

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***THEILERIA ANNULATA* LAKTAT  
DEHİDROGENAZININ *IN VITRO* VE *IN SILICO*  
ANALİZLER İLE İNHİBİSYONUNUN SAĞLANMASI**

**Selcan AKAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Dilek BALIK

Ocak, 2024

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**THEILERIA ANNULATA LAKTAT DEHİDROGENAZININ  
IN VITRO VE IN SILICO ANALİZLER İLE  
İNİBİSYONUNUN SAĞLANMASI**

Selcan AKAR tarafından hazırlanan tez çalışması 15.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Dilek BALIK  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Dilek BALIK, Danışman  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sezen CANIM ATEŞ, Üye  
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

---

---

---

Danışmanım Prof. Dr. Dilek BALIK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enziminin *in vitro* ve *in silico* Analizler ile İnhibisyonunun Sağlanması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Selcan AKAR

İmza



Bu çalışma, “...Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün 5501” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

*Aileme  
ve  
arkadaşlarım*



## TEŞEKKÜR

---

Çalışma sürecinde bilgi, deneyim ve tecrübesiyle bana yol gösteren, karşılaştığım tüm sorunları ilgi ve sabırla dinleyip çözümler üreten, tez çalışmalarını dışında her konuda değerli önerilerini ve desteğini benimle paylaşan kendisinden çok şey öğrendiğim, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olduğum için her zaman gurur duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Dilek BALIK'a,

Tez çalışmamın yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne,

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

Tez çalışmalarım sırasında kullanılan ilaç bileşiklerini temin eden Deva Holding'e,

Tez çalışmamın *in silico* bölümünde çok değerli katkılar sağlayan, bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Özal MUTLU'ya,

Tez çalışmalarımda bilgi ve deneyimi ile bana her türlü desteği sağlayan, kendisine danıştığım tüm zamanlarda ilgiyle ve sabırla çözümler üreten değerli hocam Prof. Dr. Özkan DANIŞ'a,

Tez çalışmamın birçok aşamasında katkılar sağlayarak desteklerini ve değerli önerilerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Osman Mutluhan UĞUREL, Erennur UĞUREL ve Tuğba Gül İNCİ'ye,

Tez çalışmalarım boyunca destek ve yardımlarını esirgemediği sağlayan, bilgi birikimi ve fikirleriyle bu süreçte hep yanımda olan, tez çalışmalarını dışında her konuda sonsuz destek veren, içten ve samimi tavırlarıyla örnek olan, değerli arkadaşım Maria ORLENCO'ya,

Tez çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanması sürecinde kıymetli fikir ve tecrübelerini benimle paylaşan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım sevgili Emre Can

YILDIZ, Mustafa Necati HAŐIMOĐLU, Abdullah Enes DOĐRUSOY ve Tuğba CAN'a,

Hayatım boyunca aldığım her kararda beni desteklemekten bir an bile vazgeçmeyen, maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek yanımda olan sevgili anneme ve kıymetli aileme,

Tez çalışmam süresince yanımda olup desteklerini esirgemeyen, sevgili arkadaşlarım Beyza KARACAOĐLU, Gülcan Ayşin KARACA ve Hilal ÇALIK'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde eğitimini sürdüren diğer yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Selcan AKAR



# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xiv</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xviii</b>
<b>1 GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti . . . . .	1
1.2 Tezin Amacı . . . . .	2
<b>2 GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1 İklim Değişikliği ve Kene Kaynaklı Hastalıklar . . . . .	3
2.2 <i>Theileria annulata</i> . . . . .	8
2.3 <i>Theileria annulata</i> 'nın Enerji Metabolizması ve İlaç Hedefi olarak <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenazı . . . . .	13
2.4 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı . . . . .	17
<b>3 MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>22</b>
3.1 Materyal . . . . .	22
3.2 Yöntem . . . . .	27
<b>4 BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	<b>37</b>
4.1 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz'ını Kodlayan Genin İfadesi ve Enzimin Saflaştırılması . . . . .	37
4.2 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz'ının Homoloji Modellemesi ve Optimizasyonu . . . . .	40
4.3 <i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz'ının Moleküler Yanaştırma Çalışmaları ve Moleküler Dinamik Simülasyonu . . . . .	49
<b>5 SONUÇ</b>	<b>71</b>
5.1 Sonuçlar . . . . .	71
5.2 Öneriler . . . . .	73
<b>KAYNAKÇA</b>	<b>74</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>	<b>86</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

$\alpha$	Alfa
A	Absorbans
Å	Ångström
$\beta$	Beta
°C	Santigrat
kDa	Kilodalton
$\Delta$	Delta
l	Litre
m	Metre
ml	Mililitre
$\mu$ M	Mikromolar
M	Molar
Mw	Moleküler ağırlık
ns	Nano saniye
$\phi$	Phi
$\psi$	Psi
TaLDH	<i>Theileria annulata</i> Laktat Dehidrogenaz
3B	Üç boyutlu

## KISALTMA LİSTESİ

---

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALA	Alanin
ARG	Arjinin
Ar-Ge	Araştırma ve Geliştirme
ASN	Asparajin
ATP	Adenozin trifosfat
CDPK3	Kalsiyum bağımlı protein kinaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
FDA	Food and Drug Administration
GLN	Glutamin
GLY	Glisin
HIS	Histidin
HTS	Yüksek verimli tarama
HTSV	Yüksek verimli sanal tarama
ILE	İzolösin
IPCC	Birleşmiş Milletler Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli
IPTG	İzopropil- $\beta$ -D-tiyogalaktopiranozit
LB	Luria Bertani
LDH	Laktat dehidrogenaz
LEU	Lösin
LYS	Lizin
MDH	Malat dehidrogenaz
NaCl	Sodyum klorür
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
OD	Optik Densite
PDB	Protein Data Bank
ProSa	Protein Yapı Analizi

RMSD	Ortalama karekök sapması
SER	Serin
<i>T. annulata</i>	<i>Theileria annulata</i>
<i>T. parva</i>	<i>Theileria parva</i>
THR	Treonin
TRP	Triptofan



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1</b>	İklimsel değişikliklere bağlı kene popülasyonu değişimi, KKH: Kene kaynaklı hastalıklar [15] . . . . .	4
<b>Şekil 2.2</b>	İklimsel değişikliklerin kene kaynaklı hastalıklara etkisi [20] . . .	4
<b>Şekil 2.3</b>	<i>Theileria annulata</i> taşıyıcı vektör kenelerin dünya çapında dağılımı [36] . . . . .	7
<b>Şekil 2.4</b>	<i>Theileria</i> parazitinin yaşam döngüsü [49] . . . . .	11
<b>Şekil 2.5</b>	LDH katalitik mekanizması [82] . . . . .	15
<b>Şekil 2.6</b>	LDH aktif bölgesinde gerçekleşen reaksiyon mekanizması [87] . .	16
<b>Şekil 3.1</b>	GenColor prestained protein marker . . . . .	22
<b>Şekil 3.2</b>	Homoloji modelleme basamakları [123] . . . . .	33
<b>Şekil 3.3</b>	Genel moleküler yanıştırma basamakları [105] . . . . .	35
<b>Şekil 4.1</b>	İfade edilen <i>Ta</i> LDH'in saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel elektroforez analizi sonucu; a) Hat M: protein ladder marker; Hat 1 ve 2: hücre içeren süpernatant; ve pellet; Hat 3 :ilk süzüntü; Hat 4, 5 ve 6: yıkama 1, yıkama 2, yıkama 3 örnekleri; b) Hat M: protein ladder marker; Hat 1,2,3,4,5,6,7,8: elüsyon fraksiyonları; Hat 9: ilk süzüntü . . . . .	37
<b>Şekil 4.2</b>	<i>Ta</i> LDH'in +4°C'de, belirli aralıklarla ölçülen ortalama enzim aktiviteleri. E1-EG: Etilen glikol eklenmiş enzim çözeltisi, E2-S: Sükroz eklenmiş enzim çözeltisi . . . . .	39
<b>Şekil 4.3</b>	<i>Ta</i> LDH ve kristalografik olarak 3B yapısı bilinen PDB'de bulunun proteinleri hizalanması sonucu benzerlik oranları . . . .	42
<b>Şekil 4.4</b>	<i>Ta</i> LDH-7W8A homoloji modeli . . . . .	43
<b>Şekil 4.5</b>	<i>Ta</i> LDH-AlphaFold homoloji modeli . . . . .	45
<b>Şekil 4.6</b>	<i>Ta</i> LDH-1U5C homoloji modeli, NAD (pembe) . . . . .	47
<b>Şekil 4.7</b>	<i>Ta</i> LDH homoloji modellerinin süperimpozisyonu: <i>Ta</i> LDH-7W8A mavi; <i>Ta</i> LDH-AlphaFold yeşil; <i>Ta</i> LDH-1U5C-NAD kompleksi; <i>Ta</i> LDH-1U5C pembe, NAD turuncu . . . . .	49
<b>Şekil 4.8</b>	Moleküler dinamik simülasyonu analizleri sonrası MM/GBSA $\Delta G$ bağlanma enerji-Zaman(ns) grafiği . . . . .	50
<b>Şekil 4.9</b>	Seçili ligandlar (6108426, 1580464, 278572, 256622) ve <i>Ta</i> LDH-7W8A kompleksinin 100 ns simülasyonu sonucu <i>Ta</i> LDH-7W8A'nın RMSD-Zaman grafiği . . . . .	51
<b>Şekil 4.10</b>	1580464 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-7W8A) RMSD kırmızı, ligand (1580464) RMSD lacivert	52
<b>Şekil 4.11</b>	1580464 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A'nın a) moleküler yanıştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri .	52

<b>Şekil 4.12</b>	278572 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-7W8A) RMSD kırmızı, ligand (278572) RMSD lacivert . . . . .	53
<b>Şekil 4.13</b>	278572 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A'nın a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	53
<b>Şekil 4.14</b>	6108426 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-7W8A) RMSD kırmızı, ligand (6108426) RMSD lacivert . . . . .	54
<b>Şekil 4.15</b>	6108426 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A'nın a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	54
<b>Şekil 4.16</b>	256622 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-7W8A) RMSD kırmızı, ligand (256622) RMSD lacivert . . . . .	55
<b>Şekil 4.17</b>	256622 ve <i>Ta</i> LDH-7W8A'nın a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	56
<b>Şekil 4.18</b>	Seçili ligandlar (376197, 6474897, 2302060, 13506406, 282787, 16196969, 445579, 12004532, 2962711) ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold kompleksinin 100 ns simülasyonu sonucu <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'ın RMSD-Zaman grafiği . . . . .	56
<b>Şekil 4.19</b>	376197 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (376197) RMSD lacivert . . . . .	58
<b>Şekil 4.20</b>	376197 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	58
<b>Şekil 4.21</b>	6474897 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (6474897) RMSD lacivert . . . . .	59
<b>Şekil 4.22</b>	6474897 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	59
<b>Şekil 4.23</b>	2302060 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (2302060) RMSD lacivert . . . . .	60
<b>Şekil 4.24</b>	2302060 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	60
<b>Şekil 4.25</b>	13506406 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (13506406) RMSD lacivert . . . . .	61
<b>Şekil 4.26</b>	13506406 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	61
<b>Şekil 4.27</b>	282787 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (282787) RMSD lacivert . . . . .	62
<b>Şekil 4.28</b>	282787 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	62

<b>Şekil 4.29</b>	16196969 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (16196969) RMSD lacivert . . . . .	<b>63</b>
<b>Şekil 4.30</b>	16196969 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	<b>63</b>
<b>Şekil 4.31</b>	445579 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (445579) RMSD lacivert . . . . .	<b>64</b>
<b>Şekil 4.32</b>	445579 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	<b>64</b>
<b>Şekil 4.33</b>	12004532 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (12004532) RMSD lacivert . . . . .	<b>65</b>
<b>Şekil 4.34</b>	12004532 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	<b>65</b>
<b>Şekil 4.35</b>	2962711 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (2962711) RMSD lacivert . . . . .	<b>66</b>
<b>Şekil 4.36</b>	2962711 ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	<b>67</b>
<b>Şekil 4.37</b>	92181 ve <i>Ta</i> LDH-1U5C RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-1U5C) RMSD kırmızı, ligand (92181) RMSD lacivert . . . . .	<b>68</b>
<b>Şekil 4.38</b>	92181 ve <i>Ta</i> LDH-1U5C'nin a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	<b>69</b>
<b>Şekil 4.39</b>	Buparvaquone ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein $\alpha$ ( <i>Ta</i> LDH-AlphaFold) RMSD lacivert, ligand (buparvaquone) RMSD kırmızı . . . . .	<b>69</b>
<b>Şekil 4.40</b>	Buparvaquone ve <i>Ta</i> LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri . . . . .	<b>70</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1</b>	LB sıvı besiyeri . . . . .	23
<b>Tablo 3.2</b>	LB agar . . . . .	23
<b>Tablo 3.3</b>	SDS-PAGE elektroforez jelleri . . . . .	24
<b>Tablo 3.4</b>	SDS-PAGE örnek uygulama tamponu . . . . .	24
<b>Tablo 3.5</b>	5X SDS-PAGE tank tampon stok solüsyon . . . . .	24
<b>Tablo 3.6</b>	Lizis tamponu . . . . .	25
<b>Tablo 3.7</b>	Dengeleyici tamponu . . . . .	25
<b>Tablo 3.8</b>	Yıkama tamponu . . . . .	26
<b>Tablo 3.9</b>	Elüsyon tamponu . . . . .	26
<b>Tablo 3.10</b>	Cihaz listesi . . . . .	26
<b>Tablo 3.11</b>	FDA onaylı ilaç etken bileşikleri ve formülleri . . . . .	30
<b>Tablo 4.1</b>	+4°C’de, belirli aralıklarla ölçülen ortalama enzim aktiviteleri . . . . .	39
<b>Tablo 4.2</b>	Bileşiklerin 100 µM konsantrasyonda %enzim inhibisyon değerleri ve standart hataları . . . . .	40
<b>Tablo 4.3</b>	<i>Ta</i> LDH-7W8A modelinin validasyon skorları; TEB:tercih edilen bölge, EİVB: ek izin verilen bölge, GİVB: genel izin verilen bölge, İVB: izin verilmeyen bölge . . . . .	42
<b>Tablo 4.4</b>	<i>Ta</i> LDH-7W8A modelinin ERRAT program çıktısı . . . . .	43
<b>Tablo 4.5</b>	<i>Ta</i> LDH-7W8A modelinin ProSa program çıktısı . . . . .	43
<b>Tablo 4.6</b>	<i>Ta</i> LDH-7W8A modeline ait Ramachandran grafiği . . . . .	44
<b>Tablo 4.7</b>	<i>Ta</i> LDH-AlphaFold modelinin validasyon skorları; TEB:tercih edilen bölge, EİVB: ek izin verilen bölge, GİVB: genel izin verilen bölge, İVB: izin verilmeyen bölge . . . . .	44
<b>Tablo 4.8</b>	<i>Ta</i> LDH-AlphaFold modelinin ERRAT program çıktısı . . . . .	45
<b>Tablo 4.9</b>	<i>Ta</i> LDH-AlphaFold modelinin ve ProSa program çıktısı . . . . .	45
<b>Tablo 4.10</b>	<i>Ta</i> LDH-AlphaFold modelinin Ramachandran grafiği . . . . .	46
<b>Tablo 4.11</b>	<i>Ta</i> LDH-1U5C modelinin validasyon skorları; TEB:tercih edilen bölge, EİVB: ek izin verilen bölge, GİVB: genel izin verilen bölge, İVB: izin verilmeyen bölge . . . . .	47
<b>Tablo 4.12</b>	<i>Ta</i> LDH-1U5C modelinin ERRAT program çıktısı . . . . .	47
<b>Tablo 4.13</b>	<i>Ta</i> LDH-1U5C modelinin ve ProSa program çıktısı . . . . .	48
<b>Tablo 4.14</b>	<i>Ta</i> LDH-1U5C modelinin Ramachandran grafiği . . . . .	48
<b>Tablo 4.15</b>	<i>Ta</i> LDH-7W8A modeli için belirlenen bileşiklerin moleküler yanıştırma sonucunda XP-Gscore ve XP-Hidrojen bağı değerleri ve Moleküler dinamik simülasyonunun ardından hesaplanmış $\Delta G$ bağlanma enerjisi değerleri . . . . .	51
<b>Tablo 4.16</b>	<i>Ta</i> LDH-AlphaFold modeli için belirlenen bileşiklerin moleküler yanıştırma sonucunda XP-Gscore ve XP-Hidrojen bağı değerleri ve Moleküler dinamik simülasyonunun ardından hesaplanmış $\Delta G$ bağlanma enerjisi değerleri . . . . .	57

<b>Tablo 4.17</b> <i>Ta</i> LDH-1U5C modeli için belirlenen bileşiklerin moleküler yanıştırma sonucunda XP-Gscore ve XP-Hidrojen bağı değerleri ve Moleküler dinamik simülasyonunun ardından hesaplanmış $\Delta G$ bağlanma enerjisi değerleri . . . . .	<b>68</b>
---	-----------



# ***Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz Enziminin *in vitro* ve *in silico* Analizler ile İnhibisyonunun Sağlanması**

Selcan AKAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Dilek BALIK

Keneler yaşam döngülerinin doğası gereği iklime duyarlıdır. Kene kaynaklı hastalıklar iklimsel değişikliklerden yüksek oranda etkilenecek hastalıklar arasında bulunmaktadır. *Theileria* parazitleri farklı kene türleri aracılığıyla yayılmakta ve iklim koşulları parazitlerin coğrafi dağılımında belirleyici rol oynamaktadır. Tropikal theileriosis'e neden olan *T. annulata* besicilik sektöründe büyük ekonomik kayıplara ve üretimsel verimin düşmesine neden olmaktadır. *T. annulata*'nın tedavi amaçlı kullanılan buparvaquone'a karşı direnç geliştirdiği rapor edilmektedir. Bu nedenle, var olan etki mekanizmalarından farklı yeni bir ilaca olan ihtiyaç artmaktadır. Theileriosis tedavisinde yeni ilaç hedefi olarak *T. annulata* laktat dehidrogenaz belirlenmiştir. Tez kapsamında *in silico* ve *in vitro* çalışmalar eş zamanlı olarak yürütülerek, *Ta*LDH'ı inhibe edecek potansiyel bileşiklerin bulunması amaçlanmaktadır. İnhibisyon deneylerinde kullanılmak üzere *Ta*LDH'ın ifadesi ve %95 saflıkta eldesi sağlanmıştır. *Ta*LDH'ın stabilizasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve 24 saat sonrasında saf *Ta*LDH'a 1 M sükröz eklendiğinde aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Ta*LDH'ın bilinen bir

inhibitörü olmamasından dolayı 21 adet FDA onaylı ilaç etken maddeleri içeren bileşik kütüphanesinin saf *Ta*LDH üzerindeki %inhibisyon kapasiteleri test edilmiştir. Bu etken maddeler *Ta*LDH üzerinde literatürde ilk defa test edilmiş olup, *Ta*LDH aktivitesini %73,36 oranla inhibe eden ilaç etken maddenin Omeprazol olduğu belirlenmiştir. *In silico* çalışmaların ilk basamağında *Ta*LDH'ın açık, yarı açık ve AlphaFold olmak üzere üç adet homoloji modeli tasarlanmıştır. Modellenen üç yapının katalitik bölgelerine yaklaşık 650000 bileşiğin moleküler yanaştırması yapılmıştır. Moleküler yanaştırma sonucu 37 bileşiğin moleküler dinamik simülasyon analizleri 100 ns'de gerçekleştirilmiş olup MM/GBSA serbest bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Simülasyon sonucu en iyi 3 bileşiğin (2962711, 12004532, 256622) 100 ns'de katalitik bölgede kurdukları etkileşimler tespit edilmiştir. Yapıya dayalı ilaç tasarımı metotları kullanılarak belirlenen bileşikler literatürde ilk defa *Ta*LDH potansiyel inhibitör adayı olup, mevcut tedavi yöntemi olan buparvaquone'a direnci rapor edilen *T. annulata*'ya yönelik yeni ilaç arayışları için umut vaad etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Yapıya dayalı ilaç tasarımı, *Theileria annulata*, theileriosis, homoloji modelleme, moleküler dinamik simülasyon

# ABSTRACT

---

## Evaluation of Bacterial Enzymes for Drug Design

Selcan AKAR

Department of Bioengineering

Program of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Dilek BALIK

Ticks are sensitive to climate due to the nature of their life cycles. Tick-borne diseases are highly affected by climatic changes. *Theileria* parasites are spread by tick species and climatic conditions play a decisive role in the distribution of parasites. *T. annulata* causes tropical theileriosis in cattle and further leads to huge economic losses and decreased production efficiency in the livestock sector. *T. annulata* has developed resistance to Buparvaquone, which is used for treatment, hence the demand for a new drug that differs from the current mechanism of action is increasing. *T. annulata* lactate dehydrogenase has been identified as a new drug target. Within the scope of the thesis, *in silico* and *in vitro* studies are performed simultaneously to find potential compounds that will inhibit *Ta*LDH. The expression and 95% purity of *Ta*LDH were obtained for use in inhibition experiments. Stabilization analysis of *Ta*LDH was performed and it was determined that when 1 M sucrose was added to pure *Ta*LDH, it maintained its activity after 24 hours. Since no known inhibitor of *Ta*LDH exists, 21 FDA approved drug active ingredients were tested for their inhibition% capacity on pure *Ta*LDH. This compound library was tested on *Ta*LDH for the first time in the literature and it was determined that the drug active ingredient that inhibited *Ta*LDH activity

by 73.36% was Omeprazole. Three homology models of *Ta*LDH were designed. Molecular docking of approximately 650000 compounds to catalytic sites of models was performed. As a result of molecular docking, molecular dynamics simulation analyses of 37 compounds were performed in 100 ns, and MM/GBSA free binding energies were calculated. The best 3 compounds (2962711, 12004532, 256622) identified using structure-based drug design methods are the first *Ta*LDH potential inhibitor candidates in the literature. They are promising in the search for new drugs for *T. annulata* that develop resistance.

