera v1.10.2 programı ile AMBER 14SB kuvvet alanı uygulanarak 2000 döngüde gerçekleştirilmiştir. Enerji minimizasyonu sonrası elde edilen yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* modelleri kalıp olarak kullanılan sadece PPlaz alanı içeren hPIN1 ile süperimpozisyonu Chimera v1.10.2 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.14). Her iki tip model ile kalıp yapılarının karşılaştırılması sonucu, proteinlerin atomları arasındaki uzaklığı ifade eden root mean square deviation (RMSD) değeri Chimera v1.10.2 programı ile elde edilmiştir. Benzer yapıların RMSD değeri sıfırdır [145], buna göre RMSD değerinin sıfıra yakın olması modellerin kalıp proteine benzerliğini ifade etmektedir. Yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* için RMSD değerleri sırasıyla 0.479 Å ve 0.502 Å olarak belirlenmiştir.



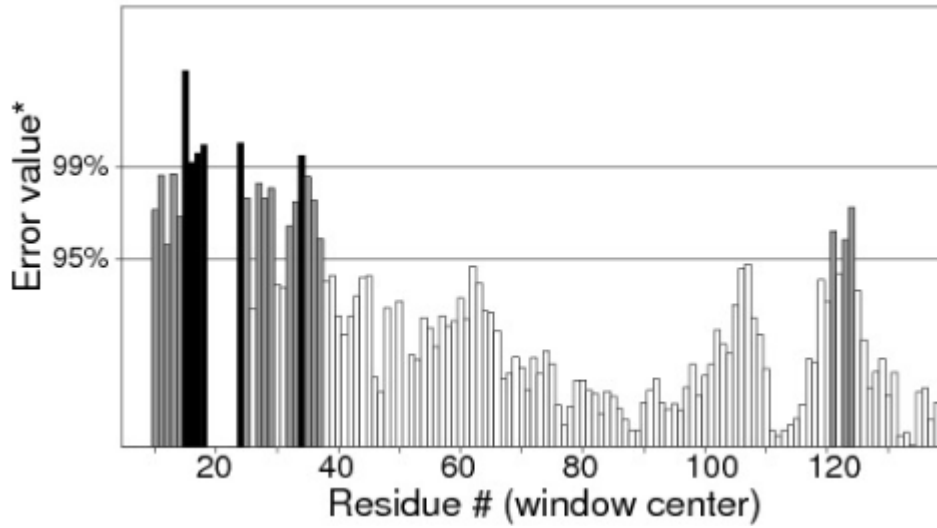
Şekil 3.14 Yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* modeller ile sadece PPlaz alanı içeren hPIN1 proteinin süperimpozisyonu. Yeşil: PPlaz alanı içeren hPIN1; Turuncu: yabanıl tip *TaPIN1* modeli; Beyaz: mutant *TaPIN1* modeli.

Oluşturulan modellerin validasyonu ilk olarak ERRAT sunucusu ile gerçekleştirilmiştir. ERRAT karakteristik atomik etkileşime dayalı protein yapılarının doğru ve yanlış belirlenmiş bölgelerinin ayırt edilmesine yönelik bir yöntem sunmaktadır. Atomlar karbon (C), nitrojen (N), ve oksijen (O) olarak üç kategoride sınıflandırılmaktadır. Buna göre, atomlar arasında ikili kovalent olmayan 6 farklı kombinasyon oluşmaktadır CC, NN, OO, CN, CO, NO [127]. ERRAT sunucusu ile her bir rezidünün atomlar arasındaki etkileşimler incelenerek, karakteristik olmayan etkileşimlerden kaynaklı hatalar istatistiksel olarak belirlenmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre, grafikte %95'in üzerinde koyu renkle gösterilen alanlarda hatalı olan amino asitler belirtilmektedir. Yabanıl tip *TaPIN1* modeli için, genel kalite faktörü, enerji minimizasyon öncesi ve sonrasında sırasıyla 56.716 ve 81.148 olarak belirlenmiştir. Yabanıl tip *TaPIN1*'in enerji minimizasyon öncesi ve sonrası ERRAT histogramı sırasıyla Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da yer almaktadır.

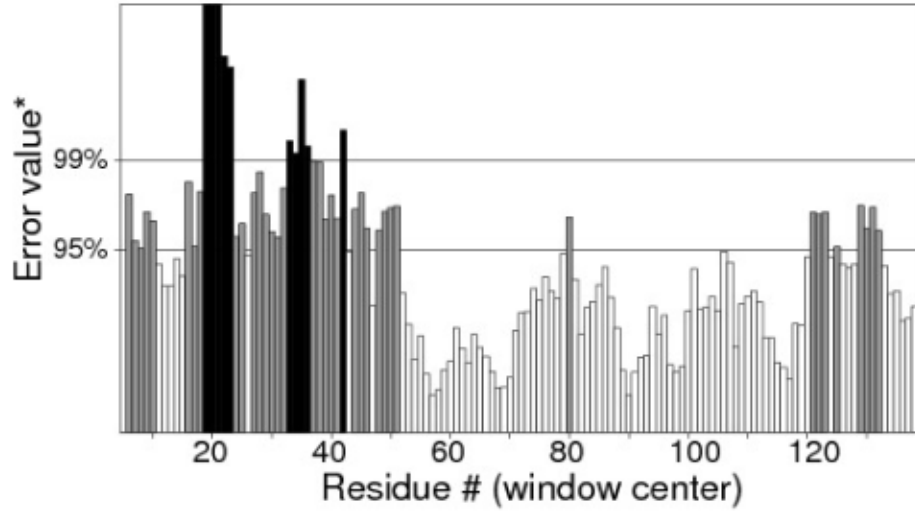


Şekil 3.15 Model yabanıl tip *TaPIN1*'in enerji minimizasyonu öncesi ERRAT sonucunun görüntüsü.

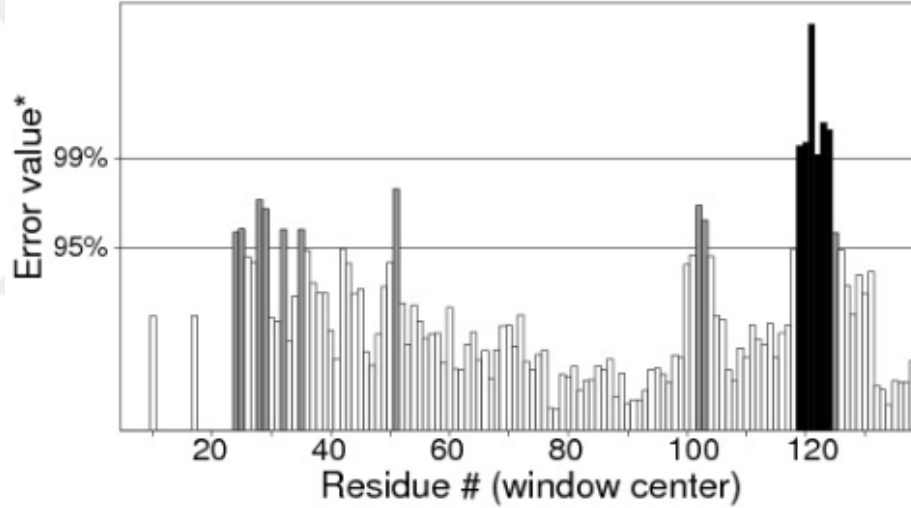


Şekil 3.16 Model yabanıl tip *TaPIN1*'in enerji minimizasyonu sonrası ERRAT sonucunun görüntüsü.

Mutant *TaPIN1* modeli için, ERRAT skoru enerji minimizasyon öncesi ve sonrasında sırasıyla 64.662 ve 86.325 olarak belirlenmiştir. Mutant *TaPIN1*'in enerji minimizasyon öncesi ve sonrası ERRAT histogramı sırasıyla Şekil 3.17 ve 3.18'de yer almaktadır.



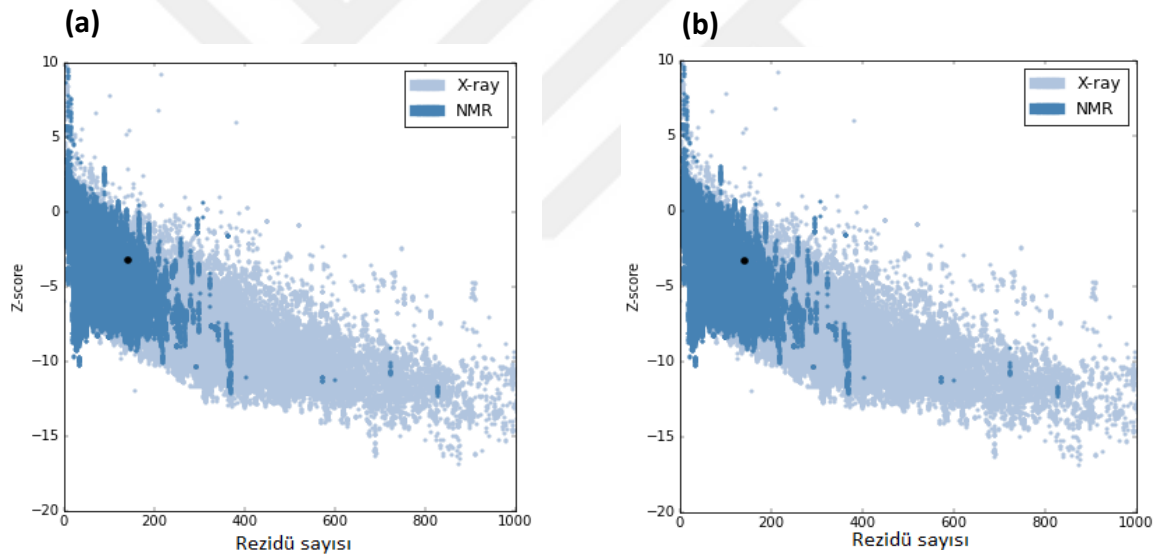
Şekil 3.17 Model mutant *TaPIN1*'in enerji minimizasyon öncesi ERRAT sonucunun görüntüsü.



Şekil 3.18 Model mutant *TaPIN1*'in enerji minimizasyon sonrası ERRAT sonucunun görüntüsü.

ProSA programı (Protein Yapı Analizi), öngörülen yapı ve modellerin optimizasyonu ve validasyonu için kullanılan araçtır. ProSA programı, protein yapılarında görülen potansiyel problemleri vurgulayan skorların ve enerji grafiklerinin görüntülenmesi için etkileşimli web tabanlı uygulamaların avantajlarından faydalanmaktadır. Bir proteinin kalite skoru tüm bilinen protein yapıları bağlamında gösterilmekte ve bir yapının sorunlu kısımları 3B molekül görüntüleyicide gösterilmekte ve vurgulanmaktadır. ProSa, özellikle X-ışını analizi, NMR spektroskopisi ve teorik hesaplamalardan elde edilen protein yapılarının validasyonunda ortaya çıkan ihtiyaçları karşılamaktadır [128]. Programa girilen yapının, z-skoru ve rezidü enerji grafiği olmak üzere iki sonuç elde

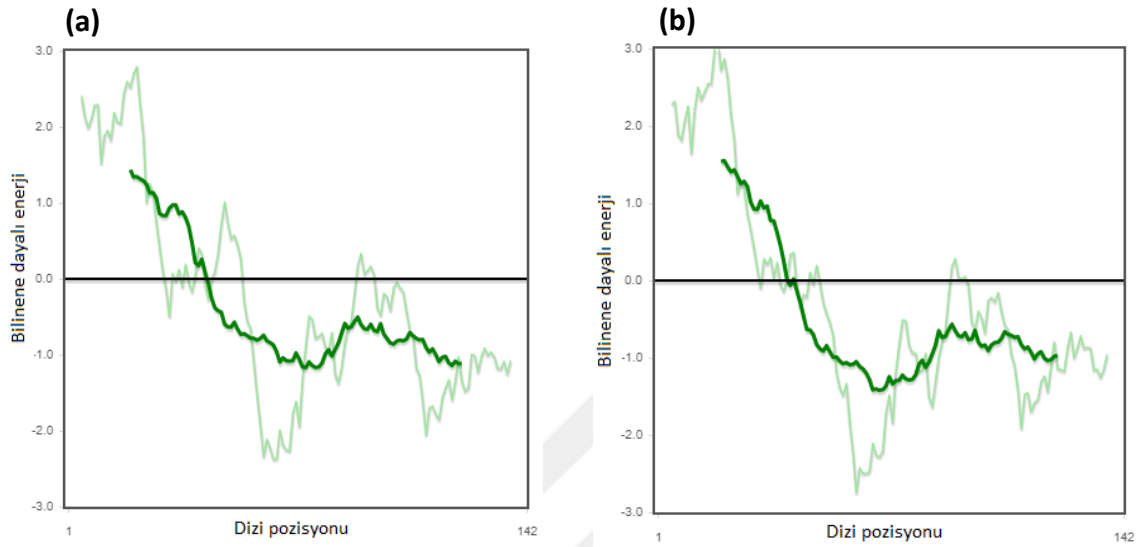
edilir. Z-skoru, modelin genel kalite skoru olup, yapısı çözümlenmiş proteinlerin konformasyonlardan türetilen bir enerji dağılımına göre yapının toplam enerji sapmasını ölçer. Protein z-skorunun yorumlanmasını kolaylaştırmak için, spesifik değeri, deneysel olarak yapısı belirlenmiş tüm proteinlerin z-skorlarını içeren bir grafik üzerinde gösterilmektedir. NMR ve X-ışını ile çözümlenen yapı grupları grafik üzerinde farklı renkler ile belirtilmiştir. Söz konusu proteinin z-skoru, bu gruplardan birine ait benzer boyuttaki proteinleri için tanımlanan z-skoru aralığında olup olmadığı kontrol edilir [128]. Enerji minimizasyon sonrası yabanıl tip ve mutant *Ta*PIN1 modellerin z-skoru sırasıyla -3.19 ve -3.3 olup, her iki tip modelin NMR ile yapısı çözülmüş protein grubu arasında yer aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.19a ve 3.19b). Z-skoru, proteinlerin deneysel olarak yapısı çözümlenmiş proteinlerin skorları arasında bulunması, modellerin doğru kabul edilmesini sağlamaktadır.



Şekil 3.19 Enerji minimizasyon sonrası yabanıl tip (a) ve mutant (b) *Ta*PIN1 modellerin z-skor sonucu.

Enerji grafiği, amino asit dizi pozisyonun fonksiyonu olarak verilen enerjilerine göre yerel model kalitesini değerlendirir. Tek rezidü enerji grafiği genellikle büyük dalgalanmalar içerir ve model değerlendirilmesi için sınırlı bir değerdir. Bu yüzden 40 rezidü için ortalama enerji hesaplanarak grafiğe uygulanır. Pozitif değerler modelin sorunlu veya hatalı kısımlarına karşılık gelmektedir [128]. Buna göre, enerji grafiği incelendiğinde, negatif bölgedeki rezidülerin çokluğu, model protein

konformasyonunun doğru bir şekilde belirlendiğini ifade etmektedir. Yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* modellerin enerji grafikleri sırasıyla Şekil 3.20a ve 3.20b'de yer almaktadır.

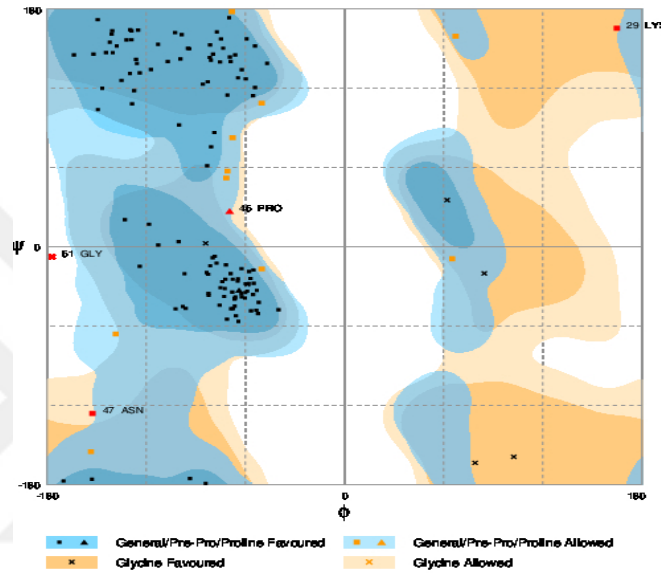


Şekil 3.20 Enerji minimizasyonu sonrası yabanıl tip (a) ve mutant (b) *TaPIN1* modellerin enerji düzeyi grafiği.

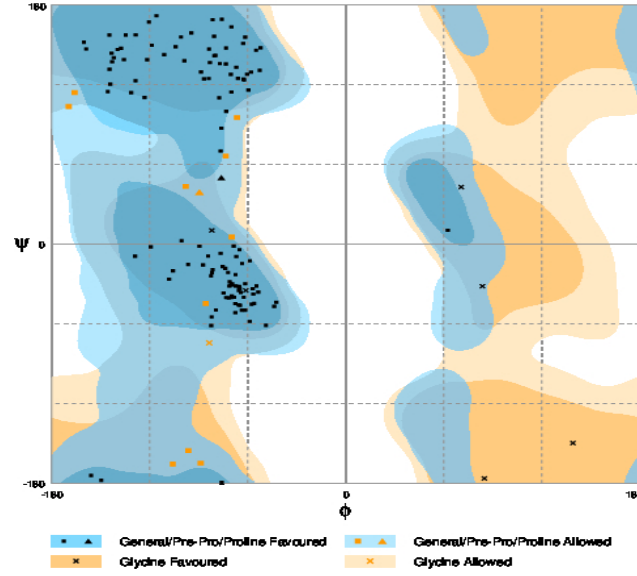
ProQ validasyon programı, oluşturulan modelin birçok yapısal özelliklerinden yararlanarak modelin kalitesini değerlendirmektedir. Program, atom-atom ve rezidü-rezidü bağ sıklığı, çözücü erişilebilirliği, kalıp protein ve oluşturulan modelin ikincil yapıları arasındaki benzerliği ve modelin genel şeklini içeren protein yapı özelliklerini kullanarak, modelin LGscore değeri belirlenir. Modellerin LGscore değeri 1.5'in üstünde ise doğru, 2.5'in üstünde ise çok iyi ve 4'ün üstünde ise son derece iyi model olarak değerlendirilmektedir [129]. Çok iyi model olarak kabul edilen, yabanıl tip *TaPIN1* modelin LGscore değeri 2.759 ve doğru model olarak kabul edilen minimizasyon sonrası mutant *TaPIN1* modelin LGscore değeri 2.261 olarak belirlenmiştir.

Son olarak modellerin validasyonu için kullanılan RAMPAGE programı [130], protein yapısındaki amino asit rezidülerin phi (ϕ) ve psi (ψ) adı verilen dihedral açıların grafiğini sunan Ramachandran diyagramını [146] oluşturmaktadır. Diyagramda ϕ değerleri x-ekseninde, ψ değerleri y-ekseninde yer almaktadır. Modellerin iyi kalitede olduğu yorumlanabilmesi için Ramachandran diyagramında asıl bölgedeki rezidü yüzdesi %90 ve üzeri olması beklenmektedir [147]. Enerji minimizasyonu sonrası yabanıl tip *TaPIN1*

modelinin Şekil 3.21’de yer alan Ramachandran diyagramındaki asıl bölge, kabul edilebilir bölge ve dış bölgedeki rezidü yüzdeleri sırasıyla %90, %7,1, %2.9’dur. Enerji minimizasyon sonrası mutant *TaPIN1* modelinin Şekil 3.22’de yer alan Ramachandran diyagramındaki asıl bölge, kabul edilebilir bölge ve dış bölgedeki rezidü yüzdeleri sırasıyla %91.4, %8.6 ve %0’dır. Her iki tip *TaPIN1* homoloji modellerin asıl bölgedeki rezidü yüzdeleri dikkate alındığında modellerin iyi kalitede olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 3.21 Enerji minimizasyon sonrası yabancı tip *TaPIN1* modelinin Ramachandran diyagramı. Asıl bölgeler mavi, kabul edilebilir bölgeler turuncu ve dış bölgeler beyaz ile ifade edilmiştir.



Şekil 3.22 Enerji minimizasyon sonrası mutant *TaPIN1* modelinin Ramachandran diyagramı. Asıl bölgeler mavi, kabul edilebilir bölgeler turuncu ve dış bölgeler beyaz ile ifade edilmiştir.

3.1.7 Potansiyel İnhibitörlerin Belirlenmesi İçin Moleküler Kenetlenme Temelli Sanal Tarama

Schrödinger tarafından sunulan Small - Molecule Drug Discovery yazılımı kullanılarak Maestro 2017.1 arayüz programı üzerinde GLIDE ile moleküler kenetlenme gerçekleştirilmiştir. 2979 naftakinon türevlerinden oluşan sanal kütüphane, başlangıçta mutant *TaPIN1*'in aktif bölgesi ile sırasıyla GLIDE HTVS, SP ve XP metodolojisine göre kenetlenmiştir [101], [105]. 2979 kenetlenmiş bileşiklerin HTVS ile en iyi % 30'u, ardından SP skarlama fonksiyonuna göre en iyi % 20'si ve son olarak XP skarlama fonksiyonu uygulanarak en iyi % 10'u seçilerek ligandların sayısı 33'e indirgenmiştir. Kenetlenmiş 33 bileşik, en güvenilir skarlama fonksiyonu olan XP GlideScore'a göre sıralanarak ligand sayısı 10'a indirgenmiştir (Çizelge 3.1). Ardından belirlenen 10 ligand yabancı tip *TaPIN1*'in aktif bölgesi ile kenetlenerek XP GlideScore'a göre sıralanmıştır (Çizelge 3.2). Mutant ve yabancı tip *TaPIN1* enzimleri ile kenetlenmiş bileşiklerin serbest bağlanma enerjileri MM/GBSA metodolojisi ile hesaplanmıştır ve sırasıyla Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de yer almaktadır. Buparvaquone ile kenetlenmiş yabancı tip ve mutant *TaPIN1* sonucunda elde edilen XP GScore değerleri ve MM/GBSA metodolojisi ile belirlenmiş serbest bağlanma enerjileri, öncü ligandlar ile elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.1 ve 3.2).

5304752 (4-hydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl] oxynaphthalene-1,2-dione) ve 9993782 (6-acetyl-1,4,5,7,8-pentahydroxynaphthalene-2,3-dione) bileşikler, XP GScore sıralamasına göre her iki tip enzime karşı en yüksek değeri göstermiştir ve ileri moleküler dinamik simülasyon çalışmalarında kullanılmıştır. 5304752 ligand, yabancı tip (Şekil 3.23) ve mutant *TaPIN1* (Şekil 3.24) enzimlerine karşı sırasıyla -8.176 kcal/mol ve -7.789 kcal/mol XP GScore değeri gösterirken, MM/GBSA metodolojisine göre serbest bağlanma enerjisi sırasıyla -42.328 kcal/mol ve -39.319 kcal/mol'dur. 9993782 (6-acetyl-1,4,5,7,8-pentahydroxynaphthalene-2,3-dione) ligandı ise yabancı tip (Şekil 3.25) ve mutant (Şekil 3.26) *TaPIN1* enzimlerine karşı sırasıyla -7.162 and -7.680 kcal/mol XP GScore bağlanma afinitesi göstermesine karşın, MM/GBSA metodolojisi ile hesaplanan serbest bağlanma enerjisi yabancı tip *TaPIN1* için 3.918 kcal/mol iken mutant enzim için -20.159 kcal/mol'dur.

Buparvaquone ile yabancı tip (Şekil 3.27) ve mutant (Şekil 3.28) *TaPIN1* enzim yapıların kenetlenmesi sonucunda elde edilen buparvaquone XP GScore değerleri sırasıyla -3.748 ve -3.296 kcal/mol ve MM/GBSA metodolojisi ile belirlenmiş serbest bağlanma enerjileri sırasıyla -30.285 ve -35.192 kcal/mol'dur.

5304752, 9993782 ligandları ve buparvaquone ilacının yabancı tip ve mutant *TaPIN1* enzimleri ile kenetlenmesi sonucu meydana gelen etkileşimler (sırasıyla Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4) dikkate alınarak Bölüm 2.2.8'de yer alan formüllere dayanarak belirlenen XP Gscore ve ΔG değerleri kıyaslandığında, 5304752 ligandı buparvaquone göre, hem mutant (Çizelge 3.1) hem yabancı tip *TaPIN1* (Çizelge 3.2) enzimlerine karşı daha yüksek XP Gscore ve ΔG (serbest bağlanma enerjisi) değeri buna bağlı olarak her iki tip enzime karşı daha yüksek bağlanma afinitesi sergilemektedir. 9993782 ligandı buparvaquone göre mutant *TaPIN1*'e karşı (Çizelge 3.1) daha yüksek XP Gscore değeri gösterirken, ΔG değeri daha düşüktür. Aynı şekilde, 9993782 ligandı buparvaquone göre yabancı tip *TaPIN1*'e karşı (Çizelge 3.2) daha yüksek XP Gscore değeri gösterirken, ΔG değeri oldukça düşüktür. Fakat XP Gscore değerleri göze alındığında, 9993782 ligandı buparvaquone göre her iki tip enzime karşı daha yüksek bağlanma afinitesi sergilemektedir.

Çizelge 3.1 Mutant *Ta*PIN1'in öngörülen yapısı ile kenetlenmiş 10 tane bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG).

PubChem ID	Bileşik adı	XP GScore (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
5304752	4-hydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]oxynaphthalene-1,2-dione	-7.789	-39.319
9993782	6-acetyl-1,4,5,7,8-pentahydroxynaphthalene-2,3-dione	-7.680	-20.159
23247376	3-butanoyl-4,5,7-trihydroxynaphthalene-1,2-dione	-7.501	-20.465
15531414	6-ethyl-4,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	-7.453	-1.899
619522	6-ethyl-1,4,5,7-tetrahydroxynaphthalene-2,3-dione	-7.223	-17.648
5364026	3,6-diacetyl-4,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	-7.139	-15.740
12442938	7-acetyl-1,5,6,8-tetrahydroxynaphthalene-2,3-dione	-6.931	-11.941
102237415	2-(2-acetyl-3-hydroxycyclohex-2-en-1-yl)-8-hydroxynaphthalene-1,4-dione	-6.648	-37.525
12009390	4,5,6,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	-6.574	-8.724
12313086	4,5,6,7,8-pentahydroxy-3-methoxynaphthalene-1,2-dione	--6.572	-23.048
71768	Buparvaquone	-3.296	-35.192

Çizelge 3.2 Yabanıl tip TaPIN1'in öngörülen yapısı ile kenetlenmiş 10 tane bileşiğin GLIDE XP Score sıralaması ve serbest bağlanma enerjileri (ΔG).

PubChem ID	Bileşik adı	XP-GScore (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
5304752	4-hydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxynaphthalene-1,2-dione	-8.176	-42.328
9993782	6-acetyl-1,4,5,7,8-pentahydroxynaphthalene-2,3-dione	-7.162	3.918
12009390	4,5,6,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	-6.967	-23.137
5364026	3,6-diacetyl-4,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	-6.758	-7.047
619522	6-ethyl-1,4,5,7-tetrahydroxynaphthalene-2,3-dione	-6.628	-7.860
12313086	4,5,6,7,8-pentahydroxy-3-methoxynaphthalene-1,2-dione	-6.601	-26.971
15531414	6-ethyl-4,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	-5.906	-6.110
102237415	2-(2-acetyl-3-hydroxycyclohex-2-en-1-yl)-8-hydroxynaphthalene-1,4-dione	-5.104	-34.238
12442938	7-acetyl-1,5,6,8-tetrahydroxynaphthalene-2,3-dione	-5.091	-7.551
23247376	3-butanoyl-4,5,7-trihydroxynaphthalene-1,2-dione	-4.831	-34.740
71768	Buparvaquone	-3.748	-30.285

Çizelge 3.3 5304752, 9993782 ligandların ve buparvaquone ilacının yabancı tip (wTaPIN1) enzimi ile kenetlenmesi sonucu etkileşim gösterdiği rezidüleri.

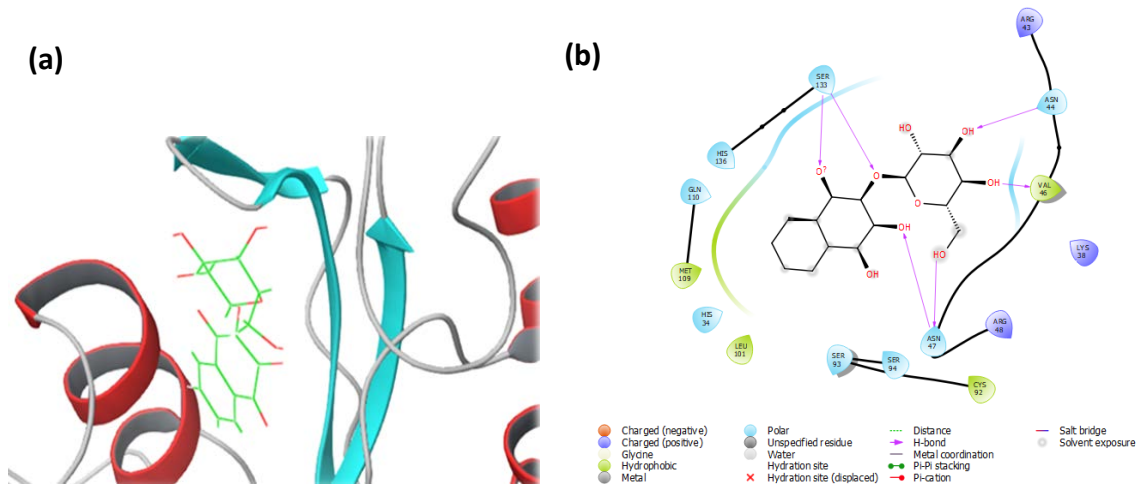
*TaPIN1 katalitik rezidüleri	5304752 –wTaPIN1 etkileşim rezidüleri	9993782- wTaPIN1 etkileşim rezidüleri	Buparvaquone-yabancı tip TaPIN1 etkileşim rezidüleri
His34	His34 (polar etkileşim)	His34 (polar etkileşim)	His34 (polar etkileşim)
Cys92	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	Cys92 (hidrofobik etkileşim)
His136	His136 (polar etkileşim)	His136 (polar etkileşim)	His136 (polar etkileşim)
Lys38	Lys38 (elektrostatik etkileşim)	Lys38 (elektrostatik etkileşim)	Lys38 (elektrostatik etkileşim)
Arg43	Arg43 (elektrostatik etkileşim)	-	Arg43 (elektrostatik etkileşim)
	Asn47 (iki hidrojen bağ)	Asn47 (hidrojen bağ)	Asn47 (hidrojen bağ)
	Asn44 (hidrojen bağ)	-	Asn44 (polar etkileşim)
	Val46 (hidrojen bağ)	-	Val46 (hidrofobik etkileşim)
	Ser133 (iki hidrojen bağ)	Ser133 (hidrojen bağ)	Ser133 (iki hidrojen bağ)
	Gln110 (polar etkileşim)	Gln110 (hidrojen bağ)	Gln110 (polar etkileşim)
	Ser93 (polar etkileşim)	Ser93 (hidrojen bağ)	Ser93 (polar etkileşim)
	Ser94 (polar etkileşim)	Ser94 (polar etkileşim)	Ser94 (polar etkileşim)
	Met109 (hidrofobik etkileşim)	Met109 (hidrofobik etkileşim)	Met109 (hidrofobik etkileşim)
	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	-
	Arg48 (elektrostatik etkileşim)	-	-
	-	Leu36 (hidrofobik etkileşim)	Leu36 (hidrofobik etkileşim)

*TaPIN1 katalitik rezidüleri, insan PIN1'deki katalitik rezidüleri [55], [57], [58] referans alınarak belirlenmiştir.

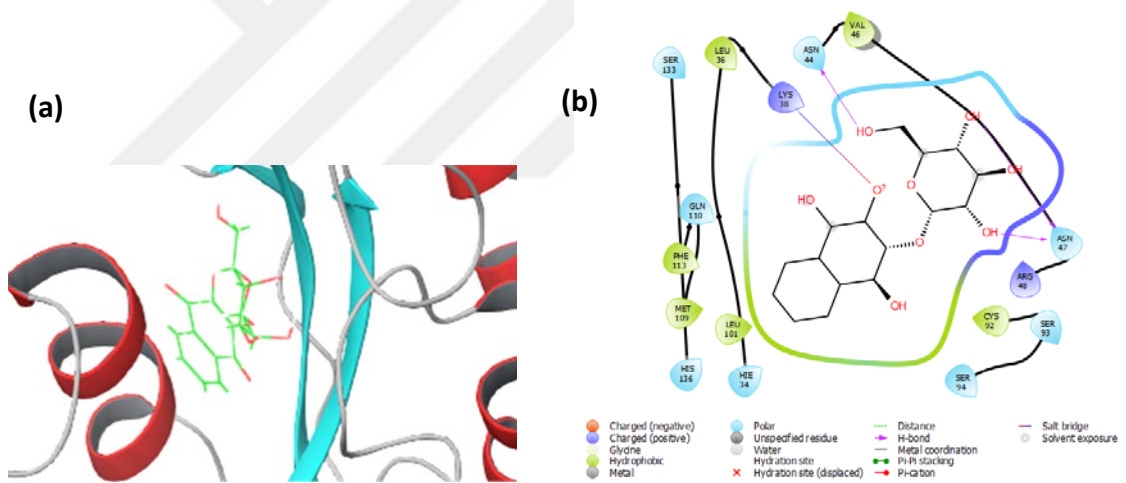
Çizelge 3.4 5304752, 9993782 ligandların ve buparvaquone ilacının mutant (*mTaPIN1*) enzimi ile kenetlenmesi sonucu etkileşim gösterdiği rezidüleri.