**Keywords:** Structure-based drug design, *Theileria annulata*, theileriosis, homology modeling, molecular dynamics simulation,



## 1.1 Literatür Özeti

Birleşmiş Milletler Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli (IPCC), vektör kaynaklı hastalıkları iklim değişikliğinden en çok etkilenecek hastalıklar olarak sınıflandırmıştır [1]. Küresel iklim değişikliği, artan sıcaklıklar, düzensiz yağışlar, yaygın kuraklık ve seller gibi faktörler vektör ekolojisini ve vektör kaynaklı hastalıkların insanlara ve hayvanlara bulaşmasını etkilemektedir [2]. Kene çeşitliliğinin ve taşıdıkları patojenlerin yaygınlığının, menziline ve aktivitesinin iklimle bağlantılı olarak değişim göstermesi beklenmektedir. Ayrıca, değişen hava koşulları, rezervuar konakların ve hayvan üremelerinin çeşitliliğinin de artmasına neden olmaktadır [3].

Apikompleksan tek hücreli, hücre içi gerekli protozoan organizmalardan oluşan büyük bir filumdur ve tümü parazitiktir. 6000'den fazla isimlendirilmiş ve muhtemelen bir milyondan fazla isimlendirilmemiş tür arasında, insanlarda ve hayvanlarda yılda milyonlarca canlıyı etkileyen ciddi hastalıklara neden oldukları için halk sağlığı ve ekonomik açıdan çok önemlidir [4, 5]. Sığırlarda kene kaynaklı tropikal theileriosis hastalığına neden olan *Theileria annulata* adlı protozoan parazit, dünya çapında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır [6].

Çiftlik hayvanları ve insanlarda protozoan parazitlerinin tedavisinde, buparvaquone ve atovaquone bileşiklerini içeren hidroksinaftokinon ilaçları kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, sitokrom b'ye bağlanarak parazitin mitokondriyal solunumu durdurmaktadır [7]. Zamanla buparvaquone tedavisine başarısız yanıt veren vakalar bildirilmiş, ve *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı direnç geliştirebileceği tahmin edilmiştir. Mhadhbi ve diğerleri, (2010) *in vivo* olarak *T. annulata* direncini doğrulamıştır [8]. Sonrasında *T. annulata*'nın sitokrom b genindeki ilaç bağlama bölgesinde buparvaquone'a dirençle ilgili nokta mutasyonları bildirilmiştir [9].

Kontrol mekanizmalarının yetersizliği ve tedavide meydana gelen başarısızlıklar *T.*

*annulata* kaynaklı theileriosis için var olanlardan farklı metabolik yolları hedefleyen yeni ilaç gereksinimini gündeme getirmektedir.

Tez kapsamında yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımları kullanılmıştır. Deneysel olarak belirlenmiş bir proteinin yapısının şablon olarak kullanıldığı ve homolog bir dizi ile %30 ve üzeri benzerlik oranına sahip dizilerin varlığında homoloji modelleri oluşturulmaktadır [10]. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı uygulamalarından moleküler yanaştırma ise ilk olarak 80'lerin ortasından 90'ların başına kadar bilinen aktif bileşiklerin bağlanma davranışını tahmin etmek, maliyetleri düşürmek ve ilaç keşfini hızlandırmak gibi amaçlarla büyük dijital bileşik kütüphanelerini sanal olarak taramak için geliştirilmiştir [11]. Moleküler dinamik (MD) simülasyonu, moleküler bir sistemin yapısal, dinamik ve termodinamik özellikleri hakkında daha fazla bilgi edinmeyi amaçlamaktadır [12]. Bu teknoloji sayesinde, çözücüdeki pH, sıcaklık ve basınç gibi değişen deneysel koşullara uygun sistemlerin modellenmesi mümkün hale getirilmiştir. Simüle edilen ortamın kontrol edilebilirliği, protein-ligand etkileşimleri hakkında bilgi vermektedir [13].

## 1.2 Tezin Amacı

İklim değişikliğine bağlı olarak kene ve kene kaynaklı hastalıkların yayılımı artmaktadır. Keneler tarafından sığırlara bulaştırılan theileriosisin mevcut tedavisinde buparvaquone kullanılmaktadır. *T. annulata*'nın zamanla ilaca direnç geliştirmesiyle, parazitin enerji metabolizmasında hayati öneme sahip laktat dehidrogenaz yeni ilaç hedefi olarak seçilmiştir. Bu tez kapsamında, eş zamanlı yürütülen *in vitro* ve *in silico* yapıya dayalı ilaç tasarımı yaklaşımları ile *T. annulata* laktat dehidrogenazını inhibe etmek amaçlanmıştır.

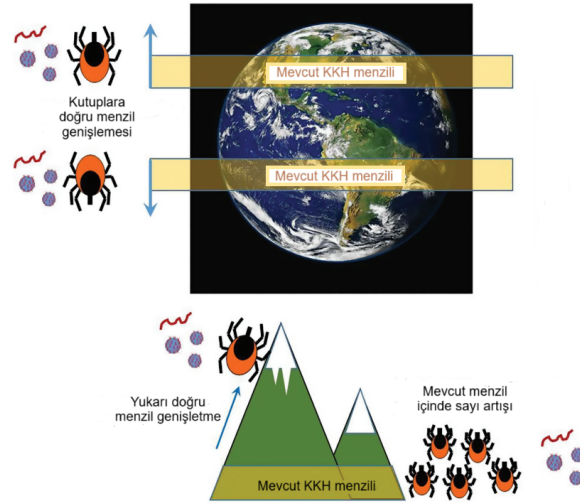
## 2 GENEL BİLGİLER

---

### 2.1 İklim Değişikliği ve Kene Kaynaklı Hastalıklar

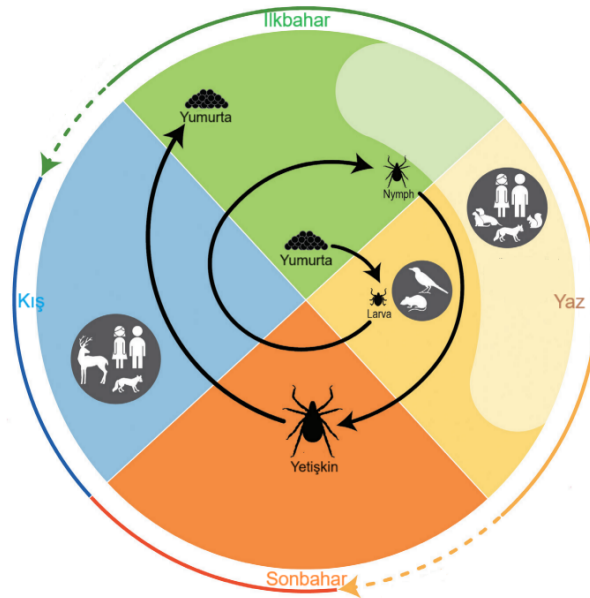
Geçen yüz yıllar içerisinde atmosferde bulunan sera gazlarının konsantrasyonlarındaki meydana gelen artış, insan faaliyetlerinden kaynaklanan sıcaklık artışının başlıca sebeplerinden biridir. Sera gazları arasında bulunan karbondioksit, metan ve azot oksit gazlarının atmosferdeki konsantrasyonlarının sürekli artışı, küresel ölçekte sıcaklık dengelerini önemli ölçüde etkileyip, iklim değişikliğine neden olmaktadır. Bununla birlikte, sera gazlarından kaynaklanan küresel ısınma, özellikle güneş ışığını doğrudan yansıtan sülfat aerosolleri gibi partikül kirliliği ile kısmen dengelenmektedir [14]. Sera gazı emisyonları küresel iklimi son yüz yıldır oldukça etkilemektedir. Küresel ısınma probleminin azaltılmasına yönelik çalışmalara her geçen gün yenileri eklenirken küresel emisyon etkileri hızlanarak devam etmektedir [15]. Bu etkenlerin atmosferde oluşturduğu değişiklikler ise yağış düzenleri, kuraklıkların şiddeti, ekosistemlerin yaşanabilirliği üzerinde gözle görülür farklılıklar oluşmasına neden olmuştur [2]. İklim değişikliği ve kene kaynaklı hastalıklarda meydana gelen değişimler birbiri ile bağlantılıdır [16].

Keneler ve kene kaynaklı hastalıklar, kenelerin yaşam döngülerinin doğası gereği iklime duyarlıdır. Keneler için iklim ve hava durumu hassasiyetleri kenelerin hayatta kalması, gelişmesi ve konak arama süresi gibi süreçleri doğrudan etkilemektedir. Şekil 2.1'de verilen değişen iklim koşullarına göre kene popülasyonu dağılımı ve menzil genişlemesi verilmektedir. Meydana gelen bu iklimsel hassasiyet ısınan bölgelerde bazı kene türlerinin hayatta kalma potansiyelini arttırabilir ya da yaşam döngülerini azaltabilmektedir. Bununla birlikte kenelerin faaliyette olduğu mevsimlerin süresini dahi etkileyebilmektedir [15]. Ayrıca, Danielova ve diğerleri (2010), artan sıcaklıkların kene türlerinin hem rakımsal hem de enlemsel aralıklarını genişletebileceğini öne sürmüştür. *Ixodes ricinus*, yaklaşık 30 yıllık bir süreçte sıcaklığın 1,4°C artmasıyla kene ile bulaşan patojenler 750 m'den 1000 m'ye kadar yüksek rakımlarda yayılım göstermiştir [17].



**Şekil 2.1** İklimsel değişikliklere bağlı kene popülasyonu değişimi, KKH: Kene kaynaklı hastalıklar [15]

Kene istilası, çevresel sıcaklık, yağış ve bağıl nemden etkilenmektedir. Bu nedenle, yaz aylarında artan sıcaklık ve nemli iklim, kene kaynaklı hastalıkların yaygın olmasının nedenidir. Kış aylarında düşük sıcaklık ve nem, kene vektörlerinin büyümesini ve çoğalmasını azaltmaktadır. Bu, vektör kaynaklı hastalıkların iklim değişikliğiyle azalmasının/artmasının nedenidir [18]. Şekil 2.2’de, kenelerin iklim değişikliği ile yumurtlama, gelişme, ölüm oranları ve aktivite değişiklikleri doğrudan etkilenirken, habitat ve konak türleri ve bolluğu dolaylı olarak etkilenmektedir [19].



**Şekil 2.2** İklimsel değişikliklerin kene kaynaklı hastalıklara etkisi [20]

Küresel olarak, kene türlerinin yaklaşık %50’si [18] sıcaklıktaki artış nedeniyle coğrafi alanlarını genişletme potansiyeline sahiptir ve bunların %70’i ekonomik

açısından önemli kene türleridir [21]. Bu durum ise iklimsel değişikliklere bağlı olarak kene kaynaklı hastalıkların yayılması açısından risk teşkil etmektedir [21].

İnsanlar, yabani ve evcil hayvanlar olmak üzere geniş bir canlı topluluğunda kene istilası nedeniyle Lyme hastalığı, babesiosis, theileriosis ve Kırım-Kongo kanamalı ateşi gibi hastalıklar görülmektedir. İklim değişikliği, kene ve kene kaynaklı hastalıkların büyük ölçüde yayılmasını arttırmaktadır. Kene kaynaklı hastalıklar gibi vektör kaynaklı hastalıklar, küresel ısınmadan hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkilenmektedir [16].

### 2.1.1 Tropikal Theileriosis

Theileriosis, keneler tarafından çeşitli hayvan türlerine bulaştırılan parazitik bir protozoan hastalıktır. Bu hastalık *Ixodidae* familyasından gelmektedir. Hastalık genellikle tropikal ve subtropikal iklimlerde görülmekte ve sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır [22].

*Theileria parva* paraziti kene türlerinden *Rhipicephalus appendiculatus* tarafından bulaştırılmakta ve duyarlı sığırlarda Doğu sahili hummasına neden olmaktadır. *Theileria lestoquardi* enfeksiyonu ise koyunlarda görülmektedir. *T. annulata* ise çeşitli *Hyalomma* türleri tarafından bulaştırılmakta ve sığırlarda tropikal theileriosise neden olmaktadır. Çoğunlukla evcil veya yabani geviş getiren hayvanlarda görülen theileriosis, *T. annulata* ile enfekte olmuş büyükbaş hayvanlarda ciddi klinik belirtiler göstermektedir. Parazitlerin gelişim ve çoğalma evreleri, patojenitenin ana nedenidir [23]. Epidemiyolojik araştırmalar ile theileriosisin iki ana durumunu belirlenmiştir. Bunlar, çoğu hayvanın enfekte olduğu ancak genç buzağlarda daha sık görülen endemik stabilite ve her yaştan hayvanda hastalıkla mücadelenin düşük olduğu endemik instabilitedir [24].

Theileriosisin, ateş, yüzeysel lenf düğümlerinde büyüme, anemi ve solunum sıkıntısı gibi belirtileri enfekte sığırlarda görülmektedir. Yaygın olarak mukoza ve serozal yüzeyde peteşiyal ve ekimotik kanamalar, şiddetli sarılık, pulmoner ödem ve amfizem, abomasumda multifokal nekroz ve çok sayıda ülserasyon, dalakta konjesyon ve mermer benzeri renk değişikliği ve şiddetli bağırsak ekimotik kanamaları gibi patojenik özellikleri bulunmaktadır. Duyarlı hayvan topluluklarında yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmektedir [25, 26]. Hastalık, hayvancılık üretimi, hayvan refahı, süt ve et üretimi açısından önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır [27].

Hayvancılık üretim sistemleri, agroekoloji, siyasi ve sosyoekonomik ortamlar ve bulaşma dinamikleri gibi bir dizi faktör theileriosisin kontrolünü zorlaştırmaktadır.

Theileriosisin tedavi ve önlemi için temel olarak vektör keneleri kontrol etmek amacıyla kimyasal akarisitlerin kullanılması, endofilik *Hyalomma* vektör kenelerinin barınma yerlerini ortadan kaldırmak için ahırların iyileştirilmesi, klinik vakalarının kemoterapisi için buparvaquone kullanılması ve canlı zayıflatılmış aşı uygulamalarına dayanmaktadır [27, 28].

Tropikal theileriosis, Türkiye'nin hemen hemen her bölgesinde bildirilmiştir ve hayvancılığın en önemli sorunlarından biridir. Türkiye'deki sığırlarda *T. annulata* ve *Theileria buffeli/orientali* olarak bilinen iki *Theileria spp.* türü mikroskopik, serolojik ve moleküler araştırmalara göre bulunmuştur [29]. Türkiye'deki sığır hastalıkları arasında en yaygın olanı Tropikal theileriosistir. Toplam 10.761.000 sığırın %60'ı olan 6.544.000'i saf ve melez ırklar hastalık tehdidi altındadır [30].

Yapılan bir araştırma sonucunda, Hindistan'da kene kaynaklı hastalıkların tahmini yıllık kontrol maliyetinin 498,7 milyon ABD doları olduğu bildirilmiştir [6]. Sadece *T. annulata* kaynaklı theileriosis sebebiyle Hindistan'da hayvancılık sektöründe yılda yaklaşık 384,3 milyon ABD doları kayıp meydana geldiği tahmin edilmektedir [6]. Tropikal theileriosis için dünya çapında yaklaşık 250 milyon sığırın tehlike altında olduğu tahmin edilmektedir [31].

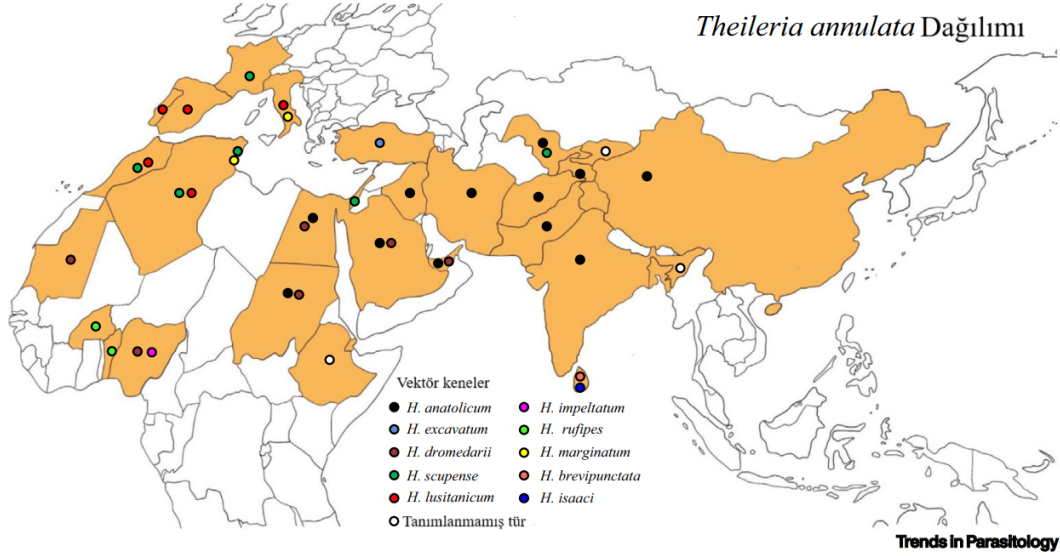
Tropikal theileriosisten kaynaklanan ekonomik kayıplar üretimsel, kontrol maliyetleri ve diğer dolaylı ekonomik kayıplar olarak gruplandırılabilir. Et ve süt üretiminde meydana gelen kayıplar üretimsel ekonomik kayıplar grubunda yer almaktayken pestisitlerin maliyetleri ise kontrol maliyetlerine dahil olmaktadır. Bu üç parametre göz önünde bulundurularak yapılan çalışma sonucunda tropikal theileriosis kaynaklı toplam ekonomik kayıp Kapadokya bölgesinde 2 yıl için 598.133 ABD doları olarak hesaplanırken, bu kayıpların en büyük kısmının (%87,26) üretim kayıpları olduğu rapor edilmiştir [32]. Tanzania'da ise theileriosise karşı mevcut kene kontrol stratejileri değerlendirildiğinde, theileriosis nedeniyle her sığır için yıllık ekonomik maliyet 205,40 ABD doları olarak tahmin edilmiştir [33].

Pakistan'da *T. annulata* ile enfekte olmuş klinik ve subklinik theileriosisli sığırlar üzerinde yapılan bir çalışmada süt üretimi, morbidite, mortalite ve kene kontrol maliyetleri gibi kayıpların ekonomik etkisi araştırılmıştır. Theileriosis kaynaklı toplam harcama çiftlik maliyetlerinin %13,83'lük bir bölümünü kapsamakta ve hayvan başına yaklaşık 74,98 ABD dolara karşılık geldiği bildirilmiştir. Pakistan'da bulunan Holstein Friesian mandırasında theileriosis yaklaşık 0,02 milyon ABD Doları tutarında önemli bir ekonomik kayba neden olmuştur [34].

Diğer *Theileria* türleri dünyanın farklı bölgelerinde çiftlik hayvanlarında hastalığa

neden olmaktadır. Tropikal theileriosis çoğunlukla *Hyalomma* türleri, özellikle de *Hyalomma anatolicum anatolicum* tarafından bulaştırılmakta ve dünya genelinde Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Orta Asya, Hindistan ve Çin'in diğer bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir [35].

Şekil 2.3'te görüldüğü üzere *T. annulata* enfeksiyonu yaklaşık 250 milyon sığırın riskte olduğu Asya, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa'da geniş bir alana yayılmıştır [36].



Şekil 2.3 *Theileria annulata* taşıyıcı vektör kenelerin dünya çapında dağılımı [36]

### 2.1.2 Tropikal Theileriosisin Tedavi Yöntemleri

Tropikal theileriosis, hayvancılık sektöründe yüksek kayıplara neden olduğu için hastalığın kontrol edilmesi gerekmektedir. Yaygın olarak beş kontrol yöntemi bulunmaktadır [37]. Bu kontrol mekanizmaları aracılığı ile hastalığın tedavisi ve önlenmesi amaçlanmaktadır. Theilerisidal ilaçların enfekte hayvanlarda kullanılması ve diğer semptomatik tedavi yöntemlerinin uygulanması ilk sırada yer alırken bu semptomatik tedavi yöntemleri hayvanların tedavisinde yardımcı olmasına rağmen parazitin yok olması konusunda yetersiz kalmaktadır. Akarisitler enfeksiyonun taşınmasında büyük rol oynayan kenelere yönelik kullanılan bir kontrol yöntemidir [38]. Bu yöntemde ise insan, hayvan ve çevre için olası etkiler mevcuttur. Endofilik keneleri kontrol altında tutmak amacıyla büyükbaş hayvanların bulunduğu mekanların dış ve iç yüzeylerinin düz ve pürüzsüz hale getirilmektedir. Bu yöntem görece pahalıdır fakat kenelerin binalardan temizlenmesi için gereklidir. *Hyalomma scupense* veya *Hyalomma anatolicum* gibi endofilik vektör kenelerin kontrolü için kullanılabilen bir kontrol yöntemi *Hyalomma lusitanicum* gibi ekzofilik vektör kenelerin kontrolü için uygun değildir

[39]. Kenelere karşı aşılama uygulaması ise bir diğer kontrol mekanizmasıdır. Bu mekanizma bütün kene türlerinde etkili değildir. Son olarak canlı zayıflatılmış aşılar yardımıyla theileriosis neden olan parazite karşı aşılama yöntemi kullanılmaktadır [37].

*Theileria* parazitleri, birçok farklı kene türü tarafından yayılmakta ve ilgili kene vektörlerini destekleyen iklim koşulları, parazitlerin coğrafi dağılımını belirlemektedir. *Theileria*'nın bulaşması transstadiyal olarak gerçekleşmekte, yani larva ve nimfal keneler enfeksiyonu erişkinlere ve nimflere bulaştırmaktadır. Bu parazitlerin yüksek patojenik özellikleri ve genç hayvanların hastalığa yatkınlığı nedeniyle hastalıkların kontrolü zor olmaktadır. Kemoterapi ve kene istilasını önlemek yoluyla kontrolün pahalı ve sürdürülmesi zor olduğu kanıtlanmıştır. *T. parva* ve *T. annulata* için canlı parazitler kullanılarak yapılan aşılar mevcuttur ve klinik olarak başarılı olmuştur [39]. Bu yüksek derecede patojenik *Theileria*'nın neden olduğu hastalığın kontrolü, bu tür koruyucu mekanizmaların azlığı/yokluğu ve duyarlı sığırlarda hastalıkların ölümcül seyri nedeniyle özellikle zordur. Hastalığı kene istilasını önleyerek kontrol altına almak, gerçekte sürekli akarisit kullanımıyla mümkün olmaktadır bu nedenle akarisit kullanımı pahalı ve sürdürülmesi zor bir yöntemdir. Ayrıca bu bileşiklerin yoğun kullanımı, akarisitlere dirençli kene popülasyonların ortaya çıkmasına neden olabilir [40].