*TaPIN1 katalitik rezidüleri	5304752 –mTaPIN1 etkileşim rezidüleri	9993782-mTaPIN1 etkileşim rezidüleri	Buparvaquone-mTaPIN1 etkileşim rezidüleri
His34	His34 (polar etkileşim)	His34 (polar etkileşim)	His34 (polar etkileşim)
Cys92	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	Cys92 (hidrofobik etkileşim)
His136	His136 (polar etkileşim)	His136 (polar etkileşim)	His136 (polar etkileşim)
Lys38	Lys38 (elektrostatik etkileşim)	Lys38 (tuz köprüsü)	Lys38 (elektrostatik etkileşim)
Arg43	Arg43 (elektrostatik etkileşim)	-	-
	Asn47 (iki hidrojen bağ)	Asn47 (hidrojen bağ)	Asn47 (polar etkileşim)
	Asn44 (hidrojen bağ)	-	Asn44 (polar etkileşim)
	Val46 (hidrojen bağ)	-	-
	Ser133 (iki hidrojen bağ)	Ser133 (hidrojen bağ)	Ser133 (polar etkileşim)
	Gln110 (polar etkileşim)	Gln110 (polar etkileşim)	Gln110 (polar etkileşim)
	Ser93 (polar etkileşim)	Ser93 (hidrojen bağ etkileşim)	Ser93 (polar etkileşim)
	Ser94 (polar etkileşim)	-	Ser94 (polar etkileşim)
	Met109 (hidrofobik etkileşim)	Met109 (hidrofobik etkileşim)	Met109 (hidrofobik etkileşim)
	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	Leu101 (hidrofobik etkileşim)
	Arg48 (elektrostatik etkileşim)	Arg48 (elektrostatik etkileşim)	-
	-	Thr131 (polar etkileşim)	-
	-	Leu36 (hidrofobik etkileşim)	Leu36 (hidrofobik etkileşim)
	-	Phe113 (hidrofobik etkileşim)	Phe113 (hidrofobik etkileşim)
	-	-	Lys97 (elektrostatik etkileşim)

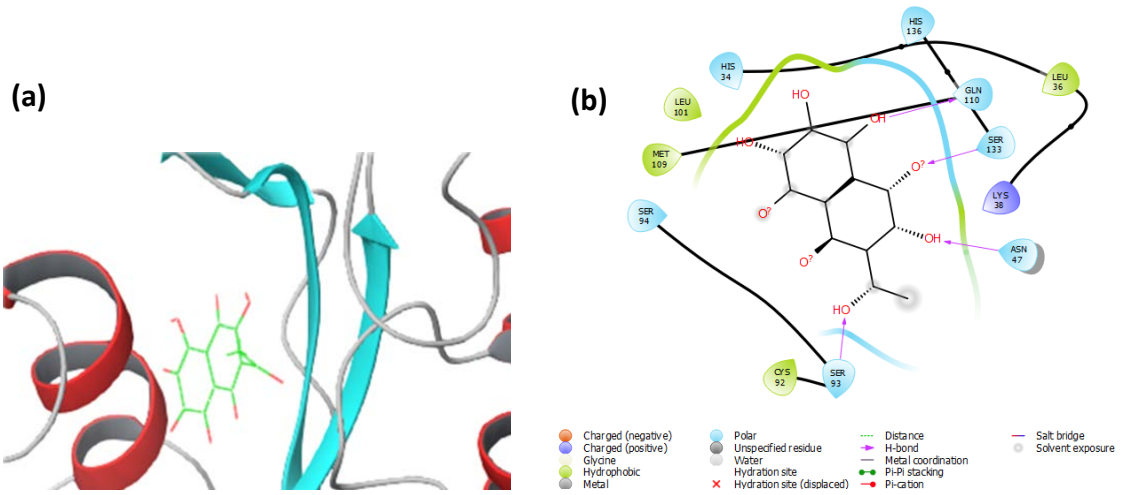
*TaPIN1 katalitik rezidüleri, insan PIN1'deki katalitik rezidüleri [55], [57], [58] referans alınarak belirlenmiştir.



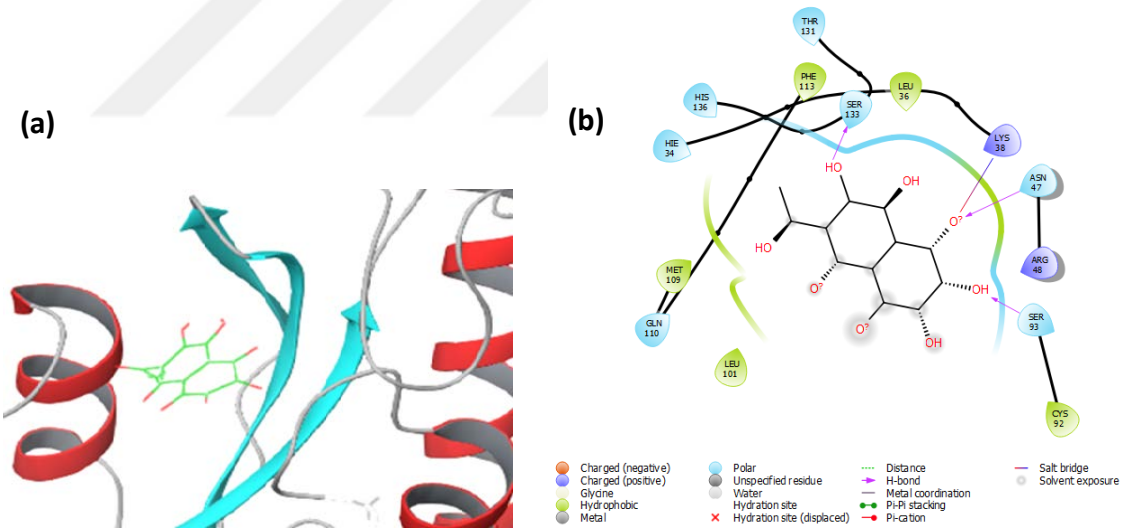
Şekil 3.23 Yabancıl tip *TaPIN1*'in öngörülen yapısı ile 5304752 PucbChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.



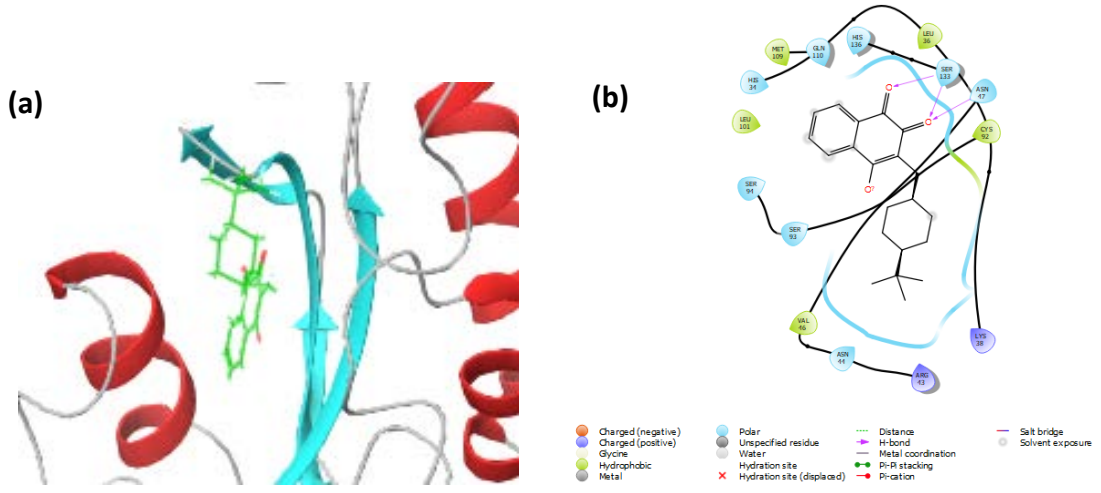
Şekil 3.24 Mutant *TaPIN1*'in öngörülen yapısı ile 5304752 PucbChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.



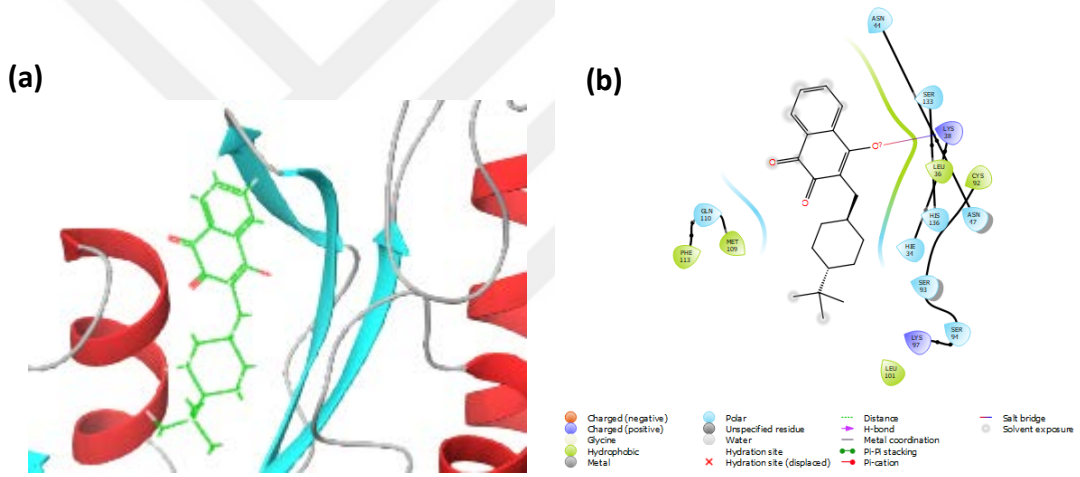
Şekil 3.25 Yabanıl tip *TaPIN1*'in öngörülen yapısı ile 9993782 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.



Şekil 3.26 Mutant *TaPIN1*'in öngörülen yapısı ile 9993782 PubChem erişim numarasına sahip bileşiğin kenetlenmiş kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.



Şekil 3.27 Yabanıl tip *TaPIN1*'in öngörülen yapısı ile buparvaquone ilacının kenetlenmiş kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.

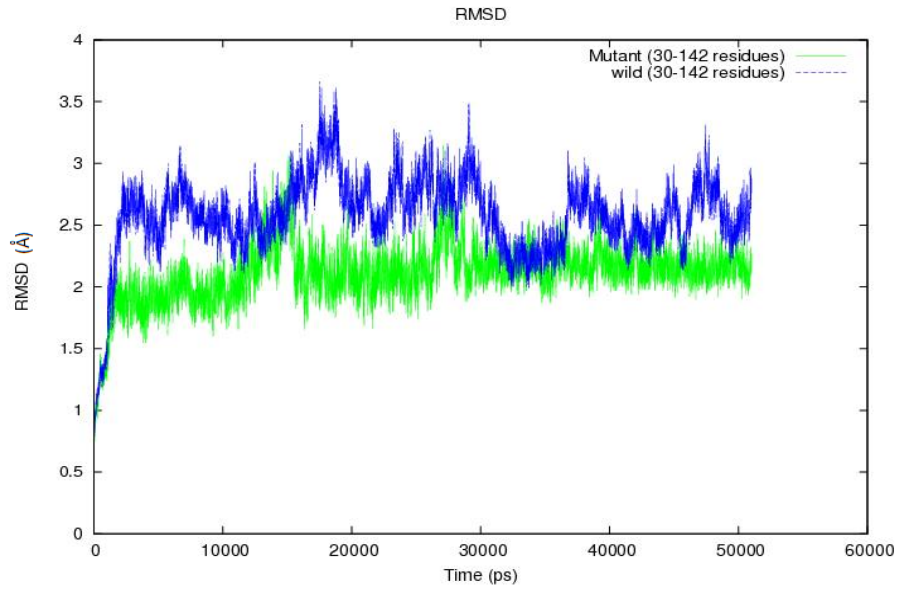


Şekil 3.28 Mutant *TaPIN1*'in öngörülen yapısı ile buparvaquone ilacının kenetlenmiş kompleksi. (a) Yapısal görünüm; (b) Ligand etkileşim diagramı.

3.1.8 Seçilen Öncü Ligandlar ile Moleküler Dinamik Simülasyon Çalışmaları

MD simülasyon çalışmaları, ligand tarafından indüklenen protein konformasyon değişiklikleri ve ligand-reseptör kompleks yapı stabilitesi değerlendirilmiştir. Ligand bağlı ve ligand bağlı olmadan yabanıl ve mutant *TaPIN1* modelleri için sırasıyla 100 nanosaniye (ns) ve 50 ns MD simülasyonları sonucunda elde edilen root mean square deviation (RMSD) ve root mean square fluctuation (RMSF) değerleri ile protein-ligand sistemlerin stabilitesi ve pozisyonları arasındaki sapma incelenmiştir. RMSD, protein-

ligand atomları arasındaki mesafeyi ifade etmektedir ve sistemlerin simülasyon sırasında ne zaman dengeye ulaştığı hakkında bilgi vermektedir [148]. Ligand bağlı olmadan yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* enzimlerin RMSD grafiği Şekil 3.29'da yer almaktadır. Her iki tip enzimdeki 1-30 arası rezidüer ikincil bir yapı oluşturmamaktadır ve RMSD değerini gereksiz yere yükselttiği için göz ardı edilmiştir. Yabanıl tip ve mutant *TaPIN1*'in ortalama RMSD değerleri sırasıyla 2,107 ve 2,572 Å'dur. Yabanıl tip proteinin RMSD grafiği incelendiğinde, düz bir plato gözlenmemektedir. Mutant *TaPIN1* RMSD grafiğinde ise önemli sapmalar gözlenmemiştir.

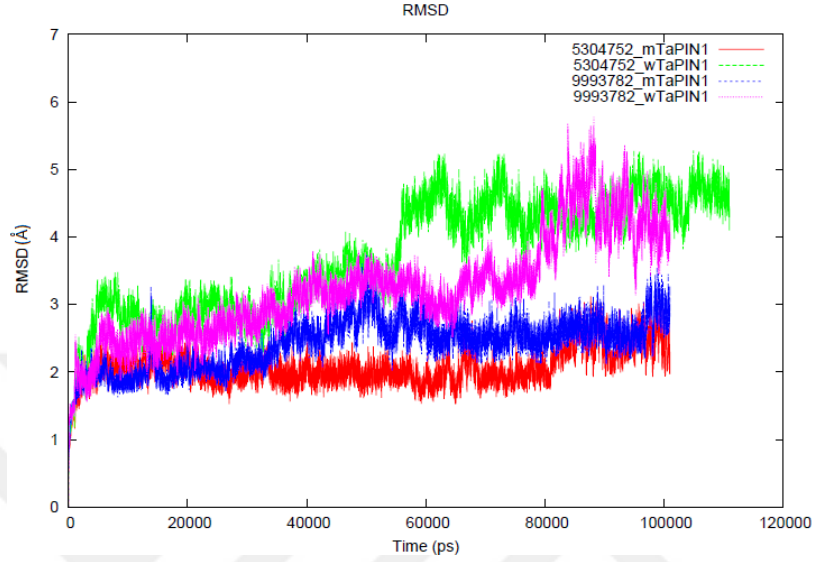


Şekil 3.29 Ligand bağlı olmadan yabanıl tip ve mutant *TaPIN1* modellerin 50 ns MD simülasyonu sonucu elde edilen RMSD grafiği.

XP GlideScore sıralamasına göre bağlanma afinitesi en yüksek olan iki kenetlenmiş bileşik (5304752 ve 9993782 PubChem ID'li ligandlar) ileri MD simülasyon çalışmaları için seçilmiştir. Her iki tip *TaPIN1*'in öngörülen yapıları ile kenetlenmiş bileşiklerin 100 ns boyunca MD simülasyonu sonucu elde edilen RMSD grafiği Şekil 3.30'da yer almaktadır.

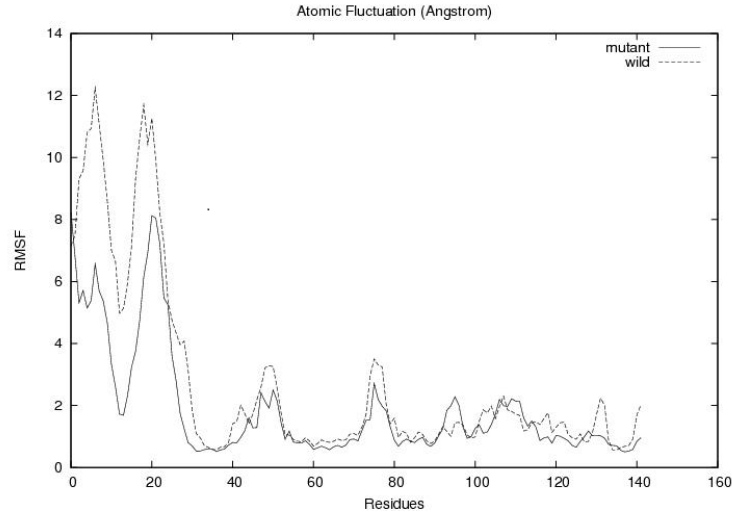
5304752-yabanıl tip *TaPIN1* kenetlenmiş yapı 57 ns'ye kadar kademeli artış göstermektedir. 57-100 ns arasında sistem ortalama 3.706 Å RMSD değeri ile dengeye ulaşmıştır. 9993782 – yabanıl tip *TaPIN1* kenetlenmiş yapı 80 ns boyunca RMSD değeri 3 Å sularında iken aniden 80-95 ns periyodunda artış göstermiştir ve ortalama 3.219 Å RMSD değeri sunmuştur. 5304752 ile mutant *TaPIN1* kenetlenmiş yapısı ortalama

2.070 Å RMSD değerine sahiptir ve 100 ns MD simülasyonu boyunca RMSD grafiğinde önemli bir sapma göstermemektedir. Ligand 9993782 ile mutant *TaPIN1* kenetlenmiş kompleks yapı 55 ns’de dengeye ulaşıncaya kadar kademeli artış göstermiştir ve 55-100 ns arasında ortalama 2,416 Å RMSD değerine sahiptir.

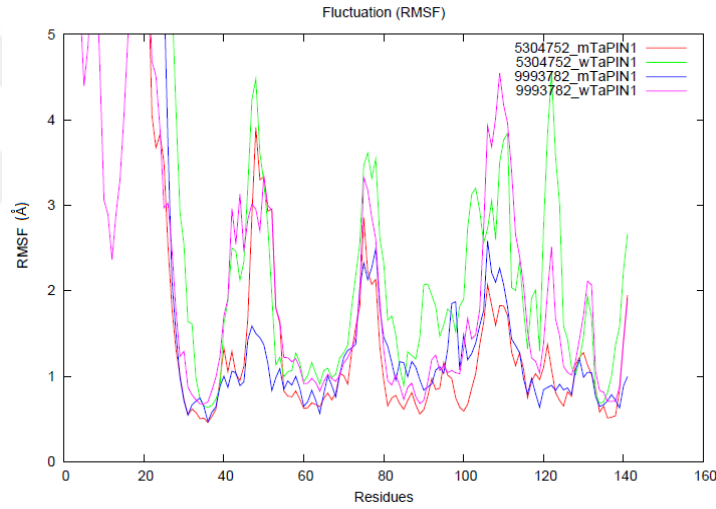


Şekil 3.30 Yabanıl tip ve mutant *TaPIN1*’in öngörülen yapıları ile kenetlenmiş öncü bileşiklerin 100 ns boyunca MD simülasyonu sonucu elde edilen RMSD grafiği

Protein stabilitesi hakkında bilgi veren, ligand bağlı olmadan ve ligand bağlı her iki tip enzimin tüm rezidüleri için RMSF grafiği sırasıyla Şekil 3.31 ve 3.32’de yer almaktadır. 1 ve 30 rezidüler arasındaki salınımlar, belirtilen bölgede ikincil yapı olmamasından kaynaklanmaktadır. RMSF grafikleri karşılaştırıldığında, her iki öncü ligand bağlı yabanıl tip *TaPIN1* enzimin 100-125 rezidüleri arasında önemli salınımlar gözlenmiştir. 5304752 ligand bağlı mutant *TaPIN1* enzimin 45-55 rezidüleri arasında salınımlar gösterirken, 9993782 ligand varlığında MD simülasyonu boyunca önemli salınımlar gözlenmemiştir.



Şekil 3.31 Ligand bağlı olmadan yabancı tip ve mutant *TaPIN1* proteinlerin 50 ns MD simülasyonu sonucu elde edilen tüm rezidülerine ait RMSF değerleri.



Şekil 3.32 Öncü ligandların varlığında yabancı tip ve mutant *TaPIN1* proteinlerin 100 ns MD simülasyonu sonucu elde edilen tüm rezidülerine ait RMSF değerleri.

5304752-yabancı tip *TaPIN1* kenetlenmiş kompleks yapının 100 ns MD simülasyon öncesi ligand başlangıç pozisyonunda, Asn47, Asn44, Val46 ve Ser133 yabancı tip *TaPIN1* protein rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturmıştır. Ayrıca polar etkileşimler His136, Gln110, His34, Ser93 ve Ser94 rezidüleri ve hidrofobik etkileşimler Met109, Leu101 ve Cys92 protein rezidüleri ile ligand arasında gözlenmiştir. Pozitif yüklü Lys38, Arg43 ve Arg48 rezidüleri elektrostatik etkileşimlerin oluşmasını sağlamıştır (Şekil 3.23b). Yabancı tip *TaPIN1* ile 100 ns boyunca simülasyonu sonucunda ise, 5304752 ligand ilk pozisyonundan farklı olarak Gln110 ve Leu101 rezidüleri ile hidrojen bağı

oluşturmuştur. Polar etkileşimler Ser94, His34, His136 ve Thr108 rezidüleri ile meydana gelmiştir. Leu36, Met109 ve Phe113 yabancı tip protein rezidüleri simülasyon sonrası ligand ile hidrofobik etkileşimlere katkı sağlamıştır. Elektrostatik etkileşim sadece Lys97 rezidüsü aracılığı ile gerçekleşmiştir (Şekil 3.33b). Çizelge 3.5 incelendiğinde, simülasyon öncesi 5304752 ligandın başlangıç pozisyonunda, hPIN1'deki katalitik rezidüler [55], [57], [58] referans alınarak belirlenmiş tüm *Ta*PIN1 katalitik rezidüleri (His34, Cys92, His136, Lys38 ve Arg43) ile etkileşimde olduğu, simülasyon sonrası son pozisyonunda ise sadece His34 ve His136 katalitik rezidüler ile etkileşimini koruduğu gözlenmiştir. Pymol [149] programı kullanılarak 5304752-yabancı tip *Ta*PIN1 kenetlenmiş kompleks yapının MD simülasyon öncesi ve sonrası görüntüleri süperimpoze edilerek, ligandın protein üzerinde bulunduğu bölge ya da pozisyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir ve protein bağlanma bölgesinden tamamen çıkmadığı ama pozisyon değiştirdiği gözlenmiştir (Şekil 3.33a). Elde edilen sonuçlar ile birlikte 5304752-yabancı tip *Ta*PIN1 RMSD grafiği (Şekil 3.30) incelendiğinde, ligandın 100 ns simülasyon boyunca farklı rezidüler ile etkileşime girerek protein aktif bölgesinde gezindiği söylenebilmektedir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, 5304752 ligandı, simülasyon öncesi ve sonrasında aktif bağlanma bölgesinde bulunması ve katalitik rezidüler ile etkileşiminin gözlenmesi sonucunda yabancı tip *Ta*PIN1'e karşı potansiyel inhibitör olabileceği öngörülmüştür.

5304752 ligand bağlı mutant *Ta*PIN1 enzimin MD simülasyon öncesinde ligand başlangıç pozisyonunda Asn44 ve Asn47 protein rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Ayrıca, elektrostatik etkileşim pozitif yüklü Arg48 rezidüsü ile, polar etkileşimler Gln110, His34, His136, Ser94, Ser93, Ser133 ve hidrofobik etkileşimler Phe113, Met109, Leu101, Val46, Leu36 ve Cys92 protein rezidüleri ile ligand arasında meydana gelmiştir. Tuz köprüsü sadece Lys38 rezidüsü ile gerçekleşmiştir (Şekil 3.24b). 100 ns MD simülasyon sonrasında, ligand mutant *Ta*PIN1'in Ser133, Lys38, Glu91 ve Ser93 rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Hidrofobik etkileşimler Leu101, Phe113, Leu36, Cys92 and Val46 rezidüleri ve polar etkileşimler His136, Thr131, Asn44, Asn47 ve His34 rezidüleri aracılığıyla gerçekleşmiştir (Şekil 3.34b). Çizelge 3.6 incelendiğinde, 5304752 ligand, hem MD simülasyon öncesi hem de sonrasında Arg43 hariç His34, Cys92, His136 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile etkileşim göstermiştir.

5304752-mutant *Ta*PIN1 kenetlenmiş kompleks yapının RMSD grafiği (Şekil 3.30) de dikkate alındığında ligandın simülasyon boyunca kararlı yapısını sürdürdüğü ve simülasyon öncesi ve sonrası görüntülerin süperimpozisyonu ligandın aktif bölgeden çıkmadığını (Şekil 3.34a) göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, 5304752 ligandı, mutant *Ta*PIN1 substratı için antagonist görevi alarak potansiyel inhibitör olarak değerlendirilebileceği öngörülmüştür.

9993782 – yabanıl tip *Ta*PIN1 kenetlenmiş kompleks yapının MD simülasyon öncesi ligand başlangıç pozisyonunda, Ser93, Asn47, Ser133 ve Gln110 protein rezidüleri ile hidrojen bağı oluşturmuşken, Leu101, Met109, Leu36 ve Cys92 rezidüler ile hidrofobik etkileşimler göstermiştir. Ayrıca, polar etkileşimler His136 ve Ser94, elektrostatik etkileşim ise sadece pozitif yüklü Lys38 rezidüsü ile ligand arasında meydana gelmiştir (Şekil 3.25b). 9993782 – yabanıl tip *Ta*PIN1 kenetlenmiş kompleks yapının 100 ns MD simülasyonu sonucunda ligand ile iki hidrojen bağı Lys97 ve üç hidrojen bağı Arg96 rezidüleri aracılığıyla oluşmuştur. Polar etkileşimler ligand ile Ser93 ve Ser94 protein rezidüleri arasında meydana gelmiştir fakat hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler gözlenmemiştir (Şekil 3.35b). Çizelge 3.7 irdelendiğinde, simülasyon öncesinde ligand, Arg43 hariç, yabanıl tip *Ta*PIN1 enzimin sadece His34, Cys92, His136 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile etkileşim gösterirken, 100 ns simülasyon sonrasında belirlenmiş katalitik rezidüler ile herhangi bir etkileşim göstermemiştir. Ayrıca, simülasyon öncesi ve sonrası görüntülerin süperimpozisyonu sonucunda ligandın ilk pozisyonundan tamamen farklı olarak aktif bölge dışında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.35a). Ligand etkileşim rezidüleri ve süperimpozisyon sonucu göze alındığında 9993782 – yabanıl tip *Ta*PIN1 kenetlenmiş kompleks yapının simülasyon sonrası RMSD grafiğinde (Şekil 3.30) gözlenen salınımlar ligandın simülasyon boyunca protein etrafında gezindiğini ifade etmektedir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, özellikle simülasyon sonucunda 9993782 ligandın katalitik rezidüler ile etkileşim göstermemesi ve aktif cep bölgenin dışında bulunması, yabanıl tip *Ta*PIN1 enzim için 9993782 bileşiğinin potansiyel inhibitör olabileceği söylenememektedir.

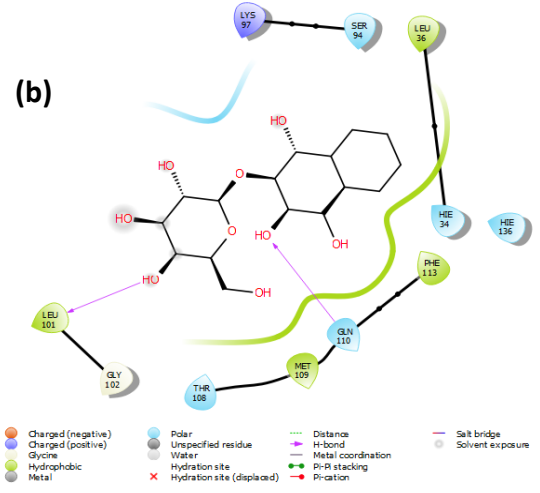
Ligand 9993782 ile mutant *Ta*PIN1 enzimin kenetlenmiş yapısının 100 ns MD simülasyonu öncesi başlangıç pozisyonunda ligand ile Ser133, Asn47 ve Ser93 mutant protein rezidüleri arasında hidrojen bağı oluşmuştur. Gln110, His34, His136 ve Thr131

rezidüler polar etkileşimlerin oluşmasında yer almıştır. Hidrofobik etkileşimler ise Leu101, Met109, Phe113, Leu36 ve Cys92 mutant protein rezidüleri ile ligand arasında meydana gelmiştir. Ligand ile Lys38 arasında tuz köprüsü, Arg48 rezidüsü ile elektrostatik etkileşim meydana gelmiştir (Şekil 3.26b). Ligand 9993782 bağlı mutant *TaPIN1* kompleks yapının simülasyonu sonrasında ise ligand ile Arg48 arasında üç hidrojen bağı, Ser93 arasında iki hidrojen bağı ve Lys38 arasında bir hidrojen bağı meydana gelmiştir. Polar ve hidrofobik etkileşimler sırasıyla Asn44, Asn47 ve Val46, Cys92 rezidüleri ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.36b). Çizelge 3.8’de ligand etkileşimleri incelendiğinde 9993782 ligandı başlangıç pozisyonunda His34, Cys92, His136 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile, simülasyon sonrasında ise sadece Cys92 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile etkileşim göstermiştir. MD simülasyon öncesi ve sonrası görüntülerin süperimpozisyonu incelendiğinde, ligandın başlangıç pozisyonunu değiştirdiği fakat aktif bölgeye yakın bir yerde konumlandığı gözlenmiştir (Şekil 3.36a). 9993782-mutant *TaPIN1* kompleks yapının simülasyon sonrası RMSD grafik (Şekil 3.30) sonuçları irdelendiğinde önemli sapmalar gözlenmemiştir ve simülasyon boyunca aktif bölgeye yakın belirtilen rezidüler ile etkileşimde bulunduğu öngörülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, 9993782 ligandın mutant *TaPIN1* enzimin aktif bağlanma bölgesine yakın katalitik rezidüler ile etkileşim içerisinde bulunması sonucunda, 9993782 bileşiği mutant *TaPIN1* enzimine karşı potansiyel inhibitör olabileceği öngörülmüştür.

(a)

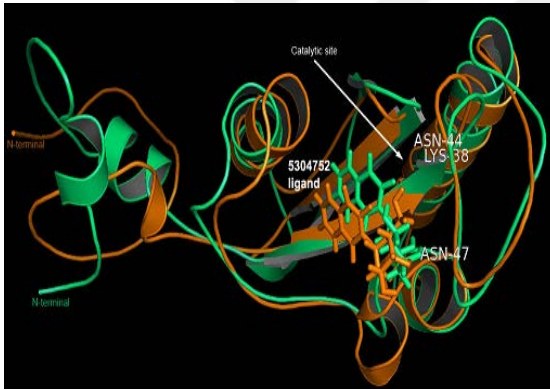


(b)

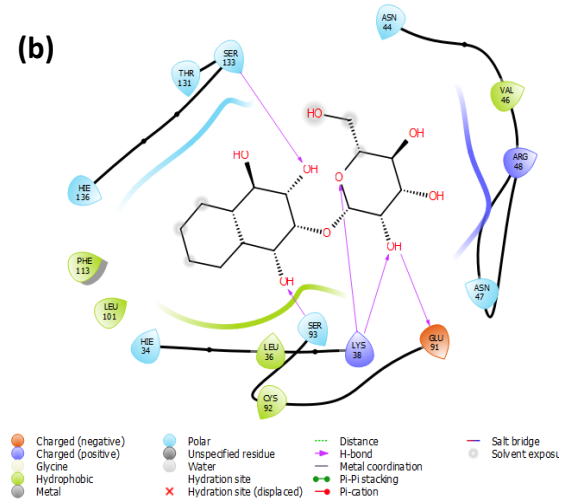


Şekil 3.33 (a) 5304752 ligand bağlı yabanıl tip *TaPIN1* kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu. Simülasyon öncesi başlangıç konformasyon turuncu ile; simülasyon sonrası son konformasyon yeşil ile gösterilmiştir. (b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.

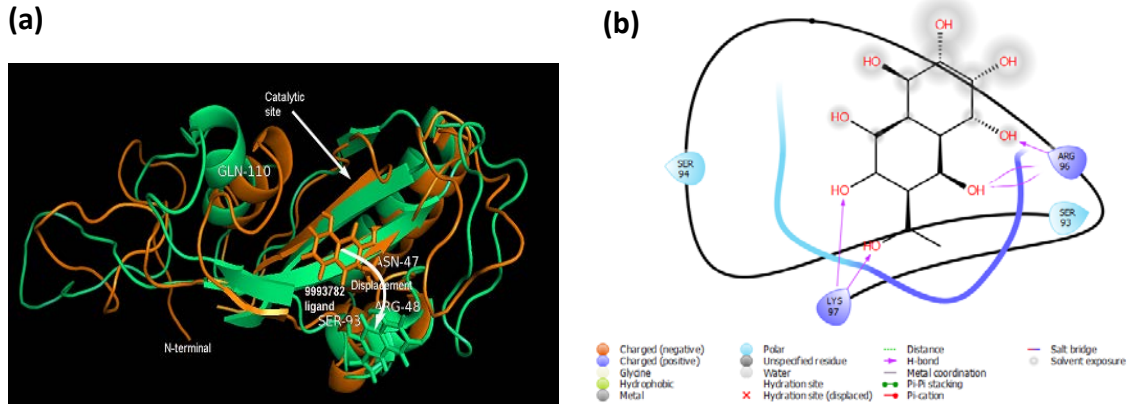
(a)



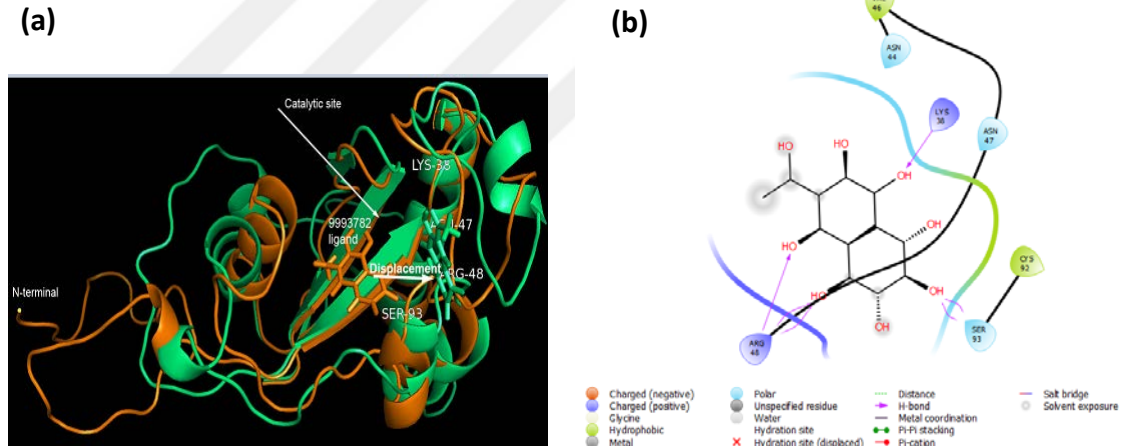
(b)



Şekil 3.34 (a) 5304752 ligand bağlı mutant *TaPIN1* kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu. Simülasyon öncesi başlangıç konformasyonu turuncu ile; simülasyon sonrası son konformasyon yeşil ile gösterilmiştir. (b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.



Şekil 3.35 (a) 9993782 ligand bağlı yabanıl tip *TaPIN1* kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu. Simülasyon öncesi başlangıç konformasyonu turuncu ile; simülasyon sonrası son konformasyon yeşil ile gösterilmiştir. (b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.