Protozoanların neden olduğu önemli tropikal hastalıkların tedavisi için yeni ve etkili ajanlar araştırılmaktadır, doğal kaynaklardan elde edilebilen bileşikler bu amaçlarla kullanılabilir [41]. Yapılan bir çalışmada *Peganum harmala* ekstraktının sığırlarda doğal tropikal theileriosis üzerindeki terapötik etkileri incelenmiş ve tedavide %78'lik bir iyileşme oranı elde edilmiştir. Anti-theilerial aktivitesi rapor edilen *Peganum harmala*, protozoana karşı önemli etkiler göstermiş olup doğal kaynaklardan antitheilerial ajan arayışında önemli bir ilerleme göstermektedir [42].

## 2.2 *Theileria annulata*

1904 yılında *Piroplasma annulatum* olarak bilinen *Theileria annulata* ilk olarak Transkafkasya sığırlarında tanımlanmıştır. Sonraki dönemlerde şizont evresinin yaşam döngüsünde belirlenmesinin ardından *Theileria annulata* olarak yeniden sınıflandırılmıştır [43].

*Theileria annulata*, tropikal theileriosis neden olan hücre içi apikompleksan bir parazittir ve enfekte hayvanlarda değişken subklinik enfeksiyonlar ve klinik semptomlar görülmektedir [44]. Sığırlarda kene kaynaklı tropikal theileriosis hastalığının ana etkeni olan *T. annulata*, yerli sığırlarda hastalık ve verim kaybına

neden olmaktadır. Bu hastalık, Avrupa ve Afrika'nın Akdeniz kıyı bölgelerinden Yakın ve Orta Doğu'ya, Asya'da Hindistan ve Çin'e kadar uzanan geniş bir coğrafyada görülür ve ithal yüksek sınıf sığırlarda ve melezlerde ciddi ve genellikle ölümcül hastalıklara neden olmaktadır [45, 46].

Besicilik sektöründe büyük bir sorun olarak *theileria* enfeksiyonu, sığırlarda bazı insan lösemilerine benzer klinik özelliklere sahip lenfoproliferatif bir hastalık olarak bilinmektedir. Enfeksiyöz ajanlar, hücrel mekanizmaları ele geçirmek ve konak hücre yollarıyla etkileşime girmek için karmaşık mekanizmalar geliştirmiştir. İneklerde bazı insan lösemilerine benzer klinik özelliklere sahip lenfoproliferatif bir hastalık olarak bilinen *theileria* enfeksiyonu hücre içi apikompleksan paraziti *Theileria*'nın lökositlerinin enfeksiyon kaynaklı dönüşümü, konak-parazit etkileşimlerini incelemek üzere çalışmalar yapılmıştır. *T. parva* sığır B hücrelerini ve T lenfositlerini enfekte ederken, *T. annulata* genellikle sığır B hücrelerini ve makrofajları enfekte etmektedir [47, 48].

Parazit ve konak hücre döngülerinin iç içe geçmesiyle birlikte, bazı *Theileria* türleri konak hücrenin çoğalmasını, ölümsüzleşmesini ve yayılmasını tetikleyen mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar, kanseri en iyi tanımlayan fenotipler arasında bulunmaktadır [49].

İnsan kanserlerini tedavi etmek amacıyla kinazları hedefleyen küçük molekülü inhibitörler geliştirilmiştir. Osimertinib, dasatinib, regorafenib, trametinib, cobimetinib, gefitinib, sorafenib, axitinib, erlotinib, imatinib, ve gibi inhibitörler kinazları hedeflemektedir [50]. Bunlardan bazıları FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış olup, bazıları ise klinik çalışmalarda incelenmiştir. Kar ve diğerleri (2022), ileri çalışmalarda *T.annulata* ile enfekte edilmiş sığır hücreleri üzerindeki anti-theilerial aktivitesini incelemek adına CDPK3 (Kalsiyum bağımlı protein kinaz) (TA16570) için yaptıkları *in silico* çalışmalar sonucu Dabrafenib'in ATP'den daha yüksek bağlanma enerjisine sahip olduğu görülmüştür [51].

### **2.2.1 *Theileria annulata*'nın Yaşam Döngüsü**

*Theileria annulata* enfeksiyonlarına sığırlarda daha yaygın rastlanmaktayken yak, manda, deve, koyun ve keçilerde de görülebilmektedir. *Bos taurus* türü ise *T. annulata* ile enfekte olduğu durumda yüksek ölüm oranları ile karşı karşıya gelmektedir. Sığırların beslenme halindeyken bir kene ile karşılaşmasının ardından kenenin tükürüğünde bulunan sporozoit aşamasıyla *T. annulata* enfeksiyonu başlar ve makroşizont aşamasının geliştiği mononükleer hücrelerde eritrositlerin posterior

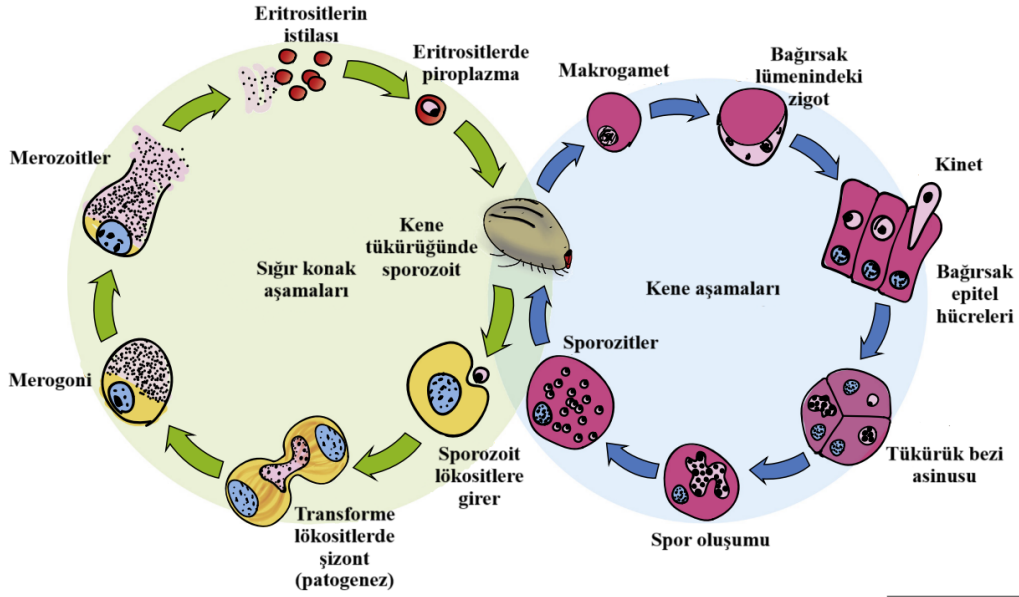
istilası ile sıralı olarak gelişmektedir [52].

Sığırlar enfekte bir kene tarafından parazitin sporozoit formu ile enfekte edildikten sonra enfeksiyon ilerler. Parazit, şizogonöz bir aseksüel replikasyon sürecine girer ve enfekte hücreleri kontrolsüz bir çoğalma durumuna dönüştürür. Bu dönemde enfeksiyonla ilişkili patolojiler ortaya çıkar. Parazitler, enfekte hücrelerin bazılarında bölünmeyi durdurarak çekirdekli merozoitler oluşturur. Bu merozoitler, eritrositleri istila eder ve parazitin kene enfektif pyeloplasma evresini oluşturur [53]. Enfeksiyondan kurtulan sığırlar, bu tür parazitleri uzun süreli taşıyıcılarıdır. Ancak, taşıma süresi parazit türlerine bağlı olarak değişebilir [54]. Şekil 2.4'te *Theileria* parazitin kene ve sığırdaki yaşam döngüsü verilmiştir. Piroplazmaları yiyen keneler, parazitlerin kesin konaklarıdır. Kene tarafından beslenme sırasında, emilen kandan alınan pirop plazmalar bağırsakta mikro ve makrogametlere dönüşür ve eşleşme gerçekleşir. Zigotlar, kenenin gömlek değiştirmesi sırasında tükürük bezlerine göç eder ve belirli tükürük bezlerine girer. Kene, konak hayvana saliva bezlerinden sporozoitleri enjekte eder. Bu sporozoitler, lenfositler veya makrofajlar gibi belirli hücre alt gruplarını enfekte eder. Enfekte hücreler çoğalır ve yayılır, bu da hastalık dönemine neden olur. Son olarak, bir sinyal üzerine, şizyontlar eritrositlerdeki merozoitlere dönüşür, parazit konak hücrelere saldırır ve tekrar keneyi enfekte eder. Bu *Theileria*'nın yaşam döngüsünün en patojenik aşamasıdır [49].

Sporozoitler lenfoid hücrelere saldırır ve bir sinsityal şizont oluşturur. Parazit, konak hücrelerin gelişimine ve dönüşümüne izin verir. Şizontların bazıları eritrositlere saldırır ve merozoite dönüşür. Bazı parazit türleri, lenfosit aşamasında eritrositlerde az veya hiç çoğalmazken, diğer türlerde sadece eritrositlerde çoğalır. Keneler enfekte eritrositleri yuttuktan sonra, bağırsakta gametogenez ve döllenme gerçekleşir. Zigot, bağırsak epitel hücrelerine saldırarak hareketli kinetidlere dönüşür. Kinetidler bağırsak hücrelerinden ayrılır ve tükürük bezlerine saldırır. Kenelerin tükürük bezlerinde hızlı sporozoit büyümesi gerçekleşir ve enfektif sporozoitler beslenme sırasında yayılır. Larvalar veya nimfler keneden transstadial olarak bulaşır. Parazitler tüy dökme döngüsü boyunca bağırsak epitelinde yaşar ve sonraki bir memeli konakta bulaşır [55]

### **2.2.2 *Theileria annulata*'nın İlaç Direnci**

Bazı hayvan hastalıkları zoonotik bulaşma riski nedeniyle insan sağlığını tehdit etmektedir. Yoğun antibiyotik ve kimyasal kullanımı gibi kontrol stratejilerine olan bağımlılığı azaltmak hedefiyle çiftçiler üzerinde baskılar vardır. Bu hayvansal hastalıkların görülme sıklığını azaltmanın önleyici ilaçlar ve aşular gibi çeşitli



**Şekil 2.4** *Theileria* parazitinin yaşam döngüsü [49]

yolları bulunmaktadır [56].

Sığırlar için *Theileria* enfeksiyonlarına karşı yüksek etkinlik ve düşük toksisite gösteren parvaquone (BW 993C) [57] ve ardından buparvaquone olan trans-2-[4-(4-butylcyclohexylmethyl)]-3-hydroxy-1,4-naphtoquinone (BW 720C) geliştirilmiştir [7]. Buparvaquone, şu anda sığırlarda *Theileria* enfeksiyonunun tedavisinde etkili anti-theilerial ilaçtır ve hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kapsamlı bir şekilde test edilmiştir [57, 58].

Çeşitli saha denemelerinde tek bir 2,5 mg kg<sup>-1</sup> geleneksel doz enjeksiyonu ile %92 iyileşme sağlamaktadır, ancak bazı vakalarda ikinci bir doza ihtiyaç duyulmaktadır [7]. Buparvaquone, *T. annulata*'nın *in vivo* olarak piroplazma ve şizont aşamalarında önemli ölçüde zarar verdiğine dair çalışmalar yapmıştır. Tedaviden sonraki 24 saat içinde dejenerasyon, piknotik şizont ve piroplazma görülmektedir ve bununla birlikte tedaviyi takip eden 2 veya 7 gün içinde bu iki parazit evresinin sayıları hızlı bir şekilde düşerek neredeyse tespit edilemez hale gelmektedir [8].

Bir hidroksi naftokinon türevi olan buparvaquone rekabetçi bir inhibisyon profili sergileyerek enerji metabolizması ve mitokondriyal solunumun inhibitörü olarak işlev görmektedir. İnhibisyon mekanizması iç mitokondriyal membranın Q döngüsünü sitokrom bc1 kompleksi seviyesinde bloke edilmesiyle gerçekleşmektedir [59]. Böylece iç mitokondriyal membran potansiyelinin dağılmasının ardından, süreç parazitin ölmesi ile sonlanmaktadır [60].

*T. annulata*'daki Qo bölgesi buparvaquone'un spesifik hedefi olmakla birlikte mitokondriyal sitokrom b geninde görülen mutasyonlar enfekte sığırlarda buparvaquone direncini tetiklemektedir. Mitokondriyal sitokrom b geninin çok kopyalı olması, reaktif oksijen türlerine yakınlığı ve mitokondriyal DNA polimerazın zayıf düzeltme okuması, atovaquone bileşen direnci sağlayan kendiliğinden ortaya çıkan mutasyonların nispeten yüksek sıklığının birkaç nedeni olabilir [9].

Buparvaquone'a karşı direnç gösteren *T. annulata*'nın genetik temelini araştırmak için yapılan çalışmalarda ilk olarak diğer parazitlerdeki mutasyon bölgeleri incelenmiştir. *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* ve *Pneumocystis carinii* gibi başka parazit sistemlerinde, mitokondriyal sitokrom b geninin ubikinon bağlayıcı bölgesindeki mutasyonlar ile hidrosinaftokinonlara karşı direnç oluşması arasında bir ilişki bulunmaktadır. Bu bulgular ile, protozoon *T. annulata*'nın buparvaquone'a karşı direnç gelişimi ilk kez Tunus'ta *in vivo* olarak rapor edilmiştir [8].

Mısır'daki sığırlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, buparvaquone'a karşı direnç ile *Theileria annulata*'nın Sitokrom b genindeki mutasyonların meydana gelmesi arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde beş dirençli izolatın kinol oksidasyon (Qo2) ilaç bağlama bölgesinde 253 ve 262 kodonlarında iki mutasyon meydana geldiği görülmüştür. *Theileria annulata*'nın Sitokrom b genindeki Qo2 bölgesinde oluşan nokta mutasyonları, buparvaquone direnci ile ilişkilendirilmiştir [60].

Sharifiyazdi ve diğerleri (2012) yaptıkları moleküler çalışma sonucu parazitin sitokrom b geninde iki önemli tek bazlı mutasyon bulmuşlardır. Qo ilaç bağlanma bölgesinde bulunan mutasyonların, bir hidrosinaftokinon ögesi olan buparvaquone'a karşı dirençle bağlantılı olduğu göstermişlerdir [9].

Sitokrom b geninde etkili olan antiprotozoal ilaçlar ve ilaç direnci ile ilgili araştırmalar son yıllarda artış göstermektedir. Bu araştırmalar, tek bir mutasyon veya gen delesyonunun duyarlılığı azaltmak için yeterli olduğunu ve ikincil mutasyonların bunu artırmak için devam edebileceğini göstermiştir. Ayrıca, antiprotozoal ilaçların yoğun kullanımı veya yetersiz dozda kullanımı, direnç gelişimine katkıda bulunan seçim baskısıyla sonuçlandırıldığı bildirilmiştir [61]. İran, Türkiye ve Tunus'ta normal dozda buparvaquone verilen hayvanlardan elde edilen saha izolatlarında, *T. annulata* sitokrom b geninde mutasyonlar bulunmuştur. Buparvaquone tedavisine olumlu yanıt vermeyen hasta sığırlardan toplanan örneklerden bu mutasyonlar tespit edilmiştir [9, 62].

Sudan'dan izole edilmiş *T. annulata*'nın sitokrom b geninde buparvaquone'a dirençle ilgili yeni bir nokta mutasyonu ve ek mutasyonlar bulunmuştur. Qo2 bağlanma bölgesine yakın 227. pozisyonda valinden (GTG) metiyonine (ATG) bir mutasyon daha keşfedilmiştir. Yapılan çalışma ile *T. annulata*'nın sitokrom b genindeki nokta mutasyonlarının Sudan'daki buparvaquone tedavi başarısızlığı ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir [63].

Buparvaquone, dünyanın endemik bölgelerinde en yaygın theilerisidal madde olmasına rağmen direnç raporlarının artmasıyla birlikte kemoterapinin etkinliği sınırlanmaktadır. Apikompleksan parazitlerin direnci, profilaksi için ilaçların aşırı kullanımı, aktif enfeksiyonların eksik veya yetersiz tedavileri, genetik ve metabolik düzeylerde parazit adaptasyonu ve popülasyonların nispeten yüksek çoğalma oranı gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır [61].

*T. annulata*'nın yüksek genetik çeşitliliği ve yüksek biyotik potansiyeli kaçınılmaz olarak genetik uyuma olanak tanımakta ve ilaç direnci mutasyonların oluşmasını kolaylaştırmaktadır. Pakistan'da hayvanlar sıklıkla buparvaquone ile tedavi edilmekte olup ilaç direnci rapor edilmektedir [64, 65], bu da ilaç direncinin gelişmesine neden olan güçlü ve seçici baskı olabileceğini göstermektedir. Chaudhry ve diğerleri (2021), bireysel konakları enfekte eden *T. annulata* ile diğer konak türevli popülasyonlar arasındaki yüksek genetik çeşitliliği göstermiştir. Çeşitli *T. annulata* genotiplerinin baskınlığı ve çoklu enfeksiyon oluşumu, parazit genetik adaptasyonlarının yayılması üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilmektedir. Yüksek parazit bulaşma oranları ve çeşitli yerlerde sık hayvan hareketlerine ek olarak genetik adaptasyonun yayılması sonucunda antiprotozoal ilaç direnciyle karşılaşmaktadır [66]. *T. annulata* enfeksiyonunun çeşitliliği ise, kene bulaşması üzerindeki iklim koşullarının mevsimsel etkilerinden kaynaklanan popülasyonu veya parazitik aşamaların antiprotozoal ilaçlara maruz kalması gibi potansiyel olarak olumsuz faktörlerden de etkilenebilmekte veya ilaçlara karşı direnç oluşumu ile sonuçlanabilmektedir [67].

### **2.3 *Theileria annulata*'nın Enerji Metabolizması ve İlaç Hedefi olarak *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenazı**

*T. parva* şizontlarında yapılan önceki araştırmalar, laktat dehidrogenaz (LDH) için en yüksek aktiviteyi gösteren glikolitik enzimleri göstermiş olup parazitin mikroşizont evresinde krebs döngüsünden sorumlu enzimlerin aktivitesinin düşük olduğu rapor edilmiştir [68]. Bu, enerji üretimi için ana yol olarak glikolizi kullanan enerji metabolizma türü olup, *Plasmodium*'un eritrositik evresindeki

benzerdir [69]. *Theileria* makroşizontlarında anaerobik glikoliz metabolizması ana enerji üretim yolu olduğu, glukoneogenezin gerçekleşmediği, düşük seviyelerde gliserol katabolizmasının gerçekleştiği ve şizontta enerji üretimine katılmadığı gözlemlenmiştir [68].

*Plasmodium* cinsinden protozoalar sıtmaya neden olmaktadır ve parazitler yaşam döngüsünün bir aşamasını hastaların eritrositlerinde sürdürürken hastalık semptomlarını oluşturmaktadır. Bu aşamada, parazit adenozin trifosfat (ATP)'yi esas olarak glikozun laktata fermentasyonundan almaktadır ve glikolizi sürdürmek için gereken oksitlenmiş  $NAD^+$ 'nin (Nikotinamid adenin dinükleotit) yenilenmesi için LDH aktivitesi gerekli olmaktadır. LDH, *Plasmodium* replikasyonunun kontrol edilmesi için uygun bir ilaç hedefidir. Ayrıca, *Plasmodium* türleri tarafından ifade edilen LDH izoformları, insan homologundan ayıran yapısal ve kinetik özelliklere sahipken [70], farklı *Plasmodium* türleri tarafından ifade edilen LDH izoformları çok benzemektedir [71].

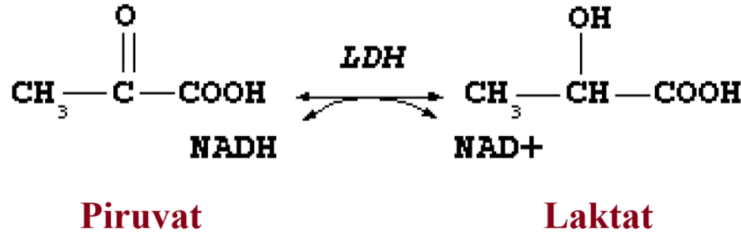
Çoğu protozoan parazitin yaşam döngülerinde hücrel süreçleri beslemek için gerekli olan ATP üretimi, glikolitik yolun merkezi işlevi nedeniyle alternatif ilaç arayışında büyük ilgi görmesine neden olmaktadır. Glikolitik yolun bozulması parazit için ölümcül olduğundan, yeni ilaçların geliştirilmesi için umut verici bir hedef olarak kabul edilmektedir [72, 73]. *Plasmodium falciparum* kültüründe LDH'nin inhibisyonunun parazitin yaşamının son bulmasıyla sonuçlandığı tespit edilmiştir [74].

Parazitler, biyokimyasal süreçleri ve hayatta kalmaları için enerji üretmektedir. Mevcut araştırmalar, LDH'nin *Plasmodium* spp, *Toxoplasma gondii*, *Theileria annulata* ve *Babesia bovis* [75], *Babesia bigemina* [76] için yeni bir ilaç hedefi olduğunu göstermektedir [77–79].

### 2.3.1 Laktat Dehidrogenaz Yapısı ve Fonksiyonu

Anaerobik metabolik yolakta çok önemli bir enzim olan LDH, oksidoredüktaz sınıfında yer almakta ve H<sup>+</sup> transferini sağlamaktadır. Enzimin fonksiyonu,  $NAD^+$ 'nin  $NADH$ 'ye indirgenmesi ile laktatın piruvata geri dönüşümünü katalize etmektedir ve bu işlevi tersinir bir şekilde gerçekleştirmektedir [72]. LDH'nin katalitik mekanizması Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Oksidatif fosforilasyon, hücrelerin anaerobik veya hipoksik koşullara maruz kaldığında ATP üretimini durdurmaktadır. Bu nedenle hücrelerin başka bir metabolizma kullanarak enerji üretmesi gerekmektedir. LDH genel olarak oksijenin çok az veya hiç olmadığı durumlarda glikozun anaerobik metabolizmasında rol oynamaktadır [80].

Bitkiler, hayvanlar gibi çeşitli organizmalara ek olarak neredeyse bütün dokularda bulunmaktadır. Anemi, karaciğer hastalığı, kas travması, kalp krizi, menenjit, kemik kırıkları, kanserler ve ensefalit, ve HIV gibi enfeksiyonlar kanda LDH'nın artmasına neden olabilmektedir. LDH aynı zamanda normal bir metabolik döngü olan doku döngüsünün bir göstergesidir. Çok sayıda kanserde, LDH seviyelerinin genel olarak yüksek olmakta veya izozimlerin birinde seviyesinin yüksek olduğu bildirilmektedir [81].



Şekil 2.5 LDH katalitik mekanizması [82]

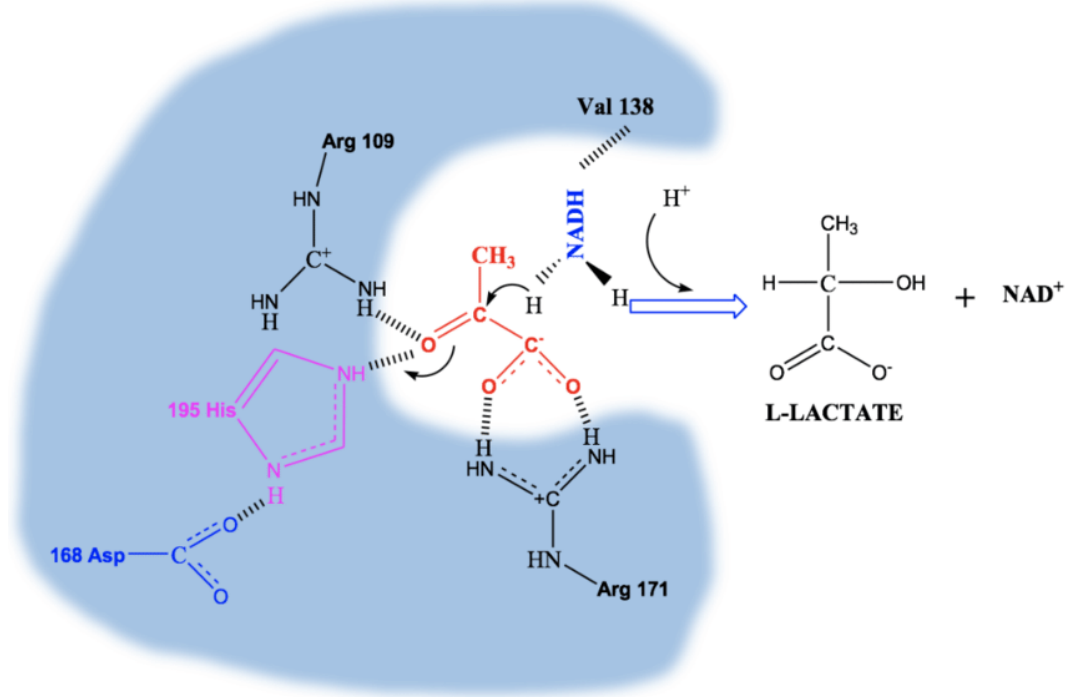
LDH, sıtma ve diğer hastalıkların yayılmasında etkili birçok parazitte bulunmaktadır. Bununla birlikte, hayvanlarda ve sıtma paraziti *Plasmodium* gibi diğer parazit türlerinde LDH'nın yapısı iki gruptaki enzimlerin genlerinin ayrı evrimleşmesinden ötürü farklılıklar göstermektedir. LDH ve malat dehidrogenaz (MDH) enzimlerinin her ikisi de merkezi metabolizmada bulunmaktadır. Sitrik asit döngüsünde malatın ve oksaloasetatın birbirine dönüşümünden MDH sorumluyken, LDH piruvatı laktata dönüşümünde işlev görmektedir. Modern apikompleksan LDH ve MDH'ler, yapısal ve katalitik benzerliklerine rağmen çok yüksek katı substrat özgülüğüne sahiptir [83]. Parazit türlerinde bulunan LDH'ların genleri farklı şekillerde evrimleştiğinden dolayı yapısal değişiklikler görülmektedir. LDH'nın parazit versiyonu, bakterilerden aktarılan malat dehidrogenaz'dan evrimleşmiştir. Malat dehidrogenaz'ın bir kopyası, 700-900 milyon yıl öncesinde bir gen duplikasyonunun ardından yeni bir substrat spesifikliğı geliştirerek günümüzdeki birçok modern apikompleksanın yaşam döngüsü için gerekli olan oldukça spesifik bir LDH haline gelmiştir [74]. Metazoan LDH'dan bağımsız olarak evrimleşen temel bir metabolik enzim olan benzersiz apikompleksan LDH'nın bir ilaç hedefi olabileceği bildirilmiştir [83, 84].

### 2.3.2 Laktat Dehidrogenaz Katalitik Mekanizması

Enzim katalizli bir reaksiyonun başlangıç ve bitiş süreci çoğunlukla üç adımdan oluşmaktadır; ilk olarak substrat bağlanması ile başlayıp, ardından aktif bölgede gerçekleşen katalitik reaksiyonun gerçekleşmesi ve oluşan ürünün salınımı ile

sonlanmaktadır [85]. L-LDH mekanizmasında, LDH'a substrat bağlanması enzim açık döngü konformasyonundayken gerçekleşmektedir ardından, LDH formu kapalı döngü konformasyonuna dönüşür, piruvatın L-laktata dönüşümü ise LDH kapalı döngü konformasyonundayken gerçekleşmektedir. LDH açık döngü konformasyonunda olduğu durumda ürün serbest bırakılmaktadır [86].

Piruvatın L-laktata dönüşüm reaksiyonunda LDH'de açık ve kapalı döngü konformasyonları incelendiğinde açık döngü konformasyonunda, substrat ve nihai ürün bağlanma durumları kapalı döngü konformasyonuna göre daha kararlı olduğu, kapalı döngü konformasyonunda ise uyumlu proton ve hidrit transferleri için geçiş durumunun daha stabil olduğu tespit edilmiştir [86].



**Şekil 2.6** LDH aktif bölgesinde gerçekleşen reaksiyon mekanizması [87]

LDH aktif bölgesinde bulunan ve reaksiyon mekanizmasında rol oynayan önemli amino asitler Şekil 2.6'da verilmektedir. Reaksiyon gerçekleştiği esnada substratı ARG171 bağlamaktadır, proton donörü olan HİS195, geçiş durumunun stabilizasyonu için ARG109 HİS195'i aktive etmektedir. pKa değerinin modülasyonunda ASP168 ve HİS195 görevliyken, Val-138 kofaktör oryantasyonunun karboksamid yan zincirinden sorumludur. ILE250 nikotinamid halkasının hidrofobik ortamının sabit kalmasını sağlarken, GLN102 ve THR246 ise substratın ayrılmasında görev almaktadır. Proton ve hidrit transferi neredeyse eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Geçiş durumundaki hareketlerinin yaklaşık yarısında olduğu kabul edilir; C<sub>2</sub>=O grubu bu nedenle geçiş durumunda çok polardır [87, 88]. Erdemir ve Mutlu (2017) mutant ve yabanıl tip olmak üzere iki adet

TaLDH'ı modelinin aktif bölgesine piruvat ve NADH yanaştırması yapmışlardır. Yabancıl tip yapıda HİS185 (HİS195), ARG161 (ARG171) ve ARG98 (ARG109) rezidüleri ile piruvat arasında hidrojen bağı kurulduğunu ve döngü rezidüsü olan TRP96 ile elektrostatik ve sterik etkileşimler meydana geldiğini bildirmişlerdir [89].

LDH üzerine yapılan kinetik ve denge bağlanma deneyleri sonucunda enzimin reaksiyon sırasında önce koenzime sonrasında substrata zorunlu bağlandığı bildirilmektedir. Laktatın piruvata dönüşümünü sağlayan ileri reaksiyonda substrat doyunluğunda laktatın oksidasyonu için NADH'ın ikili kompleksten ayrılma hızı sınırlayıcı olmaktadır. Piruvatın laktata dönüşümü sırasında ise hızı etkileyen sınırlayıcılar redoks reaksiyonu ya da LDH-NAD<sup>+</sup> kompleksinin ayrılmasıdır [90].

### 2.3.3 Laktat Dehidrogenaz Substrat İnhibisyonu

Piruvatın laktata indirgenmesi sırasında hem memeli hem de bakteriyel LDH'lar yüksek substrat konsantrasyonu durumunda inhibisyon gösterir. Piruvat ile oksitlenmiş kofaktör NAD<sup>+</sup> arasında enzimden salınmadan önce kovalent bir eklenti oluşur ve bu inhibisyona neden olur [91].

Kinetik, enzim aktivitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bağlanma işlemlerinin gerçekleştiği substrat ve ürün konsantrasyonlarının tanımlanması ve yanı sıra dönüşüm hızı hesaplamalarını da içermektedir. Birçok kaynak ve dokuda, Michaelis sabitini aşan piruvat konsantrasyonlarında LDH'nin substrat inhibisyonu gözlemlenmektedir. Piruvat ve NADH'nin laktat ve NAD<sup>+</sup>'ye bisubstrat dönüşümünde, piruvat konsantrasyonu belirli bir minimum değeri aştığında hız da düşer [92]. Piruvatın C<sub>2</sub> karbonunun enzimden ayrılmadan önce oksitlenmiş nikotinamid halkası üzerindeki C<sub>4</sub> karbonu ile kovalent birleşmesinin inhibisyona neden olduğu araştırmalar sonucu belirlenmiş olup, böylece oluşan kompleks E-NAD<sup>+</sup>-Pyr adduct kompleksi olarak adlandırılmaktadır [92, 93].

## 2.4 Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı

Yüksek verimli tarama (HTS), bir hastalığa karşı hit molekülleri belirlemek için kullanılan geleneksel yöntemdir. HTS, hedefe yönelik biyolojik yanıt oluşturabilecek aktif moleküllerin belirlenmesi adına yüz binlerce küçük molekülün taranması yoluyla gerçekleştirilmektedir [94]. Yüksek verimli sanal tarama (HTVS) ise, çok çeşitli sanal bileşik kütüphanelerinden ilaç adaylarını belirlemek amacıyla etkili ve verimli bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Deneysel HTS teknolojisi ile ilişkili yüksek zaman ve maliyetleri en aza indirmek için HTSV

çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Hedef reseptörün afinitesini belirlemek için HTVS genellikle *in silico* olarak bir bileşik kütüphanesini kemoinformatik yöntemler ve kuantum kimyasal hesaplamaları kullanarak taramaktadır [95, 96]. Bilgisayar destekli ilaç tasarımının bir parçası olan öngörücü algoritmalar, bilgi işlem kaynakları ve 3 boyutlu (3B) görselleştirme araçlarının yanı sıra hastalıklara karşı küçük moleküllü terapötiklerin tasarımı, optimizasyonu ve geliştirilmesinde aktif bir şekilde kullanılmaktadır. Hedefe uygun olmayan moleküllerin erken tespiti, iş yükünü ve HTS maliyetlerini azaltırken başarı oranını korumaktadır [94].

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı yardımıyla milyonlarca küçük moleküllü tarayarak deneysel testlerde daha ileri değerlendirilmek üzere potansiyel adaylar önceden seçebilir. *De novo*, fragman bazlı veya iskele atlamalı yöntemler sayesinde ise yeni ve patentlenebilir bileşiklerin geliştirilmesinde kullanılmasının yanı sıra insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan deneylerin azaltılması da bilgisayar destekli ilaç tasarım çalışmalarının amaçları arasındadır. Yüksek kaliteli veri kümelerinin ve kütüphanelerin geliştirilerek kullanılmasıyla, çeşitlilik veya benzerlik açısından öncü moleküllerin optimizasyonu sağlanmaktadır [94].

İlaç endüstrisinde bilgisayar destekli ilaç tasarımının üç ana işlevi vardır: (1) gerçek deneylerde daha fazla test edilecek en az sayıda potansiyel küçük molekülleri tahmin etmek için yüksek sayıda sanal molekül kütüphanelerinin taranması; (2) yeni küçük moleküller oluşturarak öncü tanımlanması; ve (3) afinite veya farmakokinetik/farmakodinamik özellikler için öncü optimizasyon çalışması [94]. Hem akademik hem de endüstriyel Ar-Ge çalışmalarında, yapıya dayalı ilaç taraması tekniği ile erken aşama ilaç keşfini rutin hale getirmektedir. Akılcı ilaç taraması ve tasarımı, istenen farmakolojik özelliklere sahip ilaçların keşif verimliliğini ve hızını artırmayı amaçlamaktadır. Son zamanlarda, öncül bileşiklerin seçiciliğini, gücünü ve ADME-Tox(emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite) özelliklerini değerlendirmek için makine öğrenmesi teknikleri de kullanılmaktadır [97, 98].

Bir kompleks oluşturmak için yapıya dayalı sanal tarama yöntemi, moleküler bir hedefe karşı ligandlar arasındaki en iyi etkileşimi tahmin etmek için kullanılmaktadır. Ligandlar hedefe olan afinitelerine göre sıralandığında sanal tarama listesinin başında en umut verici bileşikler yer almaktadır. Yapı tabanlı sanal tarama yöntemi için hedeflenen proteinin 3B yapısının bilinmesini gerekmektedir. Her bir kimyasal bileşik ve hedef protein arasındaki etkileşimlerin *in silico* olarak tahmin edilmesi proteinlerin yapısına bağlı olmaktadır [99].

### 2.4.1 Homoloji Modelleme

Benzer dizilere sahip proteinlerin yapısını tahmin etmek amacıyla dizilerin benzediği ölçüde proteinlerin benzer yapılarda olduğu kanısına dayanarak gerçekleştirilen teknik homoloji modelleme veya karşılaştırmalı modelleme olarak bilinmektedir. Deneysel olarak belirlenmiş bir protein yapısı şablon olarak kullanılmakta ve homolog bir dizi %30 veya daha fazla benzerlik oranına sahip dizilerin var olduğu durumlarda modeller oluşturabilmektedir [10]. Proteinlerin homoloji modelleme süreci başlıca üç adımdan oluşmaktadır. İlk olarak ilgili proteinin şablon olarak kullanılabilir bilinen üç boyutlu yapısının tanımlanması gerekmektedir; sonrasında, hedef ve şablon proteinlerin dizi hizalaması yapılmalıdır; son aşamada ise hedef için model oluşturmak amacıyla şablonun 3B yapısına ve hizalamaya dayalı olarak modellerin rafine edilmesi, doğrulanması ve değerlendirilmesi gerekmektedir [100]. Deneysel protein yapılarının olmadığı durumlarda ise, bu proteinlerin yapısı ve işlevi hakkında bilgi edinmek ve 3B modellerini tahmin etmek için SWISS-MODEL gibi havuzlar yardımıyla hesaplama teknikleri kullanılabilir (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>). Protein Veri Bankası (PDB), proteinlerin ve nükleik asitlerin 175.000'den fazla iyi doğrulanmış, 3B yapısını ve 30.000'den fazla küçük moleküllü ligandı içermektedir [101]. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) ise yaklaşık 200.000 bakteriyel ve arkeal genom ve güncel 150 milyon protein içermektedir [102].

### 2.4.2 Moleküler Yanaştırma

Moleküler yanaştırma, moleküler tanımayı hem yapısal hem de enerjik olarak yani bağlanma afinitesinin tahmini yoluyla anlamlandırıp ve tahmin etmeyi amaçlamaktadır. Küçük bir molekül (ligand) ve bir hedef makromolekül (protein) arasında molekül yanaştırması işlemi gerçekleştirilmektedir. Ancak son on yılda, protein-protein, nükleik asit (DNA ve RNA)-ligand ve nükleik asit-protein yanaştırması gibi farklı moleküler yanaştırma çeşitleri de popüler hale gelmiştir. Açık erişimli Protein Data Bank (PDB) veritabanı, protein yapısı verilerinin en popüler kaynağıdır ve deneysel teknikler kullanılarak elde edilen üç boyutlu atomik koordinatlara erişim sağlar [101]. Ek olarak, PubChem Bileşik Veritabanı [103] ve ZINC [104] gibi açık erişimli veritabanlarında bulunan bileşikler moleküler yanaştırma için ücretsiz olarak kullanılabilir. Sanal tarama, moleküler veri tabanlarından öncü bileşiği ve hit bileşiği bulmak için puanlama işlemine bakarak geleneksel tarama yöntemine kıyasla tarama verimliliğini önemli ölçüde artırmaktadır.

İlaç keşfinde moleküler yanaştırma uygulamalarının rol oynadığı çeşitli birçok alan bulunmaktadır. Mutagenез araştırmalarına yönelik tahminleri kolaylaştırmak için bağlanma hipotezlerinin sağlanması, yapı-aktivite çalışmaları, sanal tarama yoluyla potansiyel liderlerin bulunması, lider optimizasyonu gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Moleküler yanaştırma süreci iki temel aşamadan oluşur: küçük bir molekül olan ligandın konformasyonu, protein bağlanma bölgesi içindeki konumu ve yönünü tahmin etme ve bir puanlama yöntemi kullanılarak pozun kalitesini değerlendirmedir [105].

Bilgisayar destekli ilaç tasarımında önemli noktalardan birisi ise bağlanma cebinin tahmin edilmesidir. Bağlanma cepleri, proteinin işlevselliği ve aktif bölge alanının belirlenmesi hakkında bilgi vermektedir. Bağlantı noktalarını belirlemek amacıyla birçok program kullanılmaktadır; MolDock, potansiyel bağlanma bölgelerini bulmak için entegre bir boşluk algılama algoritması kullanarak bölgeleri tespit etmektedir [106]. Bir diğer program olan DoGSiteScorer, bağlanma bölgesinin küçük ilaç benzeri molekülle etkileşime girme potansiyelini belirleyen bir algoritmadır [107]. Ayrıca, olası cepleri ve bunların ilaç potansiyeli puanlarını da hesaplamaktadır.

Ters yanaştırma yönteminde ise, prob olarak bir küçük molekülle ligandı birden fazla reseptöre yerleşerek yeni hedefleri belirlemektedir. Prob, potansiyel bağlanma boşluklarını bulmak için kullanılır ve böylece ilaçların potansiyel hedefleri bu şekilde tahmin edilmektedir [108].

### **2.4.3 Moleküler Dinamik Simülasyon Analizi**

Moleküler bir sistemin yapısal, dinamik ve termodinamik özellikleri hakkında daha fazla bilgi edinmeyi hedefleyen simülasyon yöntemi moleküler dinamik (MD) olarak bilinmektedir. Bu sistem genellikle bir protein, bir enzim veya bir membrandan oluşan bir çözücüye (su veya elektrolit) daldırılmış bir lipid topluluğudur [12]. Bir bilişim teknolojisi olarak kullanılan bu analiz metodu, moleküllerin zaman içindeki hareketlerini analiz etmek için kullanılmaktadır. Konformasyonel integrali bulmak için farklı durumlardan oluşan bir sistemden zamana bağlı örnekler alınmaktadır [109]. Klasik hareket denklemlerini içeren simülasyonla ilgili yörüngeler, belirli bir zaman ve kompleks için simüle edilen sistemin farklı özelliklerinin yorumlanmasına yönelik bir grafik şeklinde görselleştirilmiş çıktılar sağlamaktadır [110]. Newtonian mekanikte tanımlanmış hareket denklemlerine göre hareket eden bir dizi parçacık, moleküler mekanik sistemi olarak bilinmektedir. Atomik hareketlerinin simülasyonun hesaplamalarında genellikle kuantum dinamiğinin etkileri karmaşıklığı gidermek

amacıyla göz ardı edilmektedir [111]. MD simülasyon yörünge analizinde, ortalama karekök sapması (RMSD) simülasyon anındaki referans yapıya göre atomların ortalama yer değiştirmesini hesaplayarak protein yapısının tutarlılığı belirlenmektedir. Ayrıca, AMBER [112], OPLS [113], GROMOS ve CHARMM [114] gibi birçok kuvvet alanları MD simülasyonunda kullanılmaktadır [115]. Proteinlerin doğası gereği dinamik yapıda olması ve çeşitli konformasyonel değişikliklere uğrama potansiyeli ligand tasarlama aşamasında göz önünde bulundurulması gereken önemli unsurlardandır. Ligand ve ligandın proteindeki bağlanma bölgesi ile uyum ve tamamlayıcılığı, yan zincirlerinin hareketlerini içeren küçük konformasyon değişikliklerinden etkilenebilmektedir [116]. MD simülasyonu, bir ligandın etkinliğini veya diğer özelliklerini iyileştirmek için modifiye edildiği önder bileşik optimizasyonunda özellikle kullanılan metodlardan birisidir. Niteliksel düzeyde, simülasyonlar ligand optimizasyon sürecini yönlendirmek için bir ligandın bağlanma cebi ile yaptığı temel etkileşimlerin belirlenmesinde, bir ligand tarafından indüklenen bağlanma cebinin yeniden düzenlenmelerini tahmininde veya potansiyel ligand pozlarını test etmek ve hassaslaştırmak için kullanılmaktadır [117]. MD simülasyonu ile oluşturulan ortam, mikroskopik sistemleri, maddenin makroskopik özelliklerini zaman ve uzayda yansıtabilmektedir. Bu teknoloji sayesinde, çözücüdeki pH, sıcaklık ve basınç gibi değişen çeşitli deneysel koşullara uygun sistemler modellenmektedir. Simüle edilebin deneysel ortamın kontrol edilebilirliğine göre, protein-ligand etkileşimleri hakkında bilgiler sağlanmaktadır [13].

# 3

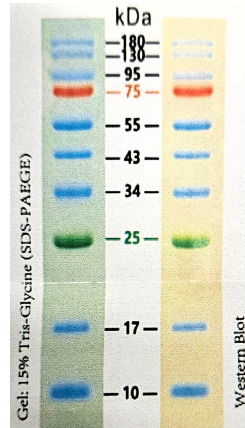
## MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1 Materyal

#### 3.1.1 Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Takara Bio Europe tarafından geliştirilen HisTALON® Gravity kolonu (Clontech Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada), ifadesi tamamlandıktan sonra *Ta*LDH'ı saflaştırmak için kullanılmıştır.