Şekil 3.36 (a) 9993782 ligand bağlı mutant *TaPIN1* kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası konformasyonların süperimpozisyonu. Simülasyon öncesi başlangıç konformasyonu turuncu ile; simülasyon sonrası son konformasyon yeşil ile gösterilmiştir. (b) MD simülasyon sonrası ligand etkileşim diyagramı.

Çizelge 3.5 *Ta*PIN1 katalitik rezidüleri ile, 5304752-yabanıl tip (*wTa*PIN1) kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.

TaPIN1 Katalitik rezidüleri	5304752 – wTaPIN1 simülasyon öncesi etkileşim gösterdiği rezidüleri	5304752 – wTaPIN1 simülasyon sonrası etkileşim gösterdiği rezidüleri
His34	His34 (polar etkileşim)	His34 (polar etkileşim)
Cys92	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	-
His136	His136 (polar etkileşim)	His136 (polar etkileşim)
Lys38	Lys38 (elektrostatik etkileşim)	-
Arg43	Arg43 (elektrostatik etkileşim)	-
	Asn47 (iki hidrojen bağ)	-
	Asn44 (hidrojen bağ)	-
	Val46 (hidrojen bağ)	-
	Ser133 (iki hidrojen bağ)	-
	Gln110 (polar etkileşim)	Gln110 (hidrojen bağ)
	Ser93 (polar etkileşim)	-
	Ser94 (polar etkileşim)	Ser94 (polar etkileşim)
	Met109 (hidrofobik etkileşim)	Met109 (hidrofobik etkileşim)
	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	Leu101 (hidrojen bağ)
	Arg48 (elektrostatik etkileşim)	-
	-	Thr108 (polar etkileşim)
	-	Leu36 (hidrofobik etkileşim)
	-	Phe113 (hidrofobik etkileşim)
		Lys97 (elektrostatik etkileşim)

Çizelge 3.6 *Ta*PIN1 katalitik rezidüleri ile, 5304752 - mutant (*mTa*PIN1) kompleks yapının simülasyonu öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.

<i>Ta</i>PIN1 Katalitik rezidüleri	5304752 – <i>mTa</i>PIN1 simülasyonu öncesi etkileşim gösterdiği rezidüleri	5304752 – <i>mTa</i>PIN1 simülasyonu sonrası etkileşim gösterdiği rezidüleri
His34	His34 (polar etkileşim)	His34 (polar etkileşim)
Cys92	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	Cys92 (hidrofobik etkileşim)
His136	His136 (polar etkileşim)	His 136 (polar etkileşim)
Lys38	Lys38 (tuz köprüsü)	Lys38 (hidrojen bağ)
Arg43	-	-
	Asn44 (hidrojen bağ)	Asn44 (polar etkileşim)
	Asn47 (hidrojen bağ)	Asn47 (polar etkileşim)
	Arg48 (elektrostatik etkileşim)	Arg48 (elektrostatik etkileşim)
	Gln110 (polar etkileşim)	-
	Ser94 (polar etkileşim)	-
	Ser93 (polar etkileşim)	Ser93 (hidrojen bağ)
	Ser133 (polar etkileşim)	Ser133 (hidrojen bağ)
	Phe113 (hidrofobik etkileşim)	Phe113 (hidrofobik etkileşim)
	Met109 (hidrofobik etkileşim)	-
	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	Leu101 (hidrofobik etkileşim)
	Val46 (hidrofobik etkileşim)	Val46 (hidrofobik etkileşim)
	Leu36 (hidrofobik etkileşim)	Leu36 (hidrofobik etkileşim)
	-	Glu91 (hidrojen bağ)
	-	Thr131 (polar etkileşim)

Çizelge 3.7 *Ta*PIN1 katalitik rezidüleri ile, 9993782 – yabancı tip (*wTa*PIN1) kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.

<i>Ta</i>PIN1 Katalitik rezidüleri	9993782 – <i>wTa</i>PIN1 simülasyon öncesi etkileşim gösterdiği rezidüleri	9993782 – <i>wTa</i>PIN1 simülasyon sonrası etkileşim gösterdiği rezidüleri
His34	His34 (polar etkileşim)	-
Cys92	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	-
His136	His136 (polar etkileşim)	-
Lys38	Lys38 (elektrostatik etkileşim)	-
Arg43	-	-
	Ser93 (hidrojen bağ)	Ser93 (polar etkileşim)
	Asn47 (hidrojen bağ)	-
	Ser133 (hidrojen bağ)	-
	Gln110 (hidrojen bağ)	-
	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	-
	Met109 (hidrofobik etkileşim)	-
	Leu36 (hidrofobik etkileşim)	-
	Ser94 (polar etkileşim)	Ser94 (polar etkileşim)
	-	Arg96 (üç hidrojen bağ)
	-	Lys97 (iki hidrojen bağ)

Çizelge 3.8 *Ta*PIN1 katalitik rezidüleri ile, 9993782 – mutant (*mTa*PIN1) kompleks yapının simülasyon öncesi ve sonrası etkileşim rezidülerinin karşılaştırılması.

<i>Ta</i>PIN1 Katalitik rezidüleri	9993782 – <i>mTa</i>PIN1 simülasyon öncesi etkileşim gösterdiği rezidüleri	9993782 – <i>mTa</i>PIN1 simülasyon sonrası etkileşim gösterdiği rezidüleri
His34	His34 (polar etkileşim)	-
Cys92	Cys92 (hidrofobik etkileşim)	Cys92 (hidrofobik etkileşim)
His136	His136 (polar etkileşim)	-
Lys38	Lys38 (tuz köprüsü)	Lys38 (hidrojen bağ)
Arg43	-	-
	Ser133 (hidrojen bağ)	-
	Asn47 (hidrojen bağ)	Asn47 (polar etkileşim)
	Ser93 (hidrojen bağ)	Ser93 (iki hidrojen bağ)
	Gln110 (polar etkileşim)	-
	Thr131 (polar etkileşim)	-
	Leu101 (hidrofobik etkileşim)	-
	Met109 (hidrofobik etkileşim)	-
	Phe113 (hidrofobik etkileşim)	-
	Leu36 (hidrofobik etkileşim)	-
	Arg48 (elektrostatik etkileşim)	Arg48 (üç hidrojen bağ)
	-	Asn44 (polar etkileşim)
	-	Val46 (hidrofobik etkileşim)

DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

4.1 Değerlendirme

İnsan peptidil prolil izomeraz (hPIN1) enziminin aşırı ekspresyonu, Fbw7 tümör fonksiyonunu, Fbw7 dimerizasyonunu baskılamak suretiyle düzenlemektedir ve Fbw7'nin kararlılığını negatif düzenleyerek c-JUN gibi onkojen seviyelerinin artmasına ve buna bağlı olarak tümör oluşumuna neden olmaktadır [46]. *Theileria annulata* paraziti, hPIN1 enzimi ile aynı yeteneği gösteren, tümör baskılayıcı FBW7 proteinin hücre içerisindeki dengesini bozarak konak hücre onkojenik sinyal yolağını manipüle eden peptidil prolil izomeraz enzimini (*Ta*PIN1) salgılamaktadır. *Ta*PIN1 aracılı FBW7 aktivitesinin baskılanmasıyla, enfekte hayvanlarda hücre proliferasyonu ve metastaz gibi kanser benzeri özelliklerin ortaya çıkmasına neden olan c-Jun proto-onkojen seviyesi artmaktadır [48]. *Theileria* enfekte hayvanlar, bir hidroksinaftakinon ilaç olan buparvaquone'nun tek doz 2,5 mg/kg uygulanması ile tedavi edilmektedir.[20]. Fakat buparvaquone tedavisine cevap vermeyen enfekte hayvanlar ile yapılan çalışmalar sonucunda *Ta*PIN1 enziminin ilaca direnç gösteren A53P mutasyonu içerdiği belirlenmiştir [48].

Tez çalışmasında, literatürde ilk defa olmak üzere, inhibitör adayların belirlenmesi amacıyla naftakinon türevlerinden oluşan bileşiklerin yabancı tip ve mutant *Ta*PIN1 enzimleri ile moleküler kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen öncü ligandlar ile ileri moleküler dinamik simülasyon çalışmaları yapılarak mutant *Ta*PIN1

enzimini baskılayacak ve hPIN1 kaynaklı kanserlerin tedavisinde ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarında kullanılması öngörülen inhibitörler belirlenmiştir. Ayrıca, ileri *in vitro* karakterizasyon ve inhibitör test çalışmalarında kullanılmak üzere gen ürününün elde edilmesine olanak sağlayacak, TaPIN1 enzimini kodlayan gen klonlanmıştır.

İntron içeren TaPIN1 geni *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hücrelerine transforme edildikten sonra gözlenen beyaz kolonilerden intron içeren rekombinant plazmid DNA izole edilmiştir ve kalıp olarak kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR ürünü agaroz jelde yürütülerek başarılı transformasyon sonucu gözlenmiştir (Şekil 3.3). Intron içeren rekombinant DNA üzerinde yönlendirilmiş mutagenез uygulanarak kodlamayan bölge intron uzaklaştırılmıştır. İntronu uzaklaştırılan TaPIN1 enzimini kodlayan gen *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilmiştir ve pozitif transformantlar koloni PCR yöntemi ile amplifiye edilerek doğruluğu analiz edilmiştir (Şekil 3.7). İntronun uzaklaştırıldığı ve doğru gen bölgesinin insersiyonu dizileme ile teyit edilmiştir (Şekil 3.8-3.10).

Yabanıl tip ve mutant TaPIN1 enzimlerine karşı potansiyel inhibitörler yapıya dayalı ilaç tasarım yöntemi ile belirlenmiştir. İlk olarak her iki tip enzimin homoloji modelleri oluşturularak geometri optimizasyonu, validasyonu ve modellerin doğruluğu analiz edilmiştir.

Yabanıl tip ve mutant TaPIN1 proteinlerin öngörülen yapılarına karşı naftakinon türevleri taranarak yüksek bağlanma afinitesine sahip 10 tane ligand seçilmiştir. Taranmış olan ligandlar XP GlideScore'a göre sıralanmıştır ve skoru en yüksek olan iki tane bileşik (5304752 ve 9993782 PubChem numaralı bileşikler) seçilerek yabanıl tip ve mutant proteinler ile ileri moleküler dinamik yöntemler kullanılarak simüle edilmiştir.

5304752 ve 9993782, theileriosis tedavisinde etkili bir ilaç olan buparvaquone'a göre mutant ve yabanıl tip TaPIN1 enzimlerine karşı daha yüksek XP GScore bağlanma afinitesi göstermiştir. Serbest bağlanma enerjileri kıyaslandığında ise, sadece 9993782 ligandı yabanıl tip enzime karşı oldukça düşük serbest bağlanma enerjisi göstermiştir (Çizelge 3.1 ve 3.2).

5304752 ligand bağı yabanıl tip *TaPIN1* enzimin simülasyon öncesi ve sonrasında konformasyonları incelendiğinde (Şekil 3.33a) ligandın aktif bölgeden çıkmadığı sadece pozisyon değiştirdiği gözlenmiştir. Başlangıç pozisyonunda (Şekil 3.33b), hPIN1'deki katalitik rezidüler [55], [57], [58] referans alınarak belirlenmiş tüm *TaPIN1* katalitik rezidüleri (His34, Cys92, His136, Lys38 ve Arg43) ile etkileşimde olduğu, simülasyon sonrası son pozisyonunda ise sadece His34 ve His136 katalitik rezidüler ile etkileşimini koruduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.5). RMSD grafiğine göre (Şekil 3.30) ligandın simülasyon boyunca proteinin aktif bölgesi ile etkileşim halinde olduğu görülmektedir. 5304752 ligand bağı mutant *TaPIN1* enziminin simülasyon öncesi ve sonrasında konformasyonları karşılaştırıldığında (Şekil 3.34a) ligandın başlangıç pozisyonuna yakın bir yerde (aktif bölgede) olması kararlılığını sürdürdüğünü göstermektedir. Ayrıca simülasyon öncesi başlangıç pozisyonu ve simülasyon sonrası son pozisyonundaki ligand etkileşimleri (Şekil 3.24b ve 3.34b sırasıyla) irdelendiğinde, ligandın Arg43 hariç His34, Cys92, His136 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile etkileşim içerisinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.6). Bu sonuçlar doğrultusunda, RMSD grafiği (Şekil 3.30) incelendiğinde simülasyon boyunca ligand proteinin aktif bölgesi ile sıkı bağlantı halinde olduğu dolayısıyla kararlılığını koruduğu söylenebilmektedir. 5304752 PubChem numarasına sahip ligand ile yapılan çalışmalar sonucunda, ligandın hem yabanıl tip hem mutant *TaPIN1*'in aktif bölgesinde bulunduğu gözlenmiştir ve enzimin substratı için antagonist görevi alarak, potansiyel inhibitör olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

9993782 ligand bağı yabanıl tip *TaPIN1* enzimin simülasyon öncesi ve sonrasında konformasyonları incelendiğinde (Şekil 3.35a) ligandın ilk pozisyonundan tamamen farklı olarak aktif bölgeden çıktığı, başlangıç ve son pozisyonlarındaki ligand etkileşim diyagramları (Şekil 3.25b ve 3.35b sırasıyla) sonuçlarına göre, simülasyon öncesinde ligand, Arg43 hariç, yabanıl tip *TaPIN1* enzimin His34, Cys92, His136 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile etkileşim gösterirken, 100 ns simülasyon sonrasında belirlenmiş katalitik rezidüler ile herhangi bir etkileşim göstermemiştir (Çizelge 3.7). Bu sonuçlar doğrultusunda RMSD grafiğinde (Şekil 3.30) gözlenen salınımlar ligandın simülasyon boyunca proteinin etrafında gezindiğini ifade etmektedir. 9993782 ligand bağı mutant *TaPIN1* enzimin simülasyon öncesi ve sonrasında konformasyonları karşılaştırıldığında

(Şekil 3.36a) ligandın başlangıç pozisyonunu değiştirdiği ve aktif bölgeye yakın bir yere yerleştiği gözlenmektedir. Başlangıç ve son pozisyonlarındaki ligand etkileşim (Şekil 3.26b ve 3.36b sırasıyla) sonuçlarına göre, ligand başlangıç pozisyonunda His34, Cys92, His136 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile, simülasyon sonrasında ise sadece Cys92 ve Lys38 katalitik rezidüleri ile etkileşim göstermiştir (Çizelge3.8). Bu sonuçlara göre, RMSD grafiği (Şekil 3.30) incelendiğinde önemli sapmaların gözlenmemesi ile, ligandın simülasyon boyunca aktif bölgeye yakın, belirtilen rezidüer ile etkileşimde bulunduğu söylenebilmektedir. 9993782 PubChem numarasına sahip ligand ile yapılan çalışmalar sonucunda, ligandın yabancı tip *Ta*PIN1 enzimin aktif bölgesinin dışında konumlandığı ve stabil kalmadığı gözlemlenmiştir. Fakat mutant *Ta*PIN1'in aktif bölgesine yakın bir yerde bulunması, enzimin substratı için antagonist görevi alarak, potansiyel inhibitör olarak değerlendirilebileceğı öngörülmektedir.

4.2 Öneriler

Tez çalışmasında *in vitro* ve *in silico* çalışmalar ile elde edilen sonuçların kullanılmasıyla;

- *E. coli* hücrelerine transforme edilen *Ta*PIN1 genin ifade edilerek enzim aktivite testlerinin yapılması ve *Ta*PIN1 aktivitesinin onaylanması,
- *E. coli* hücrelerine transforme edilen *Ta*PIN1 genin ifade edilerek inhibitör test çalışmalarında kullanılmak üzere proteinin saf olarak elde edilmesi,
- Potansiyel inhibitör olarak öngörülen ligandlar (5304752 ve 9993782) ile *in vitro* inhibisyon çalışmaların yapılması,
- Yabancı tip ve mutant *Ta*PIN1 ile naftakinon türevlerin moleküler kenetlenmesi sonucu belirlenen buparvquone'a göre daha yüksek bağlanma afinitesine sahip diğer 8 ligand ile ileri moleküler dinamik simülasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi,
- Potansiyel inhibitör olarak öngörülen ligandlar (5304752 ve 9993782) ile *Ta*PIN1 homologu olan insan PIN1 (hPIN1) kaynaklı kanserlerin alternatif tedavi edilebilmesine yönelik ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarının yapılması,

- Mevcut insan PIN1 inhibitörlerin yabancı tip ve mutant *Ta*PIN1 enzimine karşı *in ilico* tarama çalışmaları önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Cholewinski, M. Derda, M. ve Hadas, E., (2015). "Parasitic diseases in humans transmitted by vectors", *Annals of parasitology*, 61.
- [2] Wilson, A.J. Morgan, E.R. Booth, M. Norman, R. Perkins, S.E. Hauffe, H.C. Mideo, N. Antonovics, J. McCallum, H. ve Fenton, A., (2017). "What is a vector?", *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372: 20160085.
- [3] Liu, X.-Y. Gong, X.-Y. Zheng, C. Song, Q.-Y. Chen, T. Wang, J. Zheng, J. Deng, H.-K. ve Zheng, K.-Y., (2017). "Molecular epidemiological survey of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from eastern China", *Acta Tropica*, 167: 26-30.
- [4] Manjunathachar, H.V. Saravanan, B.C. Kesavan, M. Karthik, K. Rathod, P. Gopi, M. Tamilmahan, P. ve Balaraju, B.L., (2014). "Economic importance of ticks and their effective control strategies", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4: S770-S779.
- [5] Uilenberg, G. Dobbelaere, D. De Gee, A. ve Koch, H., (1993). "Progress in research on tick-borne diseases: Theileriosis and heartwater", *Veterinary Quarterly*, 15: 48-54.
- [6] Dantas-Torres, F. ve Otranto, D., (2017). *Theileriosis*, C.B. Marcondes, ed. *Arthropod Borne Diseases*. Springer, 355-361.
- [7] Jabbar, A. Abbas, T. Saddiqi, H.A. Qamar, M.F. ve Gasser, R.B., (2015). "Tick-borne diseases of bovines in Pakistan: major scope for future research and improved control", *Parasites & vectors*, 8: 283.
- [8] Yaghfoori, S. Razmi, G.R. Mohri, M. Razavizadeh, A.R.T. ve Movassaghi, A.R., (2016). "An experimental ovine Theileriosis: The effect of *Theileria lestoquardi* infection on cardiovascular system in sheep", *Acta Tropica*, 161: 55-61.
- [9] Woods, K. von Schubert, C. ve Dobbelaere, D., (2013). "Hijacking of Host Cell Signaling by *Theileria*", *Protein Phosphorylation in Parasites Novel Targets for Antiparasitic Intervention*: 179-198.
- [10] Shaw, M.K., (2003). "Cell invasion by *Theileria* sporozoites", *Trends in parasitology*, 19: 2-6.