GeneMarkBio (Tayvan) tarafından geliştirilen GenColor Prestained Protein Marker sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) *Ta*LDH'ın molekül ağırlığının saptanması için kullanılmıştır. Şekil 3.1'de protein marker bantlarının hangi kDa aralığında olduğu verilmiştir.



Şekil 3.1 GenColor prestained protein marker

Sigma-Aldrich ReagentPlus® sodyum piruvat ve Roche NADH *Ta*LDH'ın aktivite ve inhibisyon analizlerinde sırasıyla substrat ve kofaktör olarak kullanılmıştır.

#### 3.1.2 Mikrobiyal Büyüme Besiyeri, Tamponlar ve Çözeltiler

##### Amfisilin (100 mg/ml):

Amfisilin stoğu hazırlamak için 100 mg amfisilin tartıldıktan sonra son hacim 1

ml olacak şekilde distile su eklenerek hacme tamamlanır ve filtre ile sterilizasyonu sağlanır. -20°C buzdolabında muhafaza edilir.

#### **IPTG (İzopropil- $\beta$ -D-1-tiyogaltopiranosid) :**

100 mM IPTG stoğu hazırlamak için 23,83 mg IPTG tartıldıktan sonra son hacim 1 ml olacak şekilde distile su eklenerek hacme tamamlanır ve filtre ile sterilizasyonu sağlanır. -20°C buzdolabında muhafaza edilir.

#### **LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri:**

LB sıvı besiyeri hazırlanması için gereken bileşenler ve miktarları Tablo3.1'de verilmiştir. Tartılan bileşenler sulandırıldıktan sonra otoklav cihazında 121°C'de sterilizasyon yapılır.

**Tablo 3.1** LB sıvı besiyeri

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
Maya Ekstraktı	5 g/l
Tripton	10 g/l
NaCl	10 g/l

#### **LB agar:**

LB agar hazırlanması için gereken bileşenler ve miktarları Tablo3.2'de verilmiştir. Tartılan bileşenler sulandırıldıktan sonra otoklav cihazında 121°C'de sterilizasyon yapılır.

**Tablo 3.2** LB agar

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
Maya Ekstraktı	5 g/l
Tripton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

#### **SDS-PAGE Jel Elektrofrez:**

SDS-PAGE jel elektrofrezinde iki çeşit jel bulunmaktadır. Ayırma ve yükleme jeli için gerekli bileşenler ve miktarları Tablo 3.3'te verilmiştir.

#### **SDS-PAGE Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB) :**

Son hacim 10 ml olacak şekilde hazırlanan SDS-SAB bileşenler ve miktarları Tablo 3.4'te verilmiştir.

**Tablo 3.3** SDS-PAGE elektroforez jelleri

SDS-PAGE Ayırma Jeli (% 12)		SDS-PAGE Yükleme Jeli (% 4)	
Bileşenler	Miktar	Bileşenler	Miktar
dH <sub>2</sub> O	3,35 ml	dH <sub>2</sub> O	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
% 10 SDS	100 µl	% 10 SDS	50 µl

**Tablo 3.4** SDS-PAGE örnek uygulama tamponu

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

#### **5X SDS-PAGE Tank Tampon Stok Solüsyon:**

Bütün bileşenler Tablo 3.5 gösterildiği gibi eklendikten sonra hacim distile su ile 1 l'ye tamamlanır. SDS-Page elektroforez tankında kullanılmak üzere distile su ile seyreltilerek 1 X TAE(Tris-asetat-EDTA) hazırlanmaktadır.

**Tablo 3.5** 5X SDS-PAGE tank tampon stok solüsyon

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

#### **Protein Boyama Çözeltisi:**

%0,1 Coomassie brillant mavisi, % 40 metanol, % 10 glasiyal asetik asit, bileşenleri ile hazırlanmıştır.

#### **Boya Uzaklaştırıcı Çözelti:**

Boya uzaklaştırıcı çözelti hazırlığında %5 metanol, %7 asetik asit bileşenleri kullanılmıştır.

Boya uzaklaştırıcı çözeltisi kullanıldıktan sonra aktif karbon kullanılarak Coomassie Brillant mavisinin çökeltilerek yeniden kullanılabilir. Çözelti, peçete ya da filtre kağıdı yardımı ile süzülerek tekrar kullanılabilir.

### **Stok Substrat Piruvat Solüsyonu:**

0.5 M piruvat stok çözeltisi için 55,02 mg piruvat tartılır ve 1 ml distile su ile çözündürülür. Aktivite tayininde kullanılmak üzere stok substrat çözeltisi hazırlanmıştır.

### **Stok Kofaktör $\beta$ -NADH Solüsyonu:**

0,05 M  $\beta$ -NADH stok çözeltisi için 35,47 mg  $\beta$ -NADH tartılır ve 1 ml distile su ile çözündürülür. Aktivite tayininde kullanılmak üzere stok kofaktör çözeltisi hazırlanmıştır.

### **Tris-KCl Tamponu :**

50 mM Trizma Base için 0,6057 g Trizma Base tartılmış olup, ardından 50 mM KCl için 0,3727 g KCl tartılmıştır. Tartılan bileşenler 100 ml distile su ile çözündürülüp, pH: 7,5 olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Saflaştırma Tamponları :** Tablo 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 verilen saflaştırma tamponlarının pH'ı NaOH yardımıyla 8,0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

**Tablo 3.6** Lizis tamponu

<b>Lizis tamponu (500 mililitre)</b>	
Bileşenler	Miktar
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,99 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM NaCl	8,77 g NaCl
10 mM imidazole	0,34 g imidazole

**Tablo 3.7** Dengeleyici tamponu

<b>Dengeleyici tampon (500 mililitre)</b>	
Bileşenler	Miktar
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,99 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM NaCl	8,77 g NaCl
10 mM imidazole	0,34 g imidazole

Deneylerde kullanılan cihazlar Tablo 3.10'da verilmiştir. Tabloda verilen çalkalamalı inkübatör *in vitro* deneyler esnasında hücre kültürünün büyümesi için uygun sıcaklığı ve homojenizasyonu sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Soğutmalı santrifüj ise süpernatant ve pelleti ayırmak için kullanılmıştır. Geliştirilen hücre kültürünün optik yoğunluğu UV Visible Spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

**Tablo 3.8** Yıkama tamponu

<b>Yıkama tamponu (500 mililitre)</b>	
Bileşenler	Miktar
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,99 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM NaCl	8,77 g NaCl
20 mM imidazole	0,68 g imidazole

**Tablo 3.9** Elüsyon tamponu

<b>Elüsyon tamponu (500 mililitre)</b>	
Bileşenler	Miktar
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,99 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM NaCl	8,77 g NaCl
150 mM imidazole	5,1 g imidazole

Deneyler sırasında hazırlanan bütün tamponların pH ayarlamaları pH metre ile yapılmıştır. Kullanılan sıcaklığa duyarlı malzemeler +4°C, -20°C, -80°C buzdolaplarında muhafaza edilmiştir. Rekombinant protein üretim aşamalarında proteinin denatüre olma riskini en aza indirmek amacıyla buz üzerinde çalışmalar yürütülmüştür. Deneyler sırasında kullanılan bütün malzemelerin sterilizasyonu için otoklav cihazı kullanılmıştır. Ultrasonikasyon hücreleri yüksek ses dalgaları aracılığı ile parçalanması aşamasında kullanılmıştır. Mikroplate okuyucu cihazında aktivite, kinetik ve inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.10** Cihaz listesi

<b>Cihaz İsmi</b>	<b>Marka</b>
Çalkalamalı İnkübatör	GFL
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
UV Visible Spektrofotometre	Thermo Scientific
pH Metre	CyberScan
+4°C Buzdolabı	Beko
Vorteks	Heidolph
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Buz Makinası	Optic Ivymen System
-20°C Buzdolabı	Beko
-80°C Buzdolabı	Heto
Hassas Terazî	Ohaus
Otoklav	Systec
Ultrasonikasyon	Bandelin
Mikroplate Okuyucu	Epoch

### 3.1.3 *In silico* Çalışmalarda Kullanılan Bilgisayar Altyapısı

Tez boyunca *in silico* çalışmalar Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü KMD-201/KMD-202 Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarında kurulu 11th Gen Intel® Core™ i7-11700F CPU @ 2.50 GHz işlemci × 16 NVIDIA Corporation GPU, 32 GB RAM donanımına sahip bilgisayar kullanılmıştır.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz İfadesi

*Ta*LDH ifadesi için -80°C derin dondurucuda bulunan, pLATE31 ifade vektörüne klonlanmış [118] *Ta*LDH genini içeren *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ve gen bulundurmayan negatif kontrol *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri sürme ekim yöntemi ile LB agarlara ekilmiştir ve 37°C de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda agarda bulunan tek kolonilerden seçim yapılarak gen bulunan *E. coli* hücreleri içerisinde amfisilin bulunan 5 ml LB sıvı besiyerine pasajlanmıştır. Gen bulundurmayan *E. coli* hücreleri ise 5 ml LB sıvı besiyerine kontrol olarak pasajlanmıştır. Çalkalamalı inkübatörde 37°C lik sıcaklık altında 180 rpm hızda gelişmeye bırakılan hücrelerden alınan örneklerin UV visible spektrofotometre cihazında 600 nm’de optik yoğunluk absorbansı ölçülmüştür. Absorbans değeri 0,5-0,6 aralığında olduğunda 50 ml LB besiyerine son konsantrasyonu 0,5 mM olan IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) eklenmiş ve hücrelerin indüklenmesi sağlanmıştır. Kontrol hücre kültürü indüklenmemiştir. İndüklenen hücre kültürü inkübasyon sıcaklığı 25°C’ye ayarlanmıştır. İnkübasyon devam ederken 16 saat sonrasında 2x25 ml örnekler toplanmıştır ve +4°C, 5000 rpm hız koşullarında 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernant ve pellet birbirinden ayrılmıştır, pelletler kullanılan 3 ml 50 mM Tris-KCl (pH 7,5) tamponu ile çözümlenerek %50 güçte 10 saniye sonikasyon 10 saniye bekleme süresinden oluşan 9 döngüde 3 dakika süreyle sonikasyonu sağlanmıştır. Sonikasyon sonucu örnekler +4°C, 5000 rpm hız koşullarında 20 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernantlar ve pelletler santrifüj sonrasında ayrı tüplere alınmıştır [118].

### 3.2.2 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez Analizi

SDS-PAGE jel elektroferez yöntemini uygulamak için BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra Cell jel elektroferez sistemi kullanılmıştır. SDS-PAGE hazırlık aşamasında iki adet jel hazırlanmıştır. %4’lük yükleme jeli ve %12’lik ayırma jeli bileşenleri Tablo 3.3 de verilmektedir. Dikey sistemde

yürütülen SDS-PAGE için hazırlanan %12'lik ayırma jelinin alt bölümde polimerleşmesi tamamlandıktan sonra %4'lük yükleme jeli üstte kalacak şekilde polimerleştirilmiştir. Sonikasyon sonrasında elde edilen örneklere süpernatant ve pellet ayrı tüplerde olacak şekilde 1:1 oranında SDS-PAGE yükleme tamponu eklenerek 5 dakika kaynar su buharında bekletilmiştir. Hazırlanan dikey jel sistemindeki kuyulara örnekler yüklenmiştir. 1x Tank tamponu eklendikten sonra SDS-PAGE sistemi 80 V'da çalıştırılmıştır ve örnekler jelin sonuna gelene kadar yürütülmüştür. Yürütülen örneklerin analizi için jeller boyama çözeltisi içerisinde 65°C'de yarım saat bekletilmiştir. Boya uzaklaştırıcı çözelti yardımıyla örneklerin bantları görüntülenerek analiz gerçekleştirilir [119].

### 3.2.3 Kobalt Yüklü TALON® Kolonu ile *Ta*LDH'nin Saflaştırılması

*Ta*LDH'ı saflaştırmak için sırasıyla ifade, sonikasyon ve santrifüj basamaklarından sonra elde edilen hücre lizati kullanılmaktadır. TALON® kolonu (Clontech Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada) ticari olarak satın alınmıştır ve saflaştırma düzeneğine yerleştirilmiştir. İlk olarak, hazırlanan dengeleyici tampondan 10 ml kolondan geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlanmıştır. Hücre lizati kolona yüklenerek ilk süzüntüden örnek toplanmıştır. Lizat tamamen kolondan geçtikten sonra 8 ml dengeleyici tampon kolona yüklenerek tekrar dengelenmesi sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra 7 ml yıkama tamponu kolona yüklenmiş ve 3 yıkama örneği toplanmıştır. 5 ml elüsyon tamponu kolona yüklendikten sonra elüsyon örnekleri 1 ml'lik olacak şekilde toplanmıştır. Elüsyon fraksiyonları tamamlandıktan sonraki aşamada kolona dengeleyici tampon 20 ml olacak şekilde yüklenmiştir ve son basamakta 5 ml distile suyun kolona yüklenmesiyle yıkanmıştır. %20 etanol eklenen TALON® kolon, +4°C buzdolabında tekrar kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Saflaştırma protokolünde kullanılan bütün tamponlar sırasıyla Tablo3.6, 3.7, 3.8 ve 3.9' de verilmiştir [120].

### 3.2.4 *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz'ın Aktivitesinin Belirlenmesi

TALON® kolonu ile saflaştırması yapılan ve yüksek saflıkta elde edilen *Ta*LDH'nin aktivitesinin belirlenmesi için Thermo Scientific UV visible spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. *Ta*LDH aktivitesi NADH'ın NAD<sup>+</sup>'a dönüşümünün 340 nm'de ( $\Delta A_{340}$ /dakika) absorbans değişimi olarak hesaplanmaktadır. 1 ml'lik küvet içerisine Tris-KCl tamponu (pH 7,5), 0,5 M NADH ve 0,05 M piruvat solüsyonundan eklendikten sonra saflaştırma sonucu elde edilen dördüncü elüsyonda bulunan

enzimin de ilave edilmesiyle reaksiyon başladığı için hemen absorbands ölçümü alınmıştır. Aktivite ölçüm çalışmaları oda sıcaklığında yaklaşık 25°C'de gerçekleştirilmiştir [78].

### **3.2.5 *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz ile Stabilizasyon Çalışmaları**

Saflaştırılan *Ta*LDH'in enzim aktivitesinin zamana bağlı düşüşünü kontrol etmek amacıyla stabilizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan fraksiyon örneği 3 ayrı tüpe bölünmüştür ve stabilizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. İlk tüpte stabilizatör eklenmemiş saf *Ta*LDH bulunmaktadır. İkinci ve üçüncü tüplere ise sırasıyla 1 M sükroz ve 6 M etilen glikol stabilizatörleri eklenmiştir. Sonrasında üç tüp *Ta*LDH'in aktivitesi belirli saat aralıklarıyla standart protokol ile ölçülmüştür. Ölçümler üçlü tekrarlar halinde yapılmıştır. Stabilizatör eklenmemiş saflaştırılmadan hemen sonraki yapılan aktivite değeri her bir tüp için referans başlangıç noktası olarak alınmıştır [121].

Aktivite ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş olup, ölçüm dışında enzimler +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.6 FDA Onaylı İlaç Etken Bileşiklerinin *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz'ı Üzerindeki İnhibitör Etkinliğinin Belirlenmesi**

FDA onaylı 21 ilaç etken bileşiğinin inhibitör etkinliğinin *Ta*LDH belirlenmesi amacıyla her ilaç etken maddesi tartılarak 0,01 M stok çözeltiler dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözdürülerek hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakalarda öncelikle enzim aktivitesi ölçülerek, sonrasında her bileşik için üç tekrarlı olacak şekilde inhibisyon etkinliği ölçülmüştür ve % inhibisyon değerleri 3.1'de verilen formül yardımıyla hesaplanmıştır.

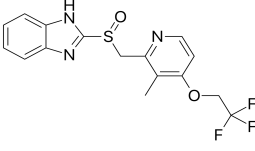
İnhibisyon analizlerindeki reaksiyonlarda 50 mM Tris-KCl (pH:7,5) tampon, reaksiyondaki son konsantrasyonu 200 µM NADH, enzim, inhibitör (her biri DMSO içinde çözülmüş 0,01 M konsantrasyonda 21 Adet FDA onaylı ilaç etken madde) içeren reaksiyon karışımı 25°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, son konsantrasyonu 0,01 M olan piruvat eklenerek 340 nm dalga boyunda, 2 dakika boyunca absorbands ölçümü yapılmıştır. Her ölçümde negatif kontrol kullanılmış olup, inhibitör yerine çözücü olan DMSO eklenmiş ve 3 tekrarlı ölçümler alınmıştır.

$$\%inhibisyon = \frac{\Delta A_{340Kontrol} - \Delta A_{340Reaksiyon}}{\Delta A_{340Kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

%İnhibisyon denklemi 3.1’de verilmiş olup, kontrol negatif kontrol için kullanılan reaksiyonun 340 nm’de ki absorbans farkı  $\Delta A_{340}$  kontrolü ifade ederken, FDA onaylı ilaç etken bileşiklerinin eklendiği reaksiyonların 340 nm’de ki absorbans farkı  $\Delta A_{340}$  reaksiyonu ifade etmektedir.

Kullanılan ilaç etken bileşikleri Tablo 3.11’de sıralı olarak verilmiştir. Bir numaralı proton pompası inhibitörü ilaç sınıfında bulunan Lansoprazol (Chemo Laboratorios Liconsa, S.A., İspanya), antihelmintik ilaç sınıfında yer alan albendazol (SeQuent Scientific Limited, Hindistan) ve prazikuantel (Shanghai Jiayi Pharmaceutical Co., LTD, Çin), solunum sistemi ilaç sınıfında yer alan montelukast sodyum (Unimark Remedies LTD, Vapi, Hindistan), kardiyovasküler sistem ilaçlarından karvedilol (Moehs Catalana, S.L., İspanya) ve, antidepresan sınıfından amitriptilin (Teva Api, İsrail), kardiyovasküler sistem için amlodipin besilate (Prudence Pharma Chem, Hindistan), selektif proton pompası inhibitörü Pantoprazol sodyum (SMS Pharmaceuticals Ltd., India), tip 2 diyabet ilaç sınıfından nateglinide (Cadila Pharmaceuticals Limited, Hindistan), anksiyete bozukluğu ilacı Buspiron hydrochloride (Alkaloida Chemical Company Zrt., Macaristan), Enalapril maleate salt (Sigma-Aldrich, ABD), anti-inflamatuvar Sulfasalazin (Sigma-Aldrich, ABD), analjezik ilaç Paracetamol (Atabay Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş., Türkiye), hipertansiyon ilacı Metoprolol tartrate salt (Sigma-Aldrich, ABD), antibiyotik sınıfında olan Oxytetracycline hydrochloride (Dafeng Huashu Pharmaceutical Co. Ltd. Çin), Metronidazol (Aarti Drugs Limited, Hindistan), Klaritromisin (Zhejiang Guobang pharmaceutical Co. Ltd. Çin), Amoxicillin trihydrate (DSM Sinochem Pharmaceuticals NL, Hollanda), Piperacillin/tazobactam (Sterile India Pvt. Ltd., Hindistan), nonsteroidal anti-enflamatuvar Naproxen sodium (Divis Laboratories Limited, India), proton pompa inhibitörü Omeprazole (Chemo Laboratorios Liconsa, S.A., İspanya) ilaç etken maddeleri kullanılmıştır.

**Tablo 3.11** FDA onaylı ilaç etken bileşikleri ve formülleri

No	İlaç İsmi	Formülü
1	Lansoprazol	

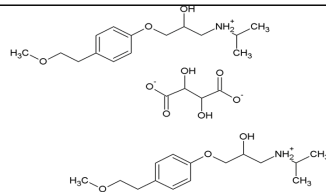
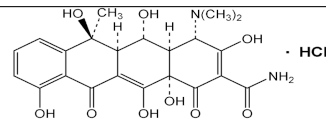
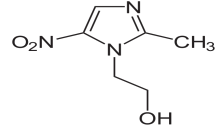
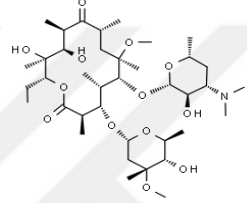
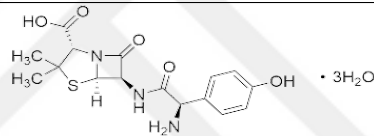
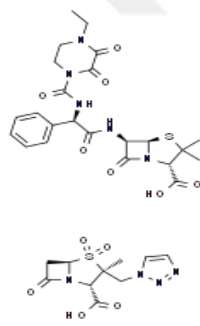
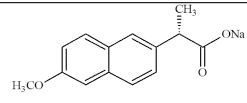
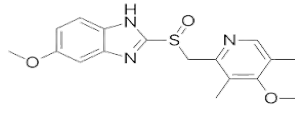
Devamı diğer sayfadadır

**Table 3.11** FDA onaylı ilaç etken bileşikleri ve formülleri (devamı)

No	İlaç İsmi	Formülü
2	Albendazol	
3	Praziquantel	
4	Montelukast sodyum	
5	Karvedilol	
6	Amitriptilin	
7	Amlodipin Besilat	
8	Pantoprazol sodyum	
9	Nateglinid	
10	Buspiron hydrochloride	
11	Enalapril maleate salt	
12	Sulfasalazin	
13	Paracetamol	

Devamı diğer sayfadadır

**Table 3.11** FDA onaylı ilaç etken bileşikleri ve formülleri (devamı)

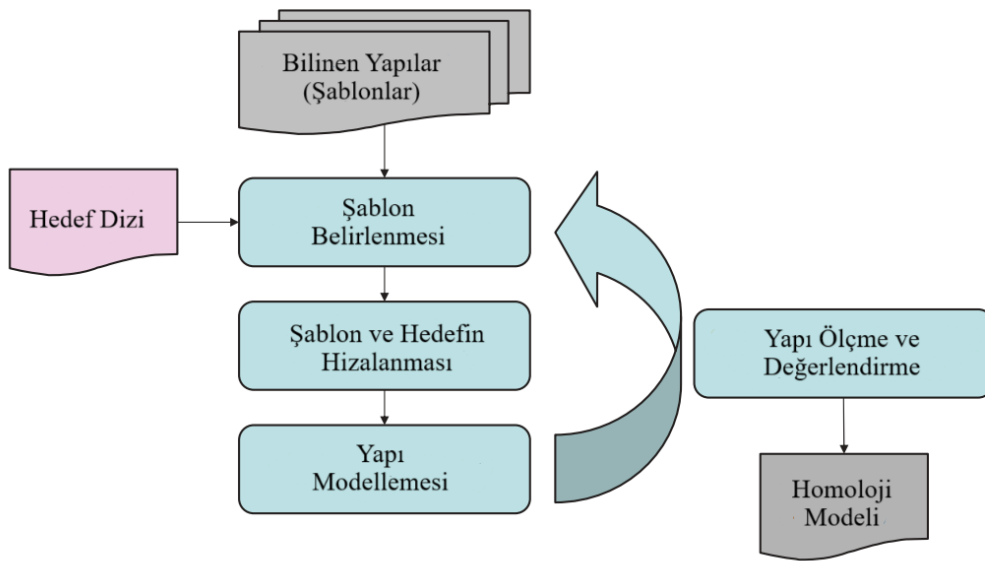
No	İlaç İsmi	Formülü
14	Metoprolol tartrate salt	
15	Oxytetracycline hydrochloride	
16	Metronidazol	
17	Klaritromisin	
18	Amoxicillin trihydrate	
19	Piperacillin/tazobactam	
20	Naproxen sodyum	
21	Omeprazole	

### 3.2.7 *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz'ın Homoloji Modellemesi

Nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını kristalografisi gibi deneysel yöntemlerle yapısı belirlenmiş kalıpların bulunmadığı durumda ilgili proteinlerin yapısı ve işlevi hakkında bilgi sahibi olmak ve 3B protein modellerini oluşturmak

amacıyla hesaplama yöntemleri kullanılmaktadır [122].