- [11] Tajeri, S. Razmi, G. ve Haghparast, A., (2016). "Establishment of an Artificial Tick Feeding System to Study *Theileria lestoquardi* Infection", *PloS one*, 11: e0169053.
- [12] Lempereur, L. Beck, R. Fonseca, I. Marques, C. Duarte, A. Santos, M. Zúquete, S. Gomes, J. Walder, G. ve Domingos, A., (2017). "Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites", *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17: 51-65.
- [13] Mans, B.J. Pienaar, R. ve Latif, A.A., (2015). "A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology", *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4: 104-118.
- [14] AL-Hosary, A.A. Ahmed, L.S. ve Seitzer, U., (2015). "Molecular Diagnostic studies and Phylogenetic analysis of *Theileria* species in Egypt", *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 9: 158-163.
- [15] Nourollahi-Fard, S.R. Khalili, M. ve Ghalekhani, N., (2015). "Detection of *Theileria annulata* in blood samples of native cattle by PCR and smear method in Southeast of Iran", *Journal of Parasitic Diseases*, 39: 249-252.
- [16] Chaisi, M.E. Janssens, M.E. Vermeiren, L. Oosthuizen, M.C. Collins, N.E. ve Geysen, D., (2013). "Evaluation of a real-time PCR test for the detection and discrimination of *Theileria* species in the African buffalo (*Syncerus caffer*)", *PloS one*, 8: e75827.
- [17] Gomes, J. Santos, M. Amaro, A. da Fonseca, I.P. Santos-Gomes, G. ve Inácio, J., (2017). "A field evaluation of an isothermal DNA amplification assay for the detection of *Theileria annulata* infection in cattle", *Molecular and Cellular Probes*, 31: 61-64.
- [18] Seitzer, U. Bakheit, M.A. Salih, D.E.A. Ali, A. Haller, D. Yin, H. Schnittger, L. ve Ahmed, J., (2007). "From molecule to diagnostic tool: *Theileria annulata* surface protein TaSP", *Parasitology research*, 101: 217-223.
- [19] He, H. Li, Y. Liu, J. Liu, Z. Yang, J. Liu, A. Chen, Z. Ren, Q. Guan, G. ve Liu, G., (2016). "An indirect ELISA for detection of *Theileria* spp. antibodies using a recombinant protein (rTISP) from *Theileria luwenshuni*", *Experimental parasitology*, 166: 89-93.
- [20] McHardy, N. Wekesa, L. Hudson, A. ve Randall, A., (1985). "Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone", *Research in Veterinary Science*, 39: 29-33.
- [21] Unsuren, H. Kurtde, A. ve Goksu, K., (1988). "Effectiveness of parvaquone in cattle infected with *Theileria annulata*", *Tropical animal health and production*, 20: 256-258.
- [22] Wamuyu, L. Obanda, V. Kariuki, D. Gakuya, F. Makanda, M. Otiende, M. ve Ommeh, S., (2015). "Molecular Detection and Characterization of *Theileria* Infecting Wildebeest (*Connochaetes taurinus*) in the Maasai Mara National Reserve, Kenya", *Pathogens*, 4: 626-638.

- [23] Bishop, R. Musoke, A. Morzaria, S. Gardner, M. ve Nene, V., (2004). "Theileria: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks", *Parasitology*, 129: S271-S283.
- [24] Liu, J. Guan, G. Liu, Z. Liu, A. Ma, M. Bai, Q. Yin, H. ve Luo, J., (2013). "Additional data for a new *Theileria* sp. from China based on the sequences of ribosomal RNA internal transcribed spacers", *Experimental parasitology*, 133: 217-221.
- [25] Shaw, M.K., (2002). *Theileria development and host cell invasion*, D.A.E. Dobbelaere ve McKeever, D.J., ed. *Theileria*. Springer, 1-22.
- [26] Tait, A. ve Hall, F., (1990). "Theileria annulata: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines", *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 9: 387-403.
- [27] Gomes, J. Salgueiro, P. Inácio, J. Amaro, A. Pinto, J. Tait, A. Shiels, B. da Fonseca, I.P. Santos-Gomes, G. ve Weir, W., (2016). "Population diversity of *Theileria annulata* in Portugal", *Infection, Genetics and Evolution*, 42: 14-19.
- [28] Abdul-Husin, I. Hadi, S.J. ve Alwan, I.A., (2016). "Diagnostic, Hematological and Therapeutic Studies on Theileriasis in Cattle in Babylon", *International Journal of PharmTech Research*, 9: 463-466.
- [29] Erdemir, A. ve Mutlu, O., (2017). "Functional and structural characterization of the pentapeptide insertion of *Theileria annulata* lactate dehydrogenase by site-directed mutagenesis, comparative modeling and molecular dynamics simulations", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 74: 344-351.
- [30] Sudan, V. Shanker, D. Jaiswal, A. Singh, A. ve Pandey, V., (2017). "Standardization and validation of simple PCR, duplex PCR and RAPD in comparison to blood smear examination for diagnosing bovine tropical theileriosis", *Biologicals*, 46: 88-91.
- [31] Kumar, A. Gaur, G.K. Gandham, R.K. Panigrahi, M. Ghosh, S. Saravanan, B. Bhushan, B. Tiwari, A.K. Sulabh, S. ve Priya, B., (2017). "Global gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells challenged with *Theileria annulata* in crossbred and indigenous cattle", *Infection, Genetics and Evolution*, 47: 9-18.
- [32] Spooner, R. Innes, E. Glass, E. ve Brown, C., (1989). "*Theileria annulata* and *T. parva* infect and transform different bovine mononuclear cells", *Immunology*, 66: 284.
- [33] Fry, L.M. Schneider, D.A. Frevert, C.W. Nelson, D.D. Morrison, W.I. ve Knowles, D.P., (2016). "East coast fever caused by *Theileria parva* is characterized by macrophage activation associated with vasculitis and respiratory failure", *PloS one*, 11: e0156004.
- [34] AL-HOSARY, A. EL-Sayed, H. ve Ahmed, L., (2015). "Oxidative stress and hematological profile in *Theileria annulata* clinically infected cattle before and after treatment", *Assiut Vet Med J*, 6: 123-129.

- [35] Memon, M. Memon, N. Kachiwal, A. Memon, M. ve Bhutto, B., (2016). "Prevalence of theileriosis and its impact on Haematological values in naturally infected Buffaloes at Hyderabad", *Pak. J. Agri., Agril. Engg., Vet. Sci*, 32: 85-94.
- [36] Gubbels, J. De Vos, A. Van der Weide, M. Viseras, J. Schouls, L. De Vries, E. ve Jongejan, F., (1999). "Simultaneous Detection of Bovine Theileria and Babesia Species by Reverse Line Blot Hybridization", *Journal of clinical microbiology*, 37: 1782-1789.
- [37] Ros-García, A. Juste, R.A. ve Hurtado, A., (2012). "A highly sensitive DNA bead-based suspension array for the detection and species identification of bovine piroplasms", *International journal for parasitology*, 42: 207-214.
- [38] Gray, M. Luckins, A. Rae, P. ve Brown, C., (1980). "Evaluation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with Theileria parva and T. annulata", *Research in Veterinary Science*, 29: 360-366.
- [39] Gharbi, M. ve Darghouth, M.A., (2015). "Control of tropical theileriosis (Theileria annulata infection in cattle) in North Africa", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5: 505-510.
- [40] Shiels, B. Langsley, G. Weir, W. Pain, A. McKellar, S. ve Dobbelaere, D., (2006). "Alteration of host cell phenotype by Theileria annulata and Theileria parva: mining for manipulators in the parasite genomes", *International journal for parasitology*, 36: 9-21.
- [41] Hayashida, K. Kajino, K. Hattori, M. Wallace, M. Morrison, I. Greene, M.I. ve Sugimoto, C., (2013). "MDM2 regulates a novel form of incomplete neoplastic transformation of Theileria parva infected lymphocytes", *Experimental and molecular pathology*, 94: 228-238.
- [42] Tretina, K. Gotia, H.T. Mann, D.J. ve Silva, J.C., (2015). "Theileria-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks", *Trends in parasitology*, 31: 306-314.
- [43] Weitzman, M.D. ve Weitzman, J.B., (2014). "What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity", *Cell host & microbe*, 15: 283-294.
- [44] Chaussepied, M. ve Langsley, G., (1996). "Theileria transformation of bovine leukocytes: a parasite model for the study of lymphoproliferation", *Research in immunology*, 147: 127-138.
- [45] Ryo, A. Liou, Y.-C. Wulf, G. Nakamura, M. Lee, S.W. ve Lu, K.P., (2002). "PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells", *Molecular and cellular biology*, 22: 5281-5295.
- [46] Min, S.-H. Lau, A.W. Lee, T.H. Inuzuka, H. Wei, S. Huang, P. Shaik, S. Lee, D.Y. Finn, G. ve Balastik, M., (2012). "Negative regulation of the stability and tumor suppressor function of Fbw7 by the Pin1 prolyl isomerase", *Molecular cell*, 46: 771-783.
- [47] Chaussepied, M. Lallemand, D. Moreau, M.-F. Adamson, R. Hall, R. ve Langsley, G., (1998). "Upregulation of Jun and Fos family members and

- permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in Theileria-transformed leukocytes", *Molecular and biochemical parasitology*, 94: 215-226.
- [48] Marsolier, J. Perichon, M. DeBarry, J. Villoutreix, B. Chluba, J. Lopez, T. Garrido, C. Zhou, X. Lu, K. ve Fritsch, L., (2015). "Theileria parasites secrete a prolyl isomerase to maintain host leukocyte transformation", *Nature*, 520: 378.
 - [49] Dunyak, B.M. ve Gestwicki, J.E., (2016). "Peptidyl-Proline Isomerases (PPIases): Targets for Natural Products and Natural Product-Inspired Compounds: Miniperspective", *Journal of medicinal chemistry*, 59: 9622-9644.
 - [50] Shaw, P.E., (2002). "Peptidyl-prolyl isomerases: A new twist to transcription", *EMBO reports*, 3: 521-526.
 - [51] Yaffe, M.B. Schutkowski, M. Shen, M. Zhou, X.Z. Stukenberg, P.T. Rahfeld, J.-U. Xu, J. Kuang, J. Kirschner, M.W. ve Fischer, G., (1997). "Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism", *Science*, 278: 1957-1960.
 - [52] Lu, K.P. ve Zhou, X.Z., (2007). "The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease", *Nature reviews Molecular cell biology*, 8: 904-916.
 - [53] Ranganathan, R. Lu, K.P. Hunter, T. ve Noel, J.P., (1997). "Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent", *Cell*, 89: 875-886.
 - [54] Hariharan, N. ve Sussman, M.A., (2014). "Pin1: a molecular orchestrator in the heart", *Trends in cardiovascular medicine*, 24: 256-262.
 - [55] Velazquez, H.A. ve Hamelberg, D., (2013). "Conformation-directed catalysis and coupled enzyme–substrate dynamics in Pin1 phosphorylation-dependent cis–trans isomerase", *The Journal of Physical Chemistry B*, 117: 11509-11517.
 - [56] Greenwood, A.I. Rogals, M.J. De, S. Lu, K.P. Kovrigin, E.L. ve Nicholson, L.K., (2011). "Complete determination of the Pin1 catalytic domain thermodynamic cycle by NMR lineshape analysis", *Journal of biomolecular NMR*, 51: 21.
 - [57] Daum, S. Fanghänel, J. Wildemann, D. ve Schiene-Fischer, C., (2006). "Thermodynamics of phosphopeptide binding to the human peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1", *Biochemistry*, 45: 12125-12135.
 - [58] Schiene-Fischer, C., (2015). "Multidomain peptidyl prolyl cis/trans Isomerases", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850: 2005-2016.
 - [59] Davis, R.J. Welcker, M. ve Clurman, B.E., (2014). "Tumor suppression by the Fbw7 ubiquitin ligase: mechanisms and opportunities", *Cancer cell*, 26: 455-464.
 - [60] Hao, B. Oehlmann, S. Sowa, M.E. Harper, J.W. ve Pavletich, N.P., (2007). "Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases", *Molecular cell*, 26: 131-143.

- [61] Welcker, M. ve Clurman, B.E., (2008). "FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation", *Nature reviews. Cancer*, 8: 83.
- [62] Welcker, M. Larimore, E.A. Swanger, J. Bengoechea-Alonso, M.T. Grim, J.E. Ericsson, J. Zheng, N. ve Clurman, B.E., (2013). "Fbw7 dimerization determines the specificity and robustness of substrate degradation", *Genes & development*, 27: 2531-2536.
- [63] Fan, J. ve Bertino, J.R., (1997). "K-ras modulates the cell cycle via both positive and negative regulatory pathways", *Oncogene*, 14.
- [64] Mullard, A., (2014). "New drugs cost US \$2.6 billion to develop", *Nature reviews. Drug discovery*, 13: 877.
- [65] Leelananda, S.P. ve Lindert, S., (2016). "Computational methods in drug discovery", *Beilstein journal of organic chemistry*, 12: 2694.
- [66] Song, C.M. Lim, S.J. ve Tong, J.C., (2009). "Recent advances in computer-aided drug design", *Briefings in bioinformatics*, 10: 579-591.
- [67] Sliwoski, G. Kothiwale, S. Meiler, J. ve Lowe, E.W., (2014). "Computational methods in drug discovery", *Pharmacological reviews*, 66: 334-395.
- [68] Macalino, S.J.Y. Gosu, V. Hong, S. ve Choi, S., (2015). "Role of computer-aided drug design in modern drug discovery", *Archives of pharmacal research*, 38: 1686-1701.
- [69] Anderson, A.C., (2003). "The process of structure-based drug design", *Chemistry & biology*, 10: 787-797.
- [70] Staker, B.L. Buchko, G.W. ve Myler, P.J., (2015). "Recent contributions of structure-based drug design to the development of antibacterial compounds", *Current opinion in microbiology*, 27: 133-138.
- [71] Kalyaanamoorthy, S. ve Chen, Y.-P.P., (2011). "Structure-based drug design to augment hit discovery", *Drug discovery today*, 16: 831-839.
- [72] Lionta, E. Spyrou, G. K Vassilatis, D. ve Cournia, Z., (2014). "Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances", *Current topics in medicinal chemistry*, 14: 1923-1938.
- [73] Lavecchia, A. ve Di Giovanni, C., (2013). "Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review", *Current medicinal chemistry*, 20: 2839-2860.
- [74] Schneider, G. ve Fechner, U., (2005). "Computer-based de novo design of drug-like molecules", *Nature reviews. Drug discovery*, 4: 649.
- [75] Ou-Yang, S.-s. Lu, J.-y. Kong, X.-q. Liang, Z.-j. Luo, C. ve Jiang, H., (2012). "Computational drug discovery", *Acta Pharmacologica Sinica*, 33: 1131.
- [76] Katsila, T. Spyroulias, G.A. Patrinos, G.P. ve Matsoukas, M.-T., (2016). "Computational approaches in target identification and drug discovery", *Computational and structural biotechnology journal*, 14: 177-184.