Genel olarak, homoloji modellemesi dört ana aşamadan oluşmaktadır: (i) hedef protein yapısının modellenmesi için şablon/lar olarak kullanılacak deneysel olarak çözülmüş evrimsel olarak hedef ile ilişkili protein yapılarının belirlenmesi; (ii) hizalama ve manuel ayarlama yoluyla hedef dizinin ve şablon yapılarının karşılık gelen kalıntılarının eşleştirilmesi; (iii) üç boyutlu bir model oluşturulması ve (iv) elde edilen modelin kalitesinin değerlendirilmesi [123]. Şekil 3.2’de bu homoloji modellemesi aşamaları gösterilmektedir. *Ta*LDH’in homoloji modellemesi için bu adımlar takip edilmiştir.



Şekil 3.2 Homoloji modelleme basamakları [123]

*Ta*LDH’in 3B kristal yapısı deneysel yöntemlerle belirlenmediği için homoloji modellemesinde kalıp proteinlerin seçilmesinde NCBI/BLAST kullanılmıştır. Erişim numarası ADG45564.1 olan *Ta*LDH’in amino asit dizisinin FASTA formatı ile PDB (Protein Data Bank)’de bulunan proteinler üzerinde PSI-BLAST taraması yapılmıştır. Tarama sonucu çıkan proteinlerin Maksimum skor, Query cover, E-değeri ve yüzde benzerlik oranları incelenerek kalıp proteinler belirlenmiştir. Kalıp protein yapılarının Protein Veri Bankasından (www.rcsb.org) atomik koordinatlarını ve yapıda bulunan ligand bilgilerini içeren PDB dosyaları (*P. falciparum* laktat dehidrogenaz (1U5C) ve *Babesia orientalis* laktat dehidrogenaz (7W8A)) modelleme için kullanılmıştır. *Ta*LDH’in AlphaFold ile tahmin edildiği 3B yapısının PDB dosyası (UniProt erişim numarası A0A3B0N5C5) kullanılmıştır.

Bu tez kapsamında *Ta*LDH için üç adet homoloji modeli oluşturulmuştur. Modellerden iki tanesi SWISS-MODEL web tabanlı sunucu yardımı ile

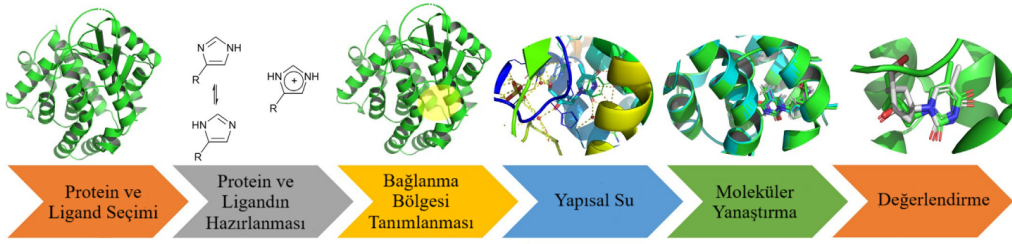
modellenirken, üçüncü model için Modeller v10.4 programı modelleme için kullanılmıştır [124]. Modeller programında kalıp proteinin üç boyutlu yapısının bilgisi ve *Ta*LDH'nin amino asit dizisinin bilgilerinin eşlenmesine dayalı oluşturulan 50 farklı modelleme yapılmıştır. Bu modeller arasından DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) skoru en düşük olan model ileri validasyon analizleri için kullanılmıştır. Kalıp olarak kullanılan ve modellenen proteinlerin üst üste hizalanmasıyla süperimpozisyon hallerinin incelenmesinde ve Ortalama karekök sapması (RMSD) değerlerinin hesaplanmasında ise PyMOL programı kullanılmıştır (The PyMOL Molecular Graphics System, Versiyon 2.5.4 Schrödinger, LLC).

Oluşturulan modellerin validasyonlarının yapılması amacıyla farklı web tabanlı sunucular kullanılmıştır. ERRAT v2.0 sunucusu yardımı ile modellenen yapıların 3B yapısındaki atomların arasında bulunan etkileşimler veya hatalar istatistiksel olarak hesaplanmıştır [125]. ProSa (Protein Structure Analysis) web tabanlı sunucusu ile yapılan validasyon analizlerinde protein yapılarının enerji düzeyleri ve yapının kalitesi hakkında bilgiler vermenin yanı sıra X-ray analizi ve NMR spektroskopisi ile yapılan hesaplamalarla protein yapısının doğrulanması için kullanılmıştır [126]. Ramachandran diyagramları validasyonun son basamağında model proteinler için PROCHECK programı aracılığıyla belirlenmiştir [127].

### **3.2.8 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ın Moleküler Yanaştırması**

DoGSiteScorer sunucusu, kapalı boşlukları, aktif bölge cebini ve ilaçlanabilirlik değerlendirmesini protein plus sunucusundan analiz edilmiştir [128]. *Ta*LDH moleküler yanaştırma analizlerini gerçekleştirmek üzere oluşturulan üç homoloji modeli ile farklı bileşik kütüphaneleri üzerinde analizler yapılmıştır. Bunlar, Enamine (www.enamine.net) anti-bakteriyel bileşik kütüphanesi, PubChem-Metabolit ve PubChem-Bioassay bileşik kütüphaneleri olup yaklaşık 650000 bileşiğin yanaştırması yapılmıştır. Moleküler yanaştırma analizlerinin tümü Maestro version 13.4.134 (Schrödinger Release 2022-4, Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023)'de yapılmıştır. *Ta*LDH modellerinin üçü için belirlenen potansiyel ligand bağlanma bölgelerine bileşik yanaştırması yapılmıştır. Açık ve yarı açık olarak homoloji modellemesi yapılan PDB dosyaları ilk aşamada ProteinPrepWizard [129] aracı ile proteine hidrojen eklemesi yapılmış ve pH 7,4'te protonasyon belirlenerek minimize edilmiştir. Kuvvet alanı olarak OPLS4 seçilmiş ve bütün yanaştırma analizleri bu alan altında yapılmıştır. PubChem PubChem-Bioassay veri bankasından elde edilen bileşiklere ait dosyalar SDF formatında indirilmiş olup, Maestro'daki LigPrep (Schrödinger Release 2022-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) aracı yardımı ile hazırlanmıştır. Yanaştırma yapılacak bölgeler Receptor Grid Generation aracı yardımı ile her

bölgeye ait hacim ve x-y-z koordinatları belirlenmiş ve 3B yapı bilgisini içeren Gridfile dosyası oluşturulmuştur. Yanaştırma basamağında ise Glide (Schrödinger Release 2022-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.) yanaştırma aracı kullanılarak [130], sırasıyla yüksek verimli sanal tarama (HTVS), standart hassasiyet (SP) ve ekstra hassasiyet (XP) yanaştırma modları kullanılarak moleküler yanaştırma yapılmıştır. Sanal tarama (XP modu) sonunda ise en iyi bileşikler XP GScoreları baz alınarak sıralanmıştır. Ardından, ADME değerlerine ve Lipinski'nin beş kuralına uymayan bileşikler elenmiştir (QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023). Şekil 3.3'te genel bir moleküler yanaştırma akışı diyagramı verilmiştir.



Şekil 3.3 Genel moleküler yanaştırma basamakları [105]

Moleküler yanaştırma analizleri sonucunda hesaplanan XP-Gscore, 3.1, 3.2 ve 3.3'te verilen denklemlere göre hesaplanmaktadır. Denklemlerde  $E_{coul}$  Coulomb enerjisini,  $E_{vdW}$  Van der Waals enerjisini,  $E_{hyd\_enclosure}$  hidrofobik çevreleme,  $E_{hb\_nn\_motif}$  özel nötr nötr hidrojen-bağ motif,  $E_{hb\_cc\_motif}$  özel yüklü-yüklü hidrojen-bağ motif, EPI pi istifleme ve pi-kasyon etkileşimlerinin,  $E_{hb\_pair}$  çift hidrojen bağı,  $E_{phobic\_pair}$  lipofilik çifti enerjilerini, Edesolv ve Eligand\_strain ise sırasıyla çözücü etkisini ve ligand gerilme enerjilerini temsil etmektedir [130, 131].

$$XP_{GlideScore} = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bind} + E_{penalty} \quad (3.2)$$

$$E_{bind} = E_{hyd-enclosure} + E_{hb-nn-motif} + E_{hb-cc-motif} + E_{PI} + E_{hb-pair} + E_{phobic-pair} \quad (3.3)$$

$$E_{penalty} = E_{desolv} + E_{ligand-strain} \quad (3.4)$$

### 3.2.9 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ın Moleküler Dinamik Simülasyon Analizleri

Homoloji modellemesi yapılan üç modelin moleküler yanaştırma analizi tamamlandıktan sonra her model için bileşikler yanaştırma skoru sonuçlarına göre sıralanmıştır. Yapılan tüm moleküler dinamik simülasyon analizleri Desmond programı (Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New

York, NY, 2023. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2023) ile gerçekleştirilmiştir. AlphaFold modeli için 17 bileşiğin moleküler dinamik (MD) simülasyon analizi yapılırken *TaLDH-1U5C* (*P. falciparum*) modeli için 10 bileşiğin, *TaLDH-7W8A* (*B. orientalis*) modeli için 10 bileşiğin MD simülasyonu yapılmıştır.

Analizler öncesinde ligand ve modelin doğru konumları ve pozu 10 Å ortorombik kutu içerisine yerleştirilmiş ve sistem TIP4PEW su modeli ile doldurulmuştur. Enzim-ligand etkileşiminin fizyolojik koşullar altında simülasyonu için 150 mM konsantrasyona uygun olarak sodyum ve klorür iyonları eklenmiş ve tüm sistem OPLS4 kuvvet alanı altında hazırlanmıştır. Enzim-ligand arasındaki kötü etkileşimleri minimuma indirmek için her komplekse 100 ps enerji minimizasyonu yapılmıştır. Enerji minimizasyonu sonrasında ise MD simülasyon analizleri NPT (izobarik-izotermik) topluluk sınıfında 300 K ve 1 bar basınçta 100 ns süre boyunca yapılmıştır [132]. Simülasyon sırasında her 100 ps'de trajectory kaydedilmiş ve 1000 frame oluşturulmuştur.

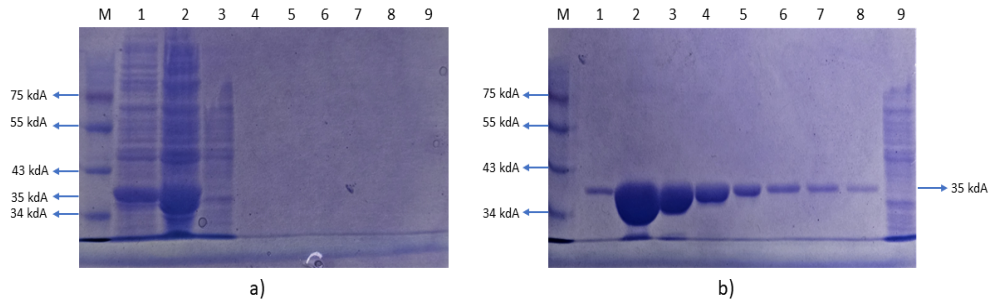
# 4

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ını Kodlayan Genin İfadesi ve Enzimin Saflaştırılması

Lac operon, *E. coli* için kullanılan birçok ifade sisteminden biridir. Karşılıksız bir indükleyici olan İzopropil- $\beta$ -d-1-tiyolgalaktopiranosid, laktozun sentetik bir analogu olduğu için protein ekspresyonu için yaygın olarak kullanılır. Lac represörünü bağlar ve DNA transkripsiyonuna izin veren operatörü serbest bırakır [133]. *Ta*LDH ifadesi için 0,5 mM olan IPTG ve hücrelerin indüklenmesi sağlanmıştır. İndüklenen hücre kültürünün inkübasyonu 25°C sıcaklıkta 16 saat boyunca devam etmiştir.

*Ta*LDH'ı saflaştırmak için sırasıyla ifade, sonikasyon ve santrifüj basamaklarından sonra elde edilen hücre lizati kolona yüklenmiş olup TALON® kolonu (Clontech Laboratories, Inc., Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada) ile saflaştırma protokolüne uygun bir şekilde bütün tamponlar sırasıyla Tablo3.6,3.7,3.8 ve 3.9' verilen sırayla kullanılmıştır [120].



**Şekil 4.1** İfade edilen *Ta*LDH'ın saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel elektroforez analizi sonucu; a) Hat M: protein ladder marker; Hat 1 ve 2: hücre içeren süpernatant; ve pellet; Hat 3 :ilk süzüntü; Hat 4, 5 ve 6: yıkama 1, yıkama 2, yıkama 3 örnekleri; b) Hat M: protein ladder marker; Hat 1,2,3,4,5,6,7,8: elüsyon fraksiyonları; Hat 9: ilk süzüntü

İfade edilen *Ta*LDH'ın analizi için SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılmıştır.

Protein ifadesi sonrasında elde edilen hücre lizati ve pelletine ek olarak saflaştırma sonrasında elde edilen bütün elüsyon, yıkama ve ara basamaklardan toplanan örnekler SDS-PAGE jeline yüklendikten sonra yürütülmüştür. Peptide Property Calculator [134] web tabanlı sunucusu ile moleküler ağırlığı 35221,32 g/mol (35,22 kDA) olarak hesaplanmıştır.

SDS-PAGE jel elektroforezi sonucu elde edilen jel görüntüleri 4.1'de verilmektedir. 4.1a'da verilen jel görüntüsünde yıkama örneklerinde proteinn kaybının olmadığı görülmektedir. 4.1b'de ise 2. hatta yüklenen 2. elüsyon fraksiyonu sonucu %95 saflıkta ve yüksek konsantrasyonlu saf *Ta*LDH varlığı tespit edilmektedir. Saflaştırılan *Ta*LDH, ileriki adımlardaki stabilizasyon ve inhibisyon çalışmalarında kullanılmıştır. Yüksek saflıkta elde edilen rekombinant *Ta*LDH *in silico* analizlerden tespit edilecek potansiyel inhibitör adaylarının inhibisyon çalışmalarında kullanılacaktır.

#### **4.1.1 *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz'ı ile Stabilizasyon Çalışması**

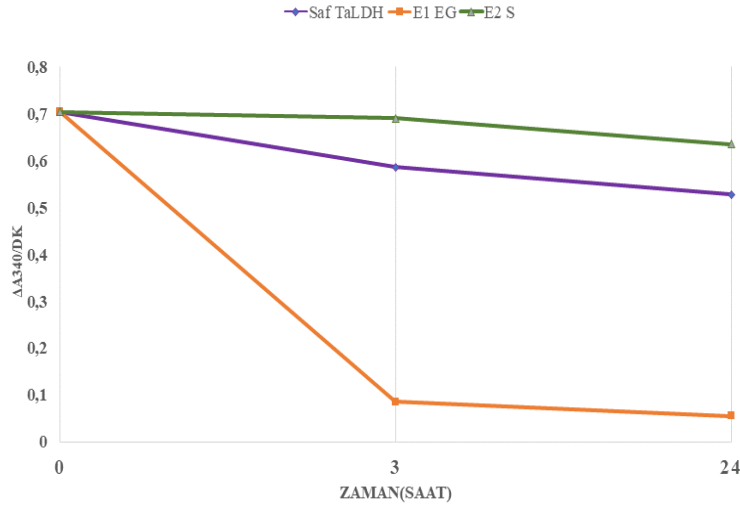
Enzimlerin, uygun sıcaklık ve pH aralığında ve belirli konsantrasyonlarda gliserol, sükroz veya benzer bir stabilizatör varlığında saklanması gerekmektedir. Bu uygulama enzimlerin aktivitesinin korunması ve agregasyon oluşmaması için gereklidir [135]. Ayrıca, trehaloz ve sukroz gibi şekerler, depolama ve liyofilizasyon sırasında proteinleri korumak için sıklıkla kullanılmaktadır [112].

*Ta*LDH ile yapılan çalışmalarda aktivitesi ile ilgili optimum pH ve termostabiletesi belirlenmiştir [118], fakat saflaştırıldıktan sonra aktivesini ne kadar süreyle muhafaza ettiği bilinmemektedir. Bu nedenle 2 farklı stabilizatörün aktivitenin zamanla olan değişimine olan etkisi incelenmiştir. Stabilizatörler etilen glikol ve sükrozdur. Etilen glikol, suda çözünür bir polimerdir ve proteinlere kovalent olarak bağlandığında özelliklerini değiştirmektedir [136]. Saflaştırılan *Ta*LDH'ın aktivitesi saflaştırma sonrası, 3 saat ve 24 saat aralıklar ile ölçülmüş, 6 M etilen glikol eklenmiş enzim ve 1 M sükroz eklenmiş enzim kullanılarak saf enzim ile karşılaştırılmıştır.

Aktivite tayini yapıldıktan sonra elde edilen veriler Tablo 4.1'de verilmekte olup, bu değerler ile oluşturulan grafik Şekil 4.2'de verilmektedir. 6 M etilen glikol eklenmiş enzimin akvitesinde 3 saat sonrasında gözle görülür bir düşüş görülmektedir. 1 M sükroz eklenen enzimin ise 24 saat sonrasında aktivitesinde küçük bir düşüş görülmektedir. Saf enzime oranla 1 M sükroz eklenen *Ta*LDH'ın zamana bağlı ortalama aktivitesinin daha stabil olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.1** +4°C'de, belirli aralıklarla ölçülen ortalama enzim aktiviteleri

Zaman (Saat)	$\Delta A_{340}/dk$		
	0	3	24
Saf TaLDH +4°C	0,7044	0,5863	0,528
E1 Etilen Glikol +4°C	0,7044	0,0849	0,0546
E2 Süzkroz +4°C	0,7044	0,69	0,6351



**Şekil 4.2** TaLDH'ın +4°C'de, belirli aralıklarla ölçülen ortalama enzim aktiviteleri. E1-EG: Etilen glikol eklenmiş enzim çözeltisi, E2-S: Süzkroz eklenmiş enzim çözeltisi

#### 4.1.2 FDA Onaylı İlaç Etken Bileşiklerinin *Theileria annulata*'nın Laktat Dehidrogenaz'ı Üzerindeki İnhibitör Etkinlikleri

Saflaştırılmış TaLDH üzerinde FDA onaylı ilaç etken bileşikleri inhibisyon potansiyellerinin tespiti için reaksiyonda son konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde kullanılmıştır. Her bir bileşik için yapılan üçlü ölçümler ve negatif kontrol ile kıyaslama sonucu aktivite tayini yapılmış ve inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. 6 ilaç etken maddenin (8, 9, 10, 13, 19 ve 21) ise %60 üzerinde gösterdiği inhibisyon değerleri standart hataları ile birlikte Tablo 4.2'de verilmektedir. Buna ek olarak, bileşik kütüphanesinden 20. bileşik olan Naproxen sodyumun %inhibisyon değeri çözünmeden kaynaklanan sorunlar nedeni ile hesaplanamamıştır. %95 üzerinde safılıkta elde edilen TaLDH'ın inhibe edilmesi tezin ana amaçlarından biridir. Öncesinde *Theileria annulata* için yapılan insan kanser ilaçlarının anti-theilerial aktivitesini incelendiği çalışmaya [51] paralel olarak FDA onaylı ilaç etken maddelerinin TaLDH üzerindeki hesaplanan inhibisyon potansiyelleri ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları ile tropikal theileriosisin tedavisine yönelik yeni ilaç

geliştirme çalışmaları için umut vaat etmektedir. Saflaştırılmış *Ta*LDH üzerinde literatürde ilk defa FDA onaylı ilaç etken bileşiklerinin %inhibisyonu *in vitro* olarak tespit edilmiştir. En yüksek %inhibisyon oranına sahip Omeprazol ilaç etken maddesi ileri *Ta*LDH inhibisyon analizlerinde kullanılabilir.

**Tablo 4.2** Bileşiklerin 100 µM konsantrasyonda %enzim inhibisyon değerleri ve standart hataları

Bileşik	%İnhibisyon değeri
1 Lansoprazol	36,65 ± 6,178
2 Albendazol	10,36 ± 1,881
3 Praziquantel	24,09 ± 2,594
4 Montelukast sodyum	23,56 ± 3,628
5 Karvedilol	11,01 ± 1,163
6 Amitriptilin	2,62 ± 0,833
7 Amlodipin Besilat	42,71 ± 4,781
8 Pantoprazol sodyum	60,76 ± 9,584
9 Nateglinid	61,83 ± 1,257
10 Buspiron hidroklorür	66,81 ± 8,228
11 Enalapril maleate salt	45,61 ± 1,089
12 Sulfasalazin	22,82 ± 6,782
13 Paracetamol	65,16 ± 3,471
14 Metoprolol tartrate salt	57,65 ± 8,838
15 Oxytetracycline hydrochloride	48,41 ± 6,251
16 Metronidazol	54,44 ± 1,118
17 Klaritromisin	51,79 ± 5,642
18 Amoxicillin trihydrate	51,16 ± 10,876
19 Piperacillin/tazobactam	61,13 ± 9,947
20 Naproxen sodyum	N.D.b
21 Omeprazol	73,36 ± 5,894

#### 4.2 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ının Homoloji Modellemesi ve Optimizasyonu

*Ta*LDH'in *in silico* analizleri için üç adet homoloji modeli tasarlanmıştır. Model tasarımında ilk sırada şablon olarak; *Babesia orientalis*'in laktat dehidrogenazı (PDB ID: 7W8A\_A) seçilmiş ve homoloji modeli *Ta*LDH-7W8A olarak adlandırılmıştır. İkinci model için AlphaFold Erişim No:A0A3B0N5C5 protein şablonunu kullanılmış ve tasarlanan homoloji modeli *Ta*LDH-AlphaFold olarak

adlandırılmıştır. Üçüncü modelde şablon yapı olarak *Plasmodium falciparum* laktat dehidrogenazı (PDB ID:1U5C\_A) seçilip, tasarlanan homoloji modeli *TaLDH-1U5C* olarak adlandırılmıştır.

Oluşturulan üç farklı *TaLDH* homoloji modellerinin ileri moleküler yanıştırma analizlerinden önce validasyonu yapılmıştır. ProSa (Protein Yapı Analizi) web tabanlı sunucusu ise modellenen protein yapılarının enerji düzeyleri ve yapının kalitesi hakkında bilgilere ek olarak X ışını kristalografisi ve NMR spektroskopisi ile yapılan hesaplamalarla protein yapısının doğrulanması için kullanılmıştır [126]. Verify3D, homoloji modelinin kendi amino asit dizisi ile uyumluluğunu, konumuna ve çevresine göre belirlemekte olup, deneysel olarak belirlenen iyi yapılar ile karşılaştırılması sonucu hesaplanmaktadır [137].

Geometrik ve enerjik etkiler nedeniyle, farklı atom türleri proteinler arasında rastgele olmayan bir dağılım gösterir. Protein yapısal modellerindeki hata bölgelerinde daha rastgele dağılımlar beklenir. ERRAT analizi, çift yönlü atomik etkileşimlerin istatistiklerini inceleyerek protein kristal yapılarındaki hata bölgelerini tanımlamaktadır [125].

Z-skoru genel modelin kalitesi hakkında bilgi vermektedir ve yapının toplam enerjisinin sapmasını, rastgele konformasyonlardan türetilen enerji dağılımına göre hesaplanmaktadır [126].

Ramachandran diyagramları validasyonun son basamağında model proteinler için PROCHECK programı aracılığıyla belirlenmiştir [127]. Protein modelinin stereokimyasal kalitesi, Ramachandran grafiğine dayanmaktadır. Ramachandran açıları veya konformasyon açıları phi-psi ( $\phi$ - $\psi$ ), bir protein molekülünün polipeptit zincirinin omurgasını belirler. Ramachandran çiziminde bu açılar birbirlerine karşı çizilir [138].

#### **4.2.1 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ının Homoloji Modellemesi ve Optimizasyonu: *TaLDH-7W8A***

İlk aşamada *TaLDH*'in homoloji modellemesine uygun kalıpların seçimi için PCBI/BLAST kullanılmıştır. Erişim numarası ADG45564.1 olan *TaLDH*'in amino asit dizisinin FASTA formatı ile PDB'de bulunan proteinler üzerinde PSI-BLAST taraması yapılmış ve Max. score 449, %97 Query Cover, E değeri  $3e-159$  ve benzerlik oranı %68,25, Çözünürlük değeri 2,671 Å olan apo formunda *Babesia orientalis*'in laktat dehidrogenazının A zinciri seçilmiştir (PDB ID: 7W8A\_A). E değeri referans olarak verilen dizi ve karşılaştırılması yapılan diğer dizilerin hizalanması ile ortaya çıkan rastgele arka plan gürültüsünü ifade etmektedir bu

değer ne kadar küçükse o kadar anlamlıdır. SWISS-MODEL bu kalıbın homoloji modellemesi için kullanılmıştır. Hedef dizinin SWISS-MODEL web tabanlı sunucusuna girilmesi ile model oluşturulmuştur [139]. Şekil 4.3'te PCBI/BLAST sonucu verilmiştir.

Homoloji modellemesi yapılmış *Ta*LDH-7W8A Şekil 4.4'te verilmektedir. Oluşturulan *Ta*LDH-7W8A homoloji modelinin ileri moleküler yanaştırma analizlerinden önce validasyonu yapılmıştır. Validasyon sonuçları Tablo 4.3'te verilmektedir.

Her bir modelin ERRAT v2.0 sunucusu yardımı ile 3B yapısındaki atomların arasında bulunan etkileşimler veya hatalar istatistiksel olarak hesaplanmış [125] olup, Tablo 4.4'te ERRAT program çıktısı verilmiştir.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Chain A_lactate dehydrogenase [Babesia orientalis]	<i>Babesia orientalis</i>	449	449	97%	3e-159	68.25%	330	7W8A_A
<input type="checkbox"/> Chain A_lactate dehydrogenase [Apicomplexa]	<i>Apicomplexa</i>	395	395	98%	4e-138	59.75%	334	4PLC_A
<input type="checkbox"/> Chain A_lactate dehydrogenase [Apicomplexa sp.]	<i>Apicomplexa sp.</i>	364	364	97%	6e-126	58.10%	330	6VDH_A
<input type="checkbox"/> Chain A_malate dehydrogenase [Apicomplexa]	<i>Apicomplexa</i>	354	354	98%	6e-122	55.52%	331	4PLT_A
<input type="checkbox"/> Chain A_malate dehydrogenase [Apicomplexa]	<i>Apicomplexa</i>	337	337	98%	3e-115	54.40%	326	4PLH_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate dehydrogenase [Toxoplasma gondii]	<i>Toxoplasma gondii</i>	322	322	97%	2e-109	48.88%	326	3CZM_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate dehydrogenase [Toxoplasma gondii]	<i>Toxoplasma gondii</i>	322	322	97%	3e-109	48.88%	328	1SOV_A
<input type="checkbox"/> Chain A_PROTEIN (L-LACTATE DEHYDROGENASE) [Plasmodium falciparum]	<i>Plasmodium falciparum</i>	319	319	96%	2e-108	51.13%	316	1CEQ_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate Dehydrogenase [Plasmodium falciparum 3D7]	<i>Plasmodium falciparum 3D7</i>	318	318	96%	6e-108	50.80%	316	3ZH2_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate dehydrogenase [Plasmodium falciparum]	<i>Plasmodium falciparum</i>	318	318	96%	7e-108	50.80%	321	1UO_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate dehydrogenase [Plasmodium falciparum]	<i>Plasmodium falciparum</i>	318	318	96%	8e-108	50.80%	322	1T24_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate dehydrogenase [Plasmodium falciparum]	<i>Plasmodium falciparum</i>	318	318	96%	1e-107	50.80%	323	1XIV_A
<input type="checkbox"/> Chain A_PROTEIN (L-LACTATE DEHYDROGENASE) [Plasmodium falciparum]	<i>Plasmodium falciparum</i>	315	315	96%	6e-107	50.80%	316	1CET_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate dehydrogenase [Plasmodium vivax]	<i>Plasmodium vivax</i>	313	313	96%	4e-106	50.00%	316	6TXR_A
<input type="checkbox"/> Chain A_L-lactate dehydrogenase [Plasmodium vivax]	<i>Plasmodium vivax</i>	313	313	96%	4e-106	50.00%	321	2A92_A

Şekil 4.3 *Ta*LDH ve kristalografik olarak 3B yapısı bilinen PDB'de bulunan proteinleri hizalanması sonucu benzerlik oranları

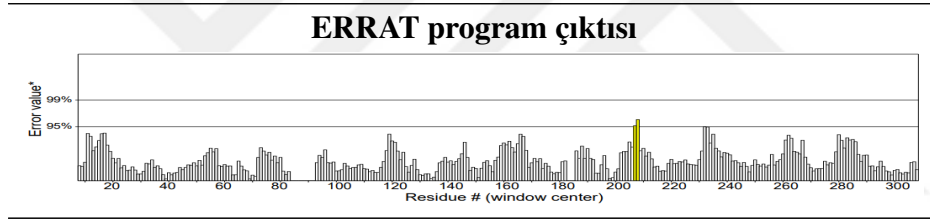
Tablo 4.3 *Ta*LDH-7W8A modelinin validasyon skorları; TEB:tercih edilen bölge, EİVB: ek izin verilen bölge, GİVB: genel izin verilen bölge, İVB: izin verilmeyen bölge

MODEL	ERRAT	VERIFY3D	ProSA	Ramachandran
<i>Ta</i> LDH-7W8A	99,3127	%70,10	-9,9	TEB %92,1 ; EİVB %7,5 ; GİVB %0,4 ; İVB %0,0

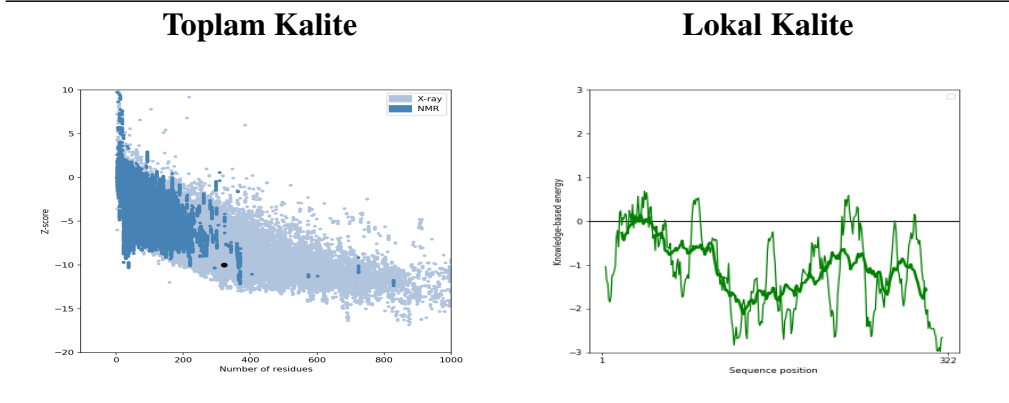


**Şekil 4.4** *Ta*LDH-7W8A homoloji modeli

**Tablo 4.4** *Ta*LDH-7W8A modelinin ERRAT program çıktısı

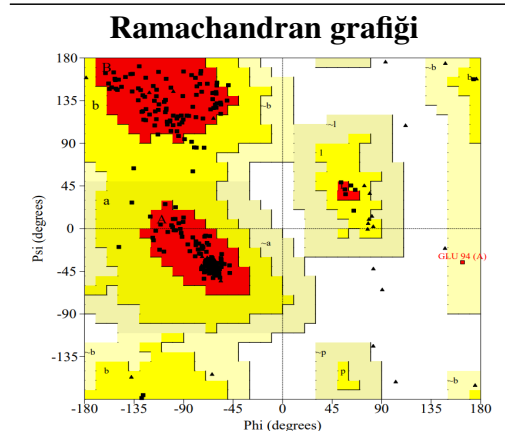


**Tablo 4.5** *Ta*LDH-7W8A modelinin ProSa program çıktısı



Tablo 4.5'te verilen ProSa enerji grafiklerinde amino asit dizisinin pozisyonuna bağlı olarak enerjileri göstermektedir. Bu, yerel model kalitesini gösterir. Genel olarak, pozitif değerler bir modelin sorunlu veya yanlış yönlerini göstermektedir. Tek rezidü enerjilerinin bir grafiği tipik olarak büyük dalgalanmalar içerir ve bu nedenle model değerlendirmesi için sınırlı değer sunmaktadır. Z-skoru *Ta*LDH-7W8A için -9,9 olarak hesaplanmıştır [126].

**Tablo 4.6** *Ta*LDH-7W8A modeline ait Ramachandran grafiği



*Ta*LDH-7W8A modeli için Tablo 4.6’da verilen Ramachandran bölgeleri incelendiğinde amino asit dizisinin %92,1’lik bölümü (246 rezidü) tercih edilen bölgedeyken, ek izin verilen bölgede %7,5 (20 rezidü), genel izin verilen bölgede ise %0,4 (1 rezidü)’ü bulunmaktadır. İzin verilmeyen bölgede ise %0,0 yani hiç rezidü yoktur.

#### 4.2.2 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz’ının Homoloji Modellemesi: *Ta*LDH-AlphaFold

İkinci olarak SWISS-MODEL sunucusunda %98,79 benzerlik oranına sahip, apo formunda 3B yapısı AlphaFold [140] ile tahmin edilmiş Erişim No:A0A3B0N5C5 olan *Theileria annulata* laktat dehidrogenaz SWISS-MODEL ile modellenmiştir. Model Şekil 4.5’te görülmektedir. Hedef protein ile aynı dizi bilgisine sahip AlphaFold şablonunun 3B yapısı deneysel metotlar yerine yapay zeka algoritmaları ile tahmin edilmiştir. Modelin validasyon skorları ise Tablo 4.7’de verilmiştir.

**Tablo 4.7** *Ta*LDH-AlphaFold modelinin validasyon skorları; TEB:tercih edilen bölge, EIVB: ek izin verilen bölge, GIVB: genel izin verilen bölge, İVB: izin verilmeyen bölge

MODEL	ERRAT	VERIFY3D	ProSA	Ramachandran
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	99,0228	%78,2	-10,49	TEB %95 ; EIVB %4,7 ; GIVB %0,4 ; İVB %0,0

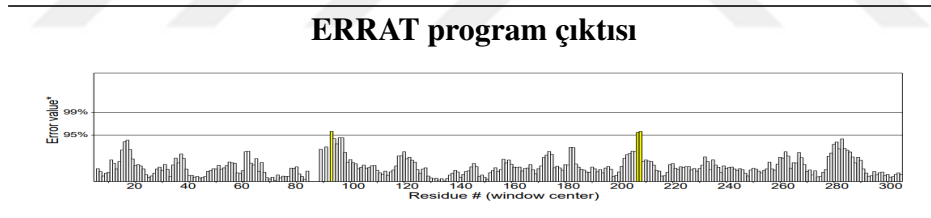
ERRAT v2.0 sunucusu yardımı ile *Ta*LDH-AlphaFold modelinin 3B yapısındaki atomların arasında bulunan etkileşimler veya hatalar istatistiksel olarak hesaplanmış[125] olup, ERRAT program çıktısı Tablo 4.8’de verilmiştir. ProSa



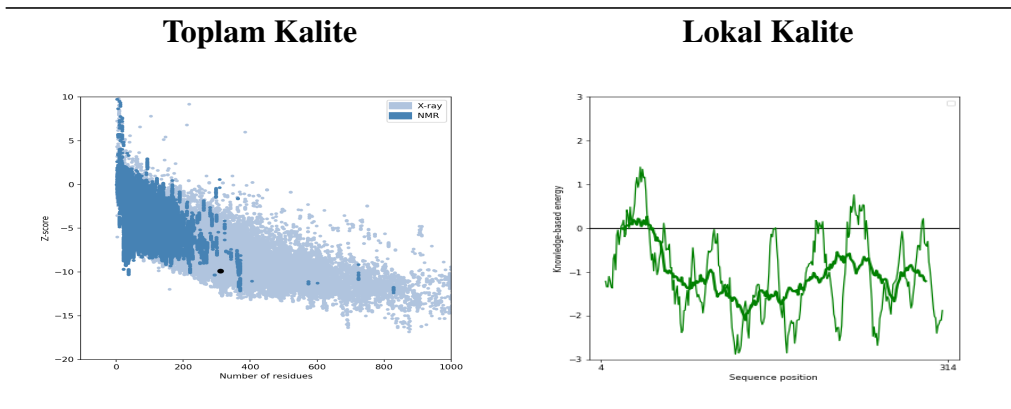
**Şekil 4.5** *Ta*LDH-AlphaFold homoloji modeli

(Protein Structure Analysis) web tabanlı sunucusundan elde edilen program çıktısı Tablo 4.9’da verilmiş olup, hesaplanan Z-skoru *Ta*LDH-AlphaFold için -10,49 [126].

**Tablo 4.8** *Ta*LDH-AlphaFold modelinin ERRAT program çıktısı



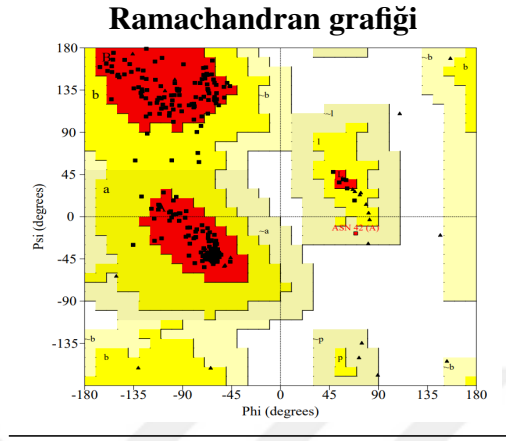
**Tablo 4.9** *Ta*LDH-AlphaFold modelinin ve ProSa program çıktısı



*Ta*LDH-AlphaFold modeli için Ramachandran bölgeleri incelendiğinde amino asit dizisinin %95’lik bölümü (264 rezidü) tercih edilen bölgedeyken, ek izin verilen

bölgede %4,7 (13 rezidü), genel izin verilen bölgede ise %0,4'ü (1 rezidü) bulunmaktadır. İzin verilmeyen bölgede ise %0,0 yani hiç rezidü yoktur Tablo 4.10'da görülmektedir.

**Tablo 4.10** *Ta*LDH-AlphaFold modelinin Ramachandran grafiği



#### 4.2.3 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ının Homoloji Modellemesi: *Ta*LDH-1U5C

Üçüncü model için benzerlik oranı yaklaşık %50 olduğu bilinen *Plasmodium falciparum*'a ait proteinlerin yapıları incelenerek 3B yapısında NAD bulunduran bir *Pf*LDH (PDB ID:1U5C, Çözünürlük 2,65 Å) seçilmiştir, proteine ve *Ta*LDH' ait PCBI/BLAST sonucunda max score 318, Query Cover %96 ve benzerlik oranı %50,8 değerlerine sahip taslak seçilmiştir. Modellemeden önce taslak protein yapısı PyMOL programından incelendiğinde aktif döngüsünde eksik rezidü bölgeleri tespit edilmiş ve eksik rezidüleri Protein Preparation Wizard (Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022.) eksik loop doldurularak tamamlanmıştır. *Ta*LDH dizi bilgisi verilen Modeller v10.4 programı aracılığıyla yapıya NAD dahil edilmiş ve Farklı Optimize Edilmiş Protein Enerjisi (DOPE) ve normalize DOPE (z-DOPE) skorları incelenmiştir. Oluşturulan 50 modelden en düşük DOPE skoruna sahip olan model en iyi olarak seçilmiştir [124]. Tasarlanan *Ta*LDH-1U5C homoloji modeli Şekil 4.6'de verilmektedir.

Oluşturulan *Ta*LDH-1U5C homoloji modellerinin ileri moleküler yanıştırma analizlerinden önce validasyonu yapılmıştır. Validasyon sonuçları Tablo 4.11'de verilmektedir. *Ta*LDH-1U5C modelinin validasyon sonuçlarının optimize edilmesi için enerji minimizasyonu yapılmış YASARA minimization server kullanılmıştır [141].



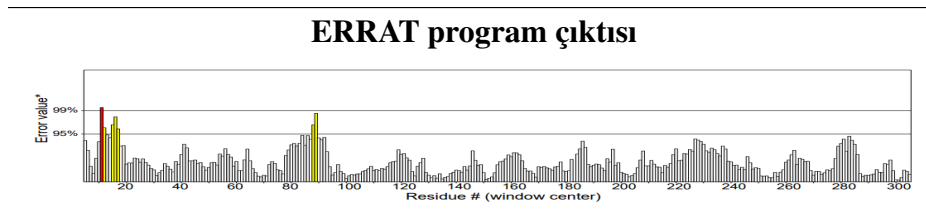
**Şekil 4.6** *Ta*LDH-1U5C homoloji modeli, NAD (pembe)

**Tablo 4.11** *Ta*LDH-1U5C modelinin validasyon skorları; TEB:tercih edilen bölge, EİVB: ek izin verilen bölge, GİVB: genel izin verilen bölge, İVB: izin verilmeyen bölge

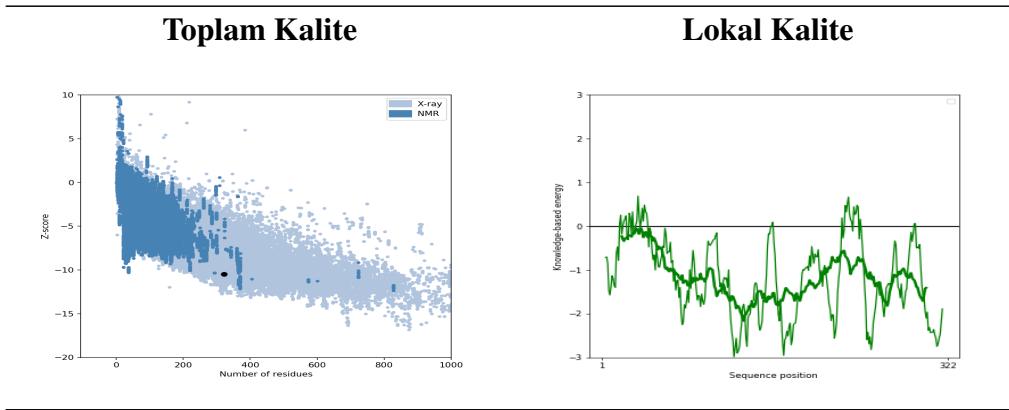
MODEL	ERRAT	VERIFY3D	ProSA	Ramachandran
				TEB %93,2 ; EİVB %6,5 ;
<i>Ta</i> LDH-1U5C	97,7636	%68,63	-10,01	GİVB %0,4 ; İVB %0,0

ERRAT v2.0 sunucusundan alınan program çıktısı Tablo 4.12’de verilmiş olup, 3B yapısındaki atomların arasında bulunan etkileşimler veya hatalar istatistiksel olarak hesaplanmıştır [125]. ProSa program çıktısı Tablo 4.13’ de verilmiş olup, sunucu tarafından hesaplanan Z-skoru *Ta*LDH-1U5C için -10,01’dir [126].