- [77] Hillisch, A. Pineda, L.F. ve Hilgenfeld, R., (2004). "Utility of homology models in the drug discovery process", *Drug discovery today*, 9: 659-669.
- [78] Cavasotto, C.N. ve Phatak, S.S., (2009). "Homology modeling in drug discovery: current trends and applications", *Drug discovery today*, 14: 676-683.
- [79] Vyas, V. Ukawala, R. Ghate, M. ve Chintla, C., (2012). "Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives", *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74: 1.
- [80] França, T.C.C., (2015). "Homology modeling: an important tool for the drug discovery", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33: 1780-1793.
- [81] Baker, D. ve Sali, A., (2001). "Protein structure prediction and structural genomics", *Science*, 294: 93-96.
- [82] Madhusudhan, M. Marti-Renom, M.A. Eswar, N. John, B. Pieper, U. Karchin, R. Shen, M.-Y. ve Sali, A., (2005). "Comparative protein structure modeling", *The Proteomics Protocols Handbook*: 831-860.
- [83] Xiang, Z., (2006). "Advances in homology protein structure modeling", *Current Protein and Peptide Science*, 7: 217-227.
- [84] Ş. ali, A., (1995). "Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints", *Molecular medicine today*, 1: 270-277.
- [85] Fiser, A. ve Šali, A., (2003). "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models", *Methods in enzymology*, 374: 461-491.
- [86] Mathur, A. ve Vidyarthi, A.S., (2011). "SWIFT MODELLER: a JAVA based GUI for molecular modeling", *Journal of molecular modeling*, 17: 2601-2607.
- [87] Eswar, N. Webb, B. Marti-Renom, M.A. Madhusudhan, M.S. Eramian, D. Shen, M.-y. Pieper, U. ve Sali, A., (2006). "Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller", *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 0 5: Unit-5.6.
- [88] Shen, M.y. ve Sali, A., (2006). "Statistical potential for assessment and prediction of protein structures", *Protein science*, 15: 2507-2524.
- [89] Dong, G.Q. Fan, H. Schneidman-Duhovny, D. Webb, B. ve Sali, A., (2013). "Optimized atomic statistical potentials: assessment of protein interfaces and loops", *Bioinformatics*, 29: 3158-3166.
- [90] Zhang, Y., (2009). "Protein structure prediction: when is it useful?", *Current opinion in structural biology*, 19: 145-155.
- [91] Jagielska, A. Wroblewska, L. ve Skolnick, J., (2008). "Protein model refinement using an optimized physics-based all-atom force field", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 8268-8273.
- [92] Vanommeslaeghe, K. Hatcher, E. Acharya, C. Kundu, S. Zhong, S. Shim, J. Darian, E. Guvench, O. Lopes, P. ve Vorobyov, I., (2010). "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*, 31: 671-690.
- [93] Chaudhari, R. Tan, Z. Huang, B. ve Zhang, S., (2017). "Computational polypharmacology: A new paradigm for drug discovery", *Expert opinion on drug discovery*, 12: 279-291.
 - [94] Atkovska, K. Samsonov, S.A. Paszkowski-Rogacz, M. ve Pisabarro, M.T., (2014). "Multipose binding in molecular docking", *International journal of molecular sciences*, 15: 2622-2645.
 - [95] Anushree, T. ve Krishna, M., (2017). "Molecular Docking: A Structure-Based Drug Designing Approach", *JSM Chemistry*, 5: 1042.
 - [96] Chen, Y.-C., (2015). "Beware of docking!", *Trends in pharmacological sciences*, 36: 78-95.
 - [97] Hou, X. Li, K. Yu, X. Sun, J.-p. ve Fang, H., (2015). "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*, 55: 1973-1983.
 - [98] Verdonk, M.L. Cole, J.C. Hartshorn, M.J. Murray, C.W. ve Taylor, R.D., (2003). "Improved protein–ligand docking using GOLD", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52: 609-623.
 - [99] Lang, P.T. Brozell, S.R. Mukherjee, S. Pettersen, E.F. Meng, E.C. Thomas, V. Rizzo, R.C. Case, D.A. James, T.L. ve Kuntz, I.D., (2009). "DOCK 6: Combining techniques to model RNA–small molecule complexes", *Rna*, 15: 1219-1230.
 - [100] Jain, A.N., (2007). "Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search", *Journal of computer-aided molecular design*, 21: 281-306.
 - [101] Friesner, R.A. Banks, J.L. Murphy, R.B. Halgren, T.A. Klicic, J.J. Mainz, D.T. Repasky, M.P. Knoll, E.H. Shelley, M. ve Perry, J.K., (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy", *Journal of medicinal chemistry*, 47: 1739-1749.
 - [102] Morris, G.M. Huey, R. Lindstrom, W. Sanner, M.F. Belew, R.K.Goodsell, D.S. ve Olson, A.J., (2009). "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility", *Journal of computational chemistry*, 30: 2785-2791.
 - [103] Repasky, M.P. Shelley, M. ve Friesner, R.A., (2007). "Flexible ligand docking with Glide", *Current Protocols in Bioinformatics*: 8.12. 11-18.12. 36.
 - [104] Lavecchia, A. ve Di Giovanni, C., (2013). *Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review*.
 - [105] Friesner, R.A. Murphy, R.B. Repasky, M.P. Frye, L.L. Greenwood, J.R. Halgren, T.A. Sanschagrin, P.C. ve Mainz, D.T., (2006). "Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes", *Journal of medicinal chemistry*, 49: 6177-6196.

- [106] Borhani, D.W. ve Shaw, D.E., (2012). "The future of molecular dynamics simulations in drug discovery", *Journal of computer-aided molecular design*, 26: 15-26.
- [107] De Vivo, M. Masetti, M. Bottegoni, G. ve Cavalli, A., (2016). "Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery", *J. Med. Chem*, 59: 4035-4061.
- [108] Ferreira, L.G. dos Santos, R.N. Oliva, G. ve Andricopulo, A.D., (2015). "Molecular docking and structure-based drug design strategies", *Molecules*, 20: 13384-13421.
- [109] Alonso, H. Bliznyuk, A.A. ve Gready, J.E., (2006). "Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design", *Medicinal research reviews*, 26: 531-568.
- [110] Durrant, J.D. ve McCammon, J.A., (2011). "Molecular dynamics simulations and drug discovery", *BMC biology*, 9: 71.
- [111] Hospital, A. Goñi, J.R. Orozco, M. ve Gelpí, J.L., (2015). "Molecular dynamics simulations: advances and applications", *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 8: 37.
- [112] González, M., (2011). "Force fields and molecular dynamics simulations", *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, 12: 169-200.
- [113] Wang, J. Wolf, R.M. Caldwell, J.W. Kollman, P.A. ve Case, D.A., (2004). "Development and testing of a general amber force field", *Journal of computational chemistry*, 25: 1157-1174.
- [114] Brooks, B.R. Brucoleri, R.E. Olafson, B.D. States, D.J. Swaminathan, S.a. ve Karplus, M., (1983). "CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations", *Journal of computational chemistry*, 4: 187-217.
- [115] Christen, M. Hünenberger, P.H. Bakowies, D. Baron, R. Bürgi, R. Geerke, D.P. Heinz, T.N. Kastenholtz, M.A. Kräutler, V. ve Oostenbrink, C., (2005). "The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05", *Journal of computational chemistry*, 26: 1719-1751.
- [116] Salomon-Ferrer, R. Case, D.A. ve Walker, R.C., (2013). "An overview of the Amber biomolecular simulation package", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3: 198-210.
- [117] Brooks, B.R. Brooks, C.L. MacKerell, A.D. Nilsson, L. Petrella, R.J. Roux, B. Won, Y. Archontis, G. Bartels, C. ve Boresch, S., (2009). "CHARMM: the biomolecular simulation program", *Journal of computational chemistry*, 30: 1545-1614.
- [118] van Gunsteren, W.F. Billeter, S.R. Eising, A.A. Hünenberger, P.H. Krüger, P. Mark, A.E. Scott, W.R. ve Tironi, I.G., (1996). "Biomolecular simulation: the {GROMOS96} manual and user guide".

- [119] Phillips, J.C. Zheng, G. Kumar, S. ve Kalé, L.V., (2002). "NAMD: Biomolecular simulation on thousands of processors": IEEE.
- [120] Scientific, T.F., "Thermo Scientific aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System ", Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013753_aLICator_lic_clon_exp_kit3_CHis_ug.pdf. Accessed 5.10, 2017.
- [121] Promega, Available at: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system-protocol.pdf>. Accessed 09.10, 2017.
- [122] Promega, Available at: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol.pdf>. Accessed 08.10, 2017.
- [123] Biolabs, N.E., Available at: <https://www.neb.com/-/media/catalog/Datacards%20or%20Manuals/manualE0552.pdf>. Accessed 08.10, 2017.
- [124] Lacks, S. ve Greenberg, B., (1977). "Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation", *Journal of molecular biology*, 114: 153-168.
- [125] Edgar, R.C., (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput", *Nucleic acids research*, 32: 1792-1797.
- [126] Pettersen, E.F. Goddard, T.D. Huang, C.C. Couch, G.S. Greenblatt, D.M. Meng, E.C. ve Ferrin, T.E., (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis", *Journal of computational chemistry*, 25: 1605-1612.
- [127] Colovos, C. ve Yeates, T.O., (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions", *Protein science*, 2: 1511-1519.
- [128] Wiederstein, M. ve Sippl, M.J., (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", *Nucleic acids research*, 35: W407-W410.
- [129] Wallner, B. ve Elofsson, A., (2003). "Can correct protein models be identified?", *Protein science*, 12: 1073-1086.
- [130] Lovell, S.C. Davis, I.W. Arendall, W.B. de Bakker, P.I. Word, J.M. Prisant, M.G. Richardson, J.S. ve Richardson, D.C., (2003). "Structure validation by α geometry: ϕ , ψ and $C\beta$ deviation", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 50: 437-450.
- [131] Kim, S. Thiessen, P.A. Bolton, E.E. Chen, J. Fu, G. Gindulyte, A. Han, L. He, J. He, S. ve Shoemaker, B.A., (2015). "PubChem substance and compound databases", *Nucleic acids research*, 44: D1202-D1213.
- [132] Leeson, P., (2012). "Drug discovery: Chemical beauty contest", *Nature*, 481: 455-456.
- [133] Schrödinger Release 2017-1: LigPrep, S., LLC, New York, NY, 2009.

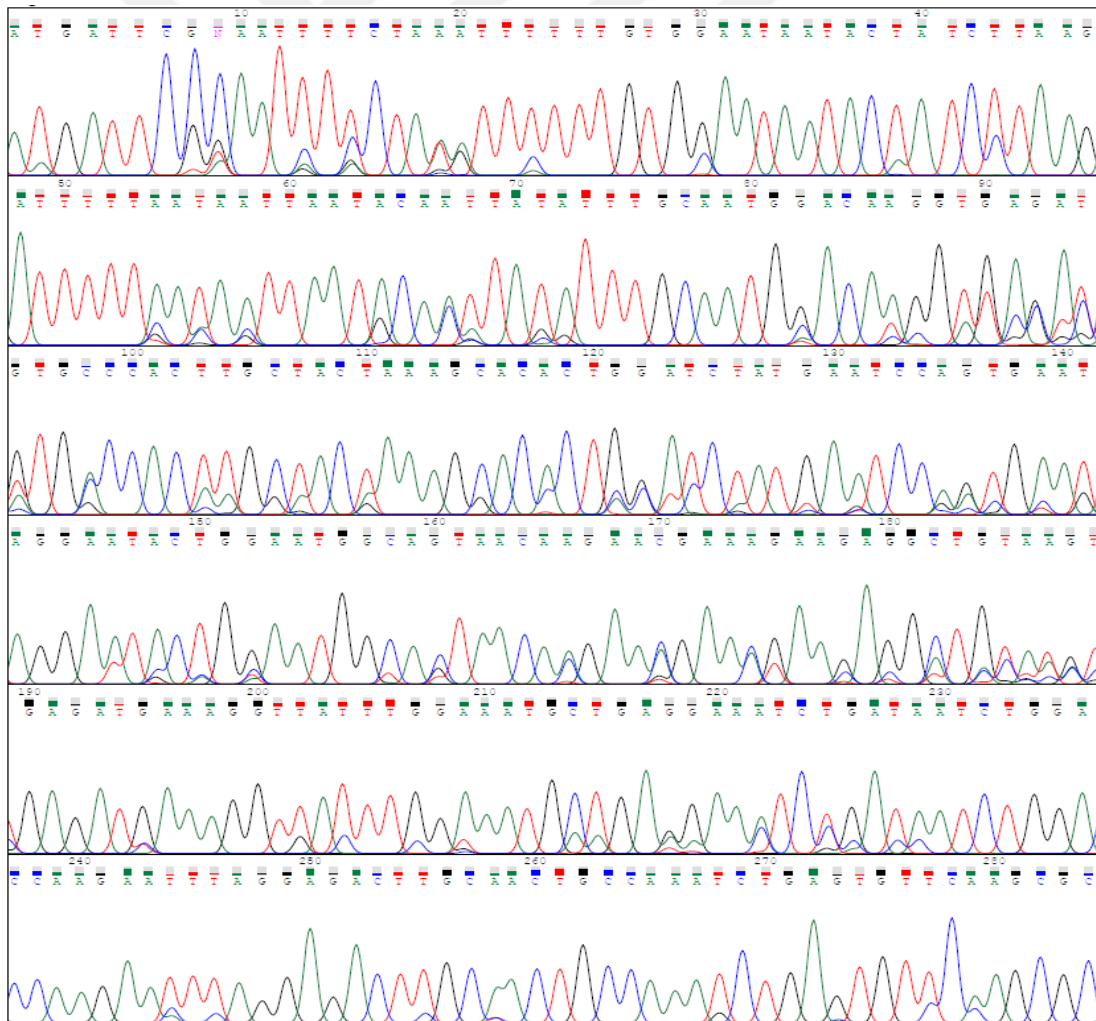
- [134] Harder, E. Damm, W. Maple, J. Wu, C. Reboul, M. Xiang, J.Y. Wang, L. Lupyan, D. Dahlgren, M.K. ve Knight, J.L., (2016). "OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins", *J. Chem. Theory Comput*, 12: 281-296.
- [135] Schrödinger Release 2017-1: Glide, S., LLC, New York, NY, 2009.
- [136] Sastry, G.M. Adzhigirey, M. Day, T. Annabhimoju, R. ve Sherman, W., (2013). "Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments", *Journal of computer-aided molecular design*, 27: 221-234.
- [137] Schrödinger Release 2017-1: Prime, S., LLC, New York, NY, 2009., ed^eds.
- [138] Genheden, S. ve Ryde, U., (2015). "The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities", *Expert opinion on drug discovery*, 10: 449-461.
- [139] Maier, J.A. Martinez, C. Kasavajhala, K. Wickstrom, L. Hauser, K.E. ve Simmerling, C., (2015). "ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB", *Journal of chemical theory and computation*, 11: 3696.
- [140] Mark, P. ve Nilsson, L., (2001). "Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K", *J. Phys. Chem. A*, 105: 9954-9960.
- [141] Davidchack, R.L. Handel, R. ve Tretyakov, M., (2009). "Langevin thermostat for rigid body dynamics", *The Journal of chemical physics*, 130: 234101.
- [142] Ryckaert, J.-P. Ciccotti, G. ve Berendsen, H.J., (1977). "Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes", *Journal of Computational Physics*, 23: 327-341.
- [143] Jakalian, A. Jack, D.B. ve Bayly, C.I., (2002). "Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation", *Journal of computational chemistry*, 23: 1623-1641.
- [144] Sprenger, K. Jaeger, V.W. ve Pfaendtner, J., (2015). "The general AMBER force field (GAFF) can accurately predict thermodynamic and transport properties of many ionic liquids", *The Journal of Physical Chemistry B*, 119: 5882-5895.
- [145] Carugo, O. ve Pongor, S., (2001). "A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures", *Protein science*, 10: 1470-1473.
- [146] Ramachandran, G.N. Ramakrishnan, C. ve Sasisekharan, V., (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations", *Journal of molecular biology*, 7: 95-99.
- [147] Mahgoub, E.O. ve Bolad, A., (2013). "Correctness and accuracy of template-based modeled single chain fragment variable (scFv) protein anti-breast cancer cell line (MCF-7)", *Open Journal of Genetics*, 3: 183.

- [148] Knapp, B. Frantal, S. Cibena, M. Schreiner, W. ve Bauer, P., (2011). "Is an intuitive convergence definition of molecular dynamics simulations solely based on the root mean square deviation possible?", *Journal of Computational Biology*, 18: 997-1005.
- [149] Yuan, S. Chan, H.S. Filipek, S. ve Vogel, H., (2016). "PyMOL and Inkscape bridge the data and the data visualization", *Structure*, 24: 2041-2042.
- [150] Laoui, A. ve Polyakov, V.R., (2011). "Web services as applications' integration tool: QikProp case study", *Journal of computational chemistry*, 32: 1944-1951.

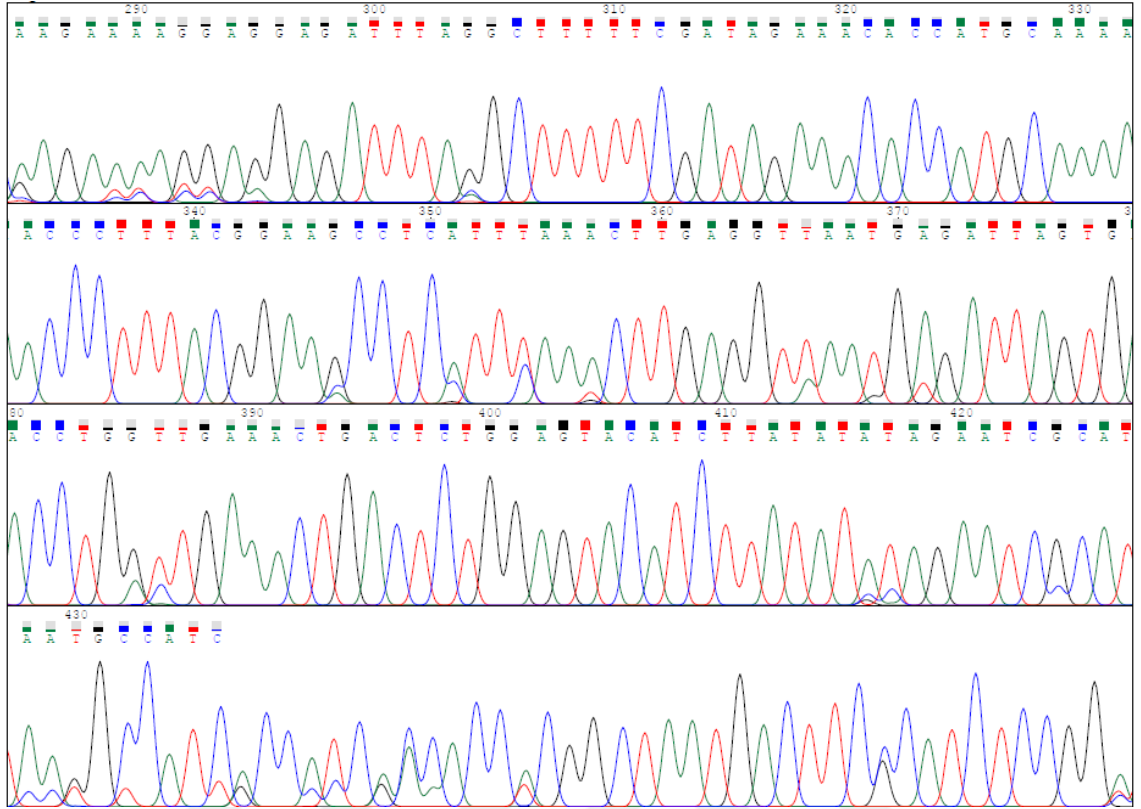


DİZİLEME KROMATOGRAMI

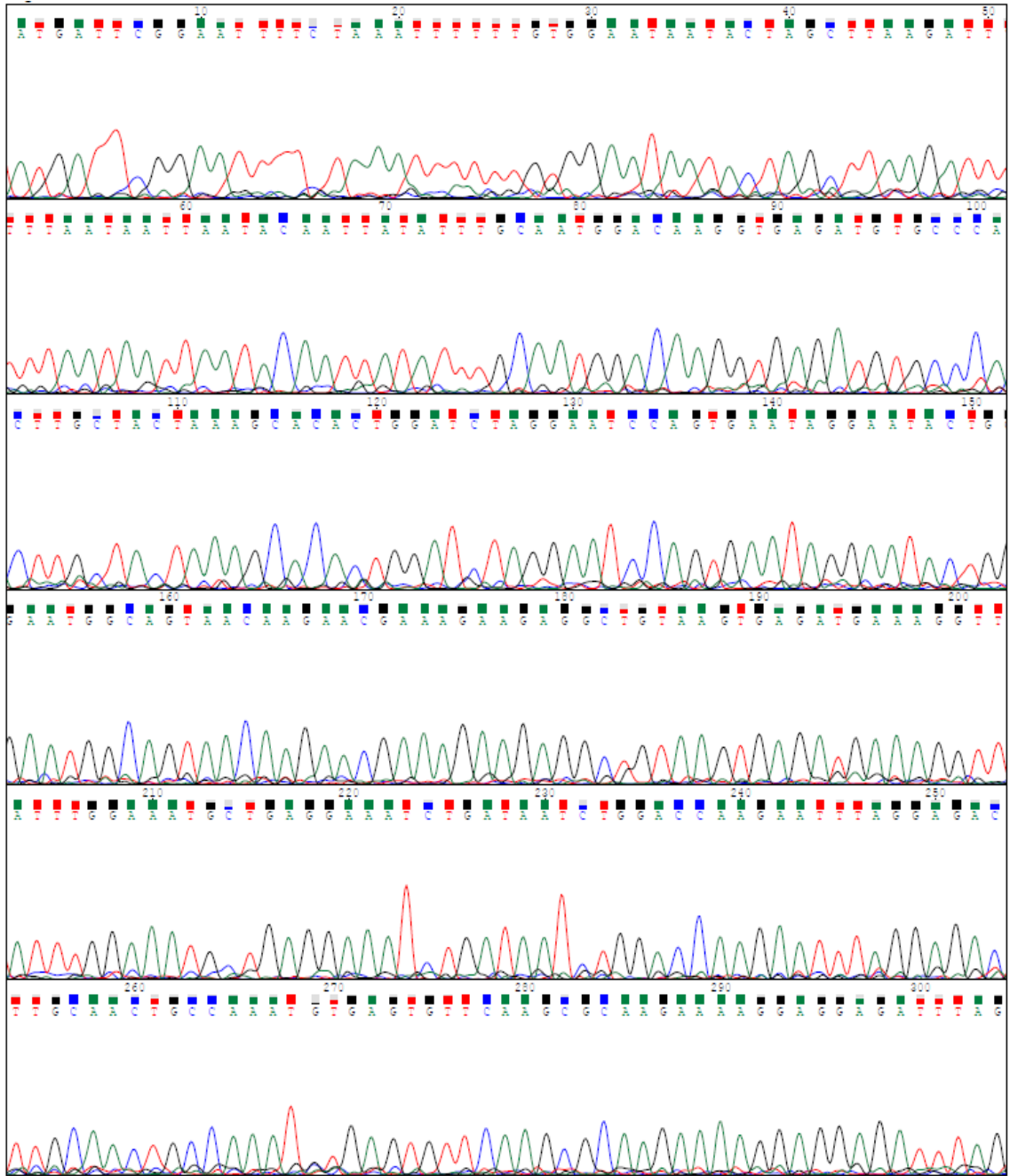
Çizelge A.1 LIC 5' primerler ile dizileme sonucu elde edilen kromatogram.



Çizelge A.1 LIC 5' primerler ile dizileme sonucu elde edilen kromatogram
(devam).

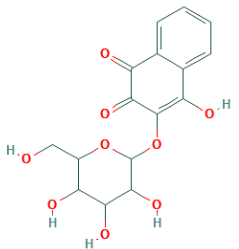
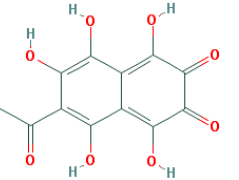
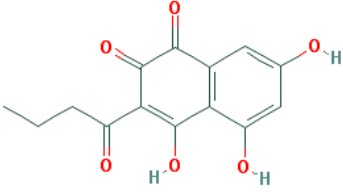
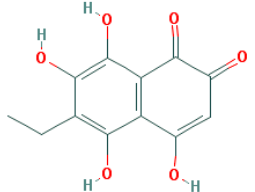


Çizelge A.2 LIC 3' primerle ile dizileme sonucu elde edilen kromatogram.



LİGANDLARIN İKİ BOYUTLU YAPILARI

Çizelge B.1 Naftakinon türevlerini içeren bileşik kütüphanesinin mutant *TaPIN1*'e karşı *in silico* taranması sonucu belirlenen 10 tane ligandın ve buparvaquone'nun iki boyutlu yapıları.

PubChem ID	Bileşik adı	İki Boyutlu Yapıları
5304752	4-hydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]oxynaphthalene-1,2-dione	
9993782	6-acetyl-1,4,5,7,8-pentahydroxynaphthalene-2,3-dione	
23247376	3-butanoyl-4,5,7-trihydroxynaphthalene-1,2-dione	
15531414	6-ethyl-4,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	

Çizelge B.1 Naftakinon türevlerini içeren bileşik kütüphanesinin mutant *TaPIN1*'e karşı *in silico* taranması sonucu belirlenen 10 tane ligandın ve buparvaquone'nun iki boyutlu yapıları (devam).

PubChem ID	Bileşik adı	İki Boyutlu Yapıları
619522	6-ethyl-1,4,5,7-tetrahydroxynaphthalene-2,3-dione	
5364026	3,6-diacetyl-4,5,7,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	
12442938	7-acetyl-1,5,6,8-tetrahydroxynaphthalene-2,3-dione	
102237415	2-(2-acetyl-3-hydroxycyclohex-2-en-1-yl)-8-hydroxynaphthalene-1,4-dione	
12009390	4,5,6,8-tetrahydroxynaphthalene-1,2-dione	
12313086	4,5,6,7,8-pentahydroxy-3-methoxynaphthalene-1,2-dione	
71768	Buparvaquone	

ÖNCÜ LİGANDLARIN ADME DEĞERLERİ

Schrödinger QikProp v5.1 [150] programı kullanılarak 5304752 ve 9993782 PubChem numaralı öncü ligandların ADME (absorbsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım) özellikleri belirlenmiştir.

5304752 ligandı için ADME değerleri:

Primary Metabolites & Reactive FGs:

- > Metabolism likely: secondary alcohol -> ketone
- > Metabolism likely: secondary alcohol -> ketone
- > Metabolism likely: secondary alcohol -> ketone
- > Metabolism likely: primary alcohol -> acid
- > Metabolism likely: aromatic OH oxidation
- > Reactive FG: acetal or analog

Principal Descriptors:

(Range 95% of Drugs)

Solute	Molecular Weight	=	352.297 (130.0 / 725.0)
Solute	Dipole Moment (D)	=	7.443 (1.0 / 12.5)
Solute	Total SASA	=	544.642 (300.0 /1000.0)
Solute	Hydrophobic SASA	=	112.729 (0.0 / 750.0)
Solute	Hydrophilic SASA	=	263.604 (7.0 / 330.0)
Solute	Carbon Pi SASA	=	168.309 (0.0 / 450.0)
Solute	Weakly Polar SASA	=	0.000 (0.0 / 175.0)
Solute	Molecular Volume (A^3)	=	975.056 (500.0 /2000.0)

Solute vdW Polar SA (PSA) = 177.327 (7.0 / 200.0)
 Solute No. of Rotatable Bonds = 8.000 (0.0 / 15.0)
 Solute as Donor - Hydrogen Bonds = 5.000 (0.0 / 6.0)
 Solute as Acceptor - Hydrogen Bonds = 14.000 (2.0 / 20.0)
 Solute Globularity (Sphere = 1) = 0.873 (0.75 / 0.95)
 Solute Ionization Potential (eV) = 9.592 (7.9 / 10.5)
 Solute Electron Affinity (eV) = 1.784 (-0.9 / 1.7)*

Predictions for Properties:

QP Polarizability (Angstroms^3) = 29.338M (13.0 / 70.0)
 QP log P for hexadecane/gas = 11.532M (4.0 / 18.0)
 QP log P for octanol/gas = 25.580M (8.0 / 35.0)
 QP log P for water/gas = 23.316M (4.0 / 45.0)
 QP log P for octanol/water = -1.739 (-2.0 / 6.5)
 QP log S for aqueous solubility = -1.643 (-6.5 / 0.5)
 QP log S - conformation independent = -1.846 (-6.5 / 0.5)
 QP log K_{hsa} Serum Protein Binding = -1.067 (-1.5 / 1.5)
 QP log BB for brain/blood = -2.224 (-3.0 / 1.2)
 No. of Primary Metabolites = 5 (1.0 / 8.0)
 Predicted CNS Activity (-- to ++) = --
 HERG K⁺ Channel Blockage: log IC₅₀ = -4.388 (concern below -5)
 Apparent Caco-2 Permeability (nm/sec) = 31 (<25 poor, >500 great)
 Apparent MDCK Permeability (nm/sec) = 11 (<25 poor, >500 great)
 QP log K_p for skin permeability = -5.017 (K_p in cm/hr)
 J_m, max transdermal transport rate = 0.077 (micrograms/cm²-hr)
 Lipinski Rule of 5 Violations = 0 (maximum is 4)
 Jorgensen Rule of 3 Violations = 0 (maximum is 3)
 % Human Oral Absorption in GI (+20%) = 44 (<25% is poor)
 Qual. Model for Human Oral Absorption = Medium (>80% is high)

A * indicates a violation of the 95% range. # stars = 1

An M indicates MW is outside training range.

5 of 1712 molecules most similar to 5304752:

Name	Similarity(%)
Taltirelin	75.90
Valganciclovir	71.93
Terizidone	69.66
Valaciclovir	69.54
Azacididine	69.37

QP Breakdown (< for descriptor over training max)

log Po/w		-log S	
H-bond Donor	-1.500	H-bond Donor	-2.008
H-bond Acceptor	-6.818	H-bond Acceptor	-7.330
Volume	6.361	SASA	10.321
Ac x Dn ^{0.5} /SASA	2.550	Ac x Dn ^{0.5} /SASA	5.746
FISA	-1.824	Rotor Bonds	-1.302
Non-con amines	0.000	N Protonation	0.000
Non-con amides	0.000	Non-con amides	0.000
WPSA & PISA	0.197	WPSA	0.000
Constant	-0.705	Constant	-3.783
Total	-1.739	Total	1.643

log BB		log PMDCK	
Hydrophilic SASA	-2.305	Hydrophilic SASA	-2.702
WPSA	0.000	WPSA	0.000
Rotor Bonds	-0.482		0.000
N Protonation	0.000	Non-con amines	0.000
FOSA	0.000	COOH/SO ₃ H acids	0.000
Constant	0.564	Constant	3.771
Total	-2.224	Total	1.069

9993782 ligandı için ADME değerleri:

Primary Metabolites & Reactive FGs:

- > Metabolism likely: aromatic OH oxidation
- > Metabolism likely: aromatic OH oxidation
- > Metabolism likely: aromatic OH oxidation
- > Metabolism likely: aromatic OH oxidation
- > Metabolism likely: aromatic OH oxidation
- > Reactive FG: acceptor carbonyl or derivative
- > Reactive FG: acceptor carbonyl or derivative

Principal Descriptors:

(Range 95% of Drugs)

Solute	Molecular Weight	=	280.190 (130.0 / 725.0)
Solute	Dipole Moment (D)	=	2.954 (1.0 / 12.5)
Solute	Total SASA	=	454.843 (300.0 / 1000.0)
Solute	Hydrophobic SASA	=	79.147 (0.0 / 750.0)
Solute	Hydrophilic SASA	=	326.976 (7.0 / 330.0)
Solute	Carbon Pi SASA	=	48.719 (0.0 / 450.0)
Solute	Weakly Polar SASA	=	0.000 (0.0 / 175.0)
Solute	Molecular Volume (A^3)	=	764.801 (500.0 / 2000.0)
Solute	vdW Polar SA (PSA)	=	175.796 (7.0 / 200.0)
Solute	No. of Rotatable Bonds	=	6.000 (0.0 / 15.0)
Solute as Donor -	Hydrogen Bonds	=	3.000 (0.0 / 6.0)
Solute as Acceptor -	Hydrogen Bonds	=	7.750 (2.0 / 20.0)
Solute Globularity (Sphere = 1)		=	0.889 (0.75 / 0.95)

Solute Ionization Potential (eV) = 8.005 (7.9 / 10.5)

Solute Electron Affinity (eV) = 2.265 (-0.9 / 1.7)*

Predictions for Properties:

QP Polarizability (Angstroms³) = 21.066M (13.0 / 70.0)

QP log P for hexadecane/gas = 8.723M (4.0 / 18.0)

QP log P for octanol/gas = 15.959M (8.0 / 35.0)

QP log P for water/gas = 14.073M (4.0 / 45.0)

QP log P for octanol/water = -1.286 (-2.0 / 6.5)

QP log S for aqueous solubility = -1.547 (-6.5 / 0.5)

QP log S - conformation independent = -2.585 (-6.5 / 0.5)

QP log K_{hsa} Serum Protein Binding = -0.764 (-1.5 / 1.5)

QP log BB for brain/blood = -2.555 (-3.0 / 1.2)

No. of Primary Metabolites = 5 (1.0 / 8.0)

Predicted CNS Activity (-- to ++) = --

HERG K⁺ Channel Blockage: log IC₅₀ = -3.557 (concern below -5)

Apparent Caco-2 Permeability (nm/sec) = 7 (<25 poor, >500 great)

Apparent MDCK Permeability (nm/sec) = 2 (<25 poor, >500 great)

QP log K_p for skin permeability = -6.798 (K_p in cm/hr)

J_m, max transdermal transport rate = 0.001 (micrograms/cm²-hr)

Lipinski Rule of 5 Violations = 0 (maximum is 4)

Jorgensen Rule of 3 Violations = 1 (maximum is 3)

% Human Oral Absorption in GI (+20%) = 35 (<25% is poor)

Qual. Model for Human Oral Absorption = Medium (>80% is high)

A * indicates a violation of the 95% range. # stars = 1

An M indicates MW is outside training range.

5 of 1712 molecules most similar to 9993782:

Name	Similarity(%)
Sulfadoxine	83.91
Sulfalene	83.45
Sulfamonomethoxine	81.75
Sulfameter	81.66
Adrafinil	80.80

QP Breakdown (< for descriptor over training max)

log Po/w		-log S	
H-bond Donor	-0.900	H-bond Donor	-1.205
H-bond Acceptor	-3.774	H-bond Acceptor	-4.058
Volume	4.990	SASA	8.619
Ac x Dn ^{.5} /SASA	1.309	Ac x Dn ^{.5} /SASA	2.950
FISA	-2.263	Rotor Bonds	-0.977
Non-con amines	0.000	N Protonation	0.000
Non-con amides	0.000	Non-con amides	0.000
WPSA & PISA	0.057	WPSA	0.000
Constant	-0.705	Constant	-3.783
Total	-1.286	Total	1.547

log BB		log PMDCK	
Hydrophilic SASA	-2.757<	Hydrophilic SASA	-3.352<
WPSA	0.000	WPSA	0.000
Rotor Bonds	-0.362		0.000

N Protonation	0.000	Non-con amines	0.000
FOSA	0.000	COOH/SO3H acids	0.000
Constant	0.564	Constant	3.771
Total	-2.555	Total	0.419



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Sezen SPAHİ
Doğum Tarihi ve Yeri :10.03.1992
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :sezenspahi@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lise	Fen Lisesi	Gjon Buzuku	2010

YAYINLAR

Bildiri

1. “Cloning of Peptidyl Prolyl *cis/trans* Isomerase from *Theileria annulata*” IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, Istanbul, Türkiye, 26-29 April 2017.
2. “*In silico* Analyses of both Wild Type and Mutant *TaPIN1* towards New Drug Discovery” 5th International BAU Drug Design Congress, Istanbul, Türkiye, 19-21 October 2017.