**Tablo 4.12** *Ta*LDH-1U5C modelinin ERRAT program çıktısı

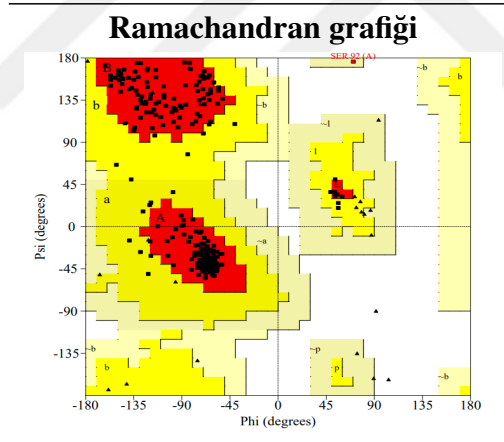


**Tablo 4.13** *Ta*LDH-1U5C modelinin ve ProSa program çıktısı



*Ta*LDH-1U5C modelinin Tablo 4.14'te verilen Ramachandran grafiği incelendiğinde ise amino asit dizisinin %93,2'lik bölümü (259 rezidü) tercih edilen bölgedeyken, ek izin verilen bölgede %6,5 (18 rezidü), genel izin verilen bölgede ise %0,4'ü (1 rezidü) bulunmaktadır. İzin verilmeyen bölgede ise diğer iki model gibi %0,0 yani hiç rezidü yoktur.

**Tablo 4.14** *Ta*LDH-1U5C modelinin Ramachandran grafiği



#### 4.2.4 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ının Homoloji Modellerinin Süperimpozisyonu

Modellenen proteinlerin üst üste hizalanmasıyla süperimpozisyon hallerinin incelenmesinde ve Ortalama karekök sapması (RMSD) değerleri PyMOL programından hesaplanmıştır. *Ta*LDH-7W8A ve *Ta*LDH-1U5C modeli RMSD değeri 0,852 iken, *Ta*LDH-AlphaFold ve *Ta*LDH-1U5C modelinin RMSD değeri 0,880, *Ta*LDH-7W8A ve *Ta*LDH-AlphaFold modelinin RMSD değeri 0,533 olarak hesaplanmıştır (The PyMOL Molecular Graphics System, Versiyon 2.5.4 Schrödinger, LLC). *Ta*LDH'in homoloji modellerinin süperimpozisyonu Şekil 4.7'de verilmiştir.

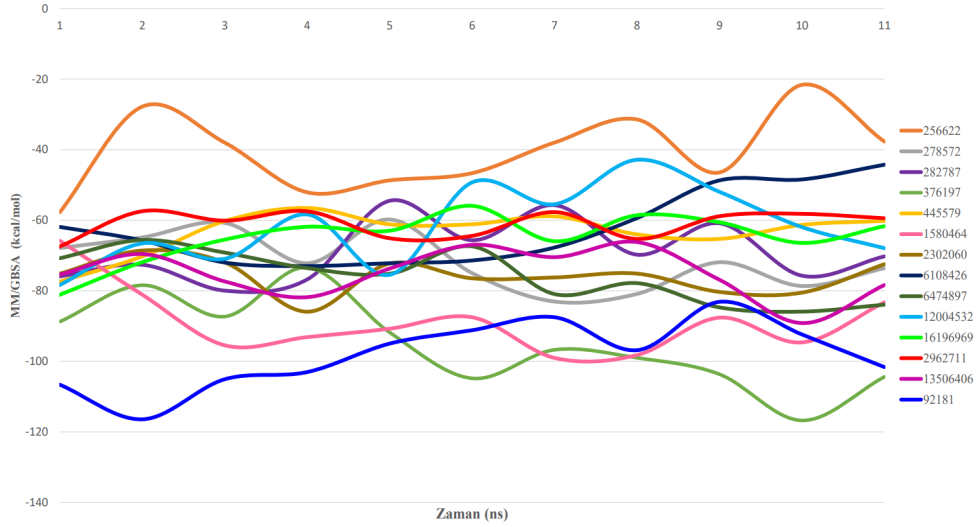


**Şekil 4.7** TaLDH homoloji modellerinin süperimpozisyonu: TaLDH-7W8A mavi; TaLDH-AlphaFold yeşil; TaLDH-1U5C-NAD kompleksi; TaLDH-1U5C pembe, NAD turuncu

### **4.3 *Theileria annulata* Laktat Dehidrogenaz'ının Moleküler Yanaştırma Çalışmaları ve Moleküler Dinamik Simülasyonu**

Oluşturulan modeller üzerinde farklı bileşik kütüphaneleri ile moleküler yanaştırma çalışmaları yapılmıştır. Bunlar, Enamine ([www.enamine.net](http://www.enamine.net)) anti-bakteriyel bileşik kütüphanesi, PubChem-Metabolit ve PubChem-Bioassay bileşik kütüphaneleri olup yaklaşık 650000 bileşiğin yanaştırması yapılmıştır. Bu kütüphaneler ile yapılan moleküler yanaştırma sonuçlarına göre en iyi skorlar PubChem-Bioassay bileşik kütüphanesi ile elde edilmiştir. Moleküler yanaştırma analizlerinin ardından üç modelin her biri için bileşikler XP skorlarına göre sıralanmış olup moleküler dinamik simülasyonu analizleri için toplam 37 bileşik seçilmiştir. Tablo 4.15, 4.16 ve 4.17'de modellere ait XP Gscore, XP Hidrojen bağı ve MM/GBSA (Molecular Mechanics, the Generalized Born model and Solvent Accessibility)  $\Delta G$  bağlanma enerjisi değerleri verilmektedir.

Gerçekleştirilen tüm MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerji hesapları için Schrödinger paketlerinde bulunan Prime/Desmond modülünün `thermal_mmgsa.py` python betiği kullanılmıştır. Simülasyon analizlerinden elde edilen trajectory (yörünge) dosyaları anlık görüntülere bölünür ve her kare için MM-GBSA yardımıyla ortalama bağlanma enerjilerini hesaplanmaktadır. Ortalama Van der Waals enerjisi, ortalama Coulomb enerjisi, ortalama Lipofilik enerji, ortalama Genelleştirilmiş Born elektrostatik solvasyon enerjisi, ortalama Kovalent bağlanma enerjisi, ve



**Şekil 4.8** Moleküler dinamik simülasyonu analizleri sonrası MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerji-Zaman(ns) grafiği

ortalama Hidrojen bağlanma enerjileri hesaplanarak MM-GBSA bağlanma enerjisi hesabı yapılmaktadır [142]. 37 bileşiğin simülasyonu sonrasında oluşturulan RMSD-Zaman grafiklerinin incelenmesi sonucu ortalama RMSD değeri 3,5 Å'dan küçük olan 14 bileşik seçilmiş olup her biri için hesaplanan MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjileri Şekil 4.8'te verilmiştir. En iyi ligand bağlanma afinitesi 92181 bileşiğinde -98,0616 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

#### 4.3.1 *Ta*LDH-7W8A Modelinin Moleküler Yanaştırma Çalışmaları ve Moleküler Dinamik Simülasyonu

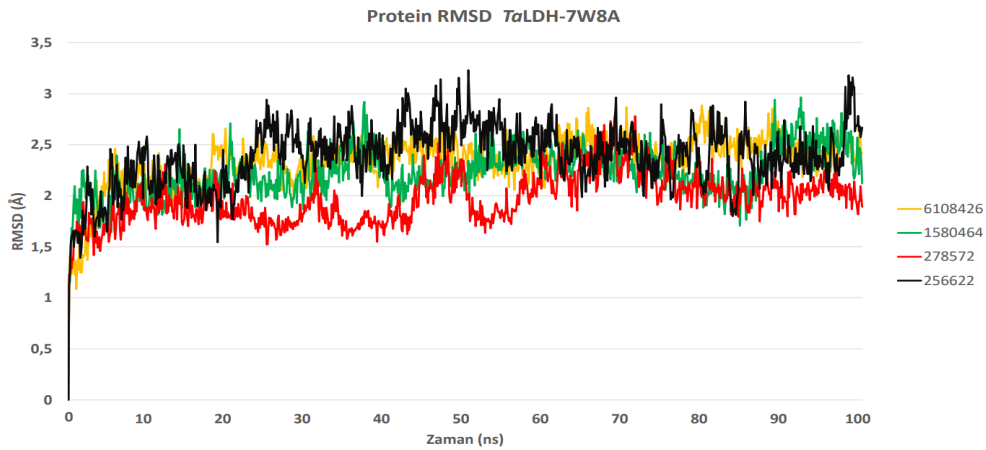
*Ta*LDH-7W8A modelinin moleküler yanaştırma sonucunda XP Gskorları en düşük olan 10 bileşik seçilip, her birine ilk etapta 100 ns süreyle moleküler dinamik simülasyon analizleri yapılmış ve  $\Delta G$  bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. *Ta*LDH-7W8A modeli oluşturulurken *B. orientalis* laktat dehidrogenazı şablon olarak seçilmiş olup, diğer modellere nazaran aktif bölgenin daha açık formda olduğu bir model tasarlanmıştır. Şablonda *B. orientalis* laktat dehidrogenaz enzimine herhangi bir substrat ya da kofaktör bağlı değildir. *Ta*LDH-7W8A modelinin aktif bölgesine moleküler yanaştırma yapılmış olup XP G skoru en düşük olan 10 bileşik belirlenmiş ve moleküler dinamik simülasyon analizleri yapılmıştır. Tablo 4.15'te verilen bileşiklerin moleküler dinamik simülasyon sonuçları incelenmiş olup ve her bileşik için MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.

MD simülasyonu sonucunda elde edilen bileşiklerin her birinin *Ta*LDH-7W8A'a göre RMSD-Zaman grafikleri oluşturulmuştur. Grafikler incelendiğinde RMSD

değeri 3,5 Å'dan küçük olan 4 bileşik belirlenmiştir. Bu bileşikler ise MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisine göre en düşükten artarak sıralandığı durumda 1580464, 278572, 6108426, 256622 olarak verilmektedir. Seçilen bu bileşiklerin protein karbon $\alpha$  RMSD değerlerinin toplu olarak verildiği grafik Şekil 4.9'da görülmektedir.

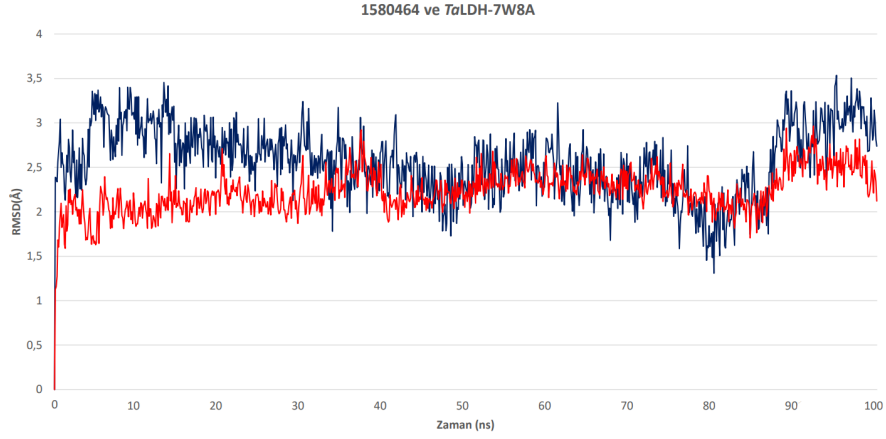
**Tablo 4.15** *Ta*LDH-7W8A modeli için belirlenen bileşiklerin moleküler yanalştırma sonucunda XP-Gscore ve XP-Hidrojen bağı değerleri ve Moleküler dinamik simülasyonunun ardından hesaplanmış  $\Delta G$  bağlanma enerjisi değerleri

Model	PubChem ID	XP Gscore (kcal/mol)	XP H bağı (kcal/mol)	MM/GBSA $\Delta G$ bağlanma enerjisi (kcal/mol)
<i>Ta</i> LDH-7W8A	6108426	-9,708	-2,961	-62,2539
<i>Ta</i> LDH-7W8A	3084295	-9,012	-4,606	-56,0995
<i>Ta</i> LDH-7W8A	16252238	-8,914	-0,657	-65,0886
<i>Ta</i> LDH-7W8A	256622	-8,969	-4,922	-40,5678
<i>Ta</i> LDH-7W8A	2862223	-8,782	-3,403	-64,8419
<i>Ta</i> LDH-7W8A	5742706	-9,042	-3,043	-63,2401
<i>Ta</i> LDH-7W8A	278572	-8,965	-2,815	-71,6776
<i>Ta</i> LDH-7W8A	11626371	-8,861	-3,944	-43,4509
<i>Ta</i> LDH-7W8A	278767	-8,887	-2,480	-29,3518
<i>Ta</i> LDH-7W8A	1580464	-8,576	-3,525	-88,7602



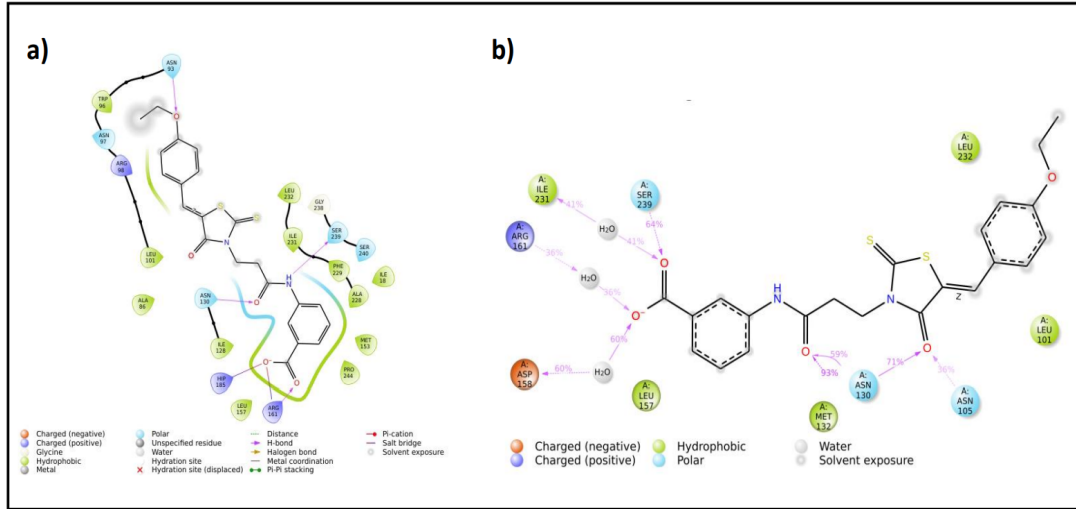
**Şekil 4.9** Seçili ligandlar (6108426, 1580464, 278572, 256622) ve *Ta*LDH-7W8A kompleksinin 100 ns simülasyonu sonucu *Ta*LDH-7W8A'nın RMSD-Zaman grafiği

100 ns süresince simülasyon analizi yapılmış olan 1580464 bileşiğine ait RMSD grafiği Şekil 4.10'da verilmiş olup, ortalama RMSD değeri 2,57 Å olarak



**Şekil 4.10** 1580464 ve *Ta*LDH-7W8A RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-7W8A) RMSD kırmızı, ligand (1580464) RMSD lacivert

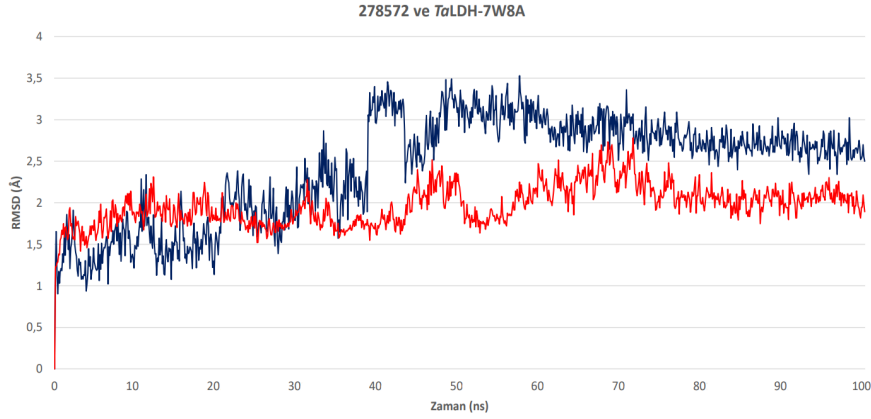
hesaplanmıştır. RMSD dalgalanmaları incelendiğinde protein daha stabilken, ligand proteine göre daha hareketli durumda olup proteinin RMSD değerlerinde oynama olduğu zaman aralığında bileşik proteine oranla fazla dalgalanma hareketi yapmış olduğu söylenebilmektedir. Bileşiğin bağlı olduğu sürede MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -88,7602 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.11** 1580464 ve *Ta*LDH-7W8A'ın a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

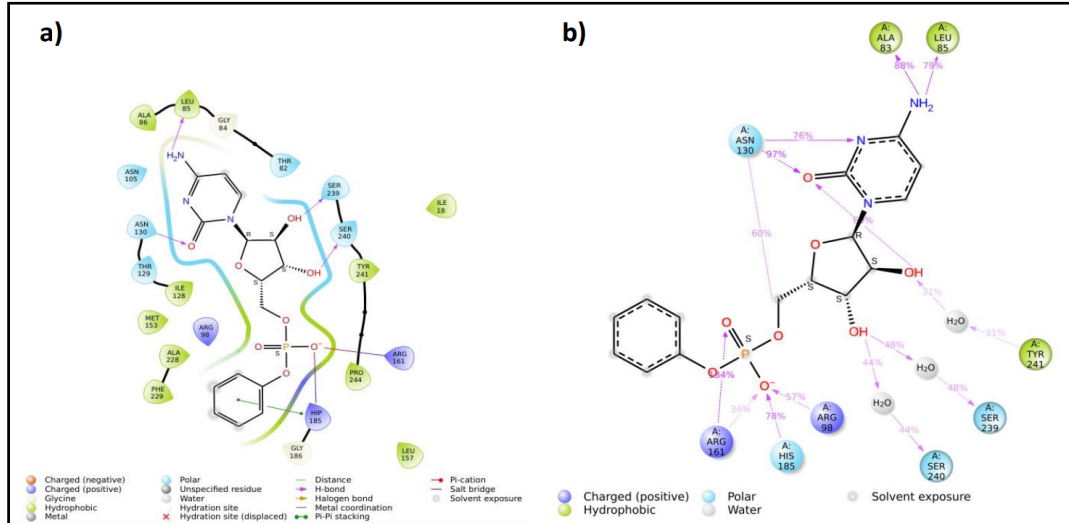
Şekil 4.11'de ise 1580464'nin moleküler yanaştırma sonundaki *Ta*LDH-7W8A ile etkileşimi ve 100 ns MD simülasyonu sonunda model ile yapılan etkileşimler 2 boyutlu olarak verilmiştir. Şekil 4.11 b'de simülasyon süresince %30 ve üzerinde yapılan etkileşimler gösterilmektedir. SER239, ASN93, ASN130 pozitif yüklü ARG161 ve HİP185 ile hidrojen bağı kurulmuş olup simülasyon süresince su molekülleri ile de hidrojen bağı kurduğu görülmektedir. SER239, ASN130 ve ASN105 ile simülasyon sonunda bileşik hidrojen bağları oluşturmaktadır.

Moleküler yanaştırma ve simülasyon sonrası hidrojen bağları ve rezidüler arasından sabit olanların SER239 ve ASN130 olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.12** 278572 ve *TaLDH-7W8A* RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*TaLDH-7W8A*) RMSD kırmızı, ligand (278572) RMSD lacivert

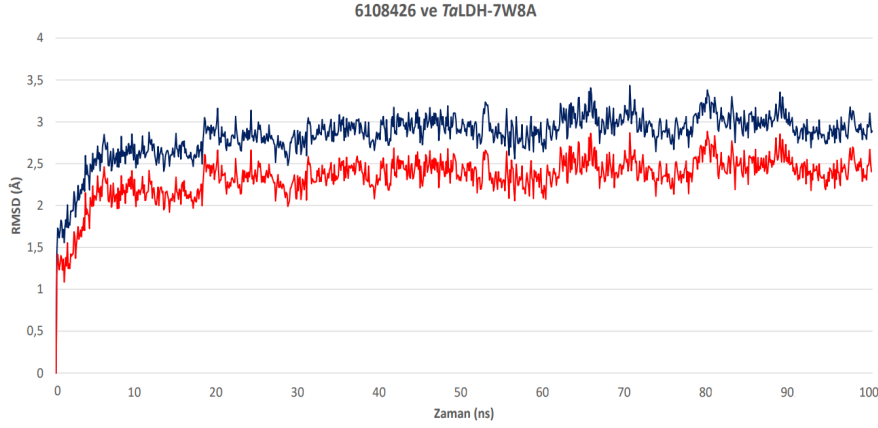
Simülasyon süresi 100 ns olan 278572 bileşiğine ait ortalama RMSD değeri 2,43 Å olarak hesaplanmış olup, RMSD grafiği Şekil 4.12’de verilmektedir. Bileşiğin aktif bölgedeki dalgalanmaları incelendiğinde yaklaşık 40. ns’de bir sıçrayış olduğu görülmektedir. Protein karbon  $\alpha$  RMSD değerlerinde ise belirgin bir sıçrama yoktur. Simülasyon süresince bileşik proteine oranla fazla dalgalanma hareketi yapmış olduğu söylenebilmektedir. Bileşiğin bağlı olduğu sürede MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -71,6776 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.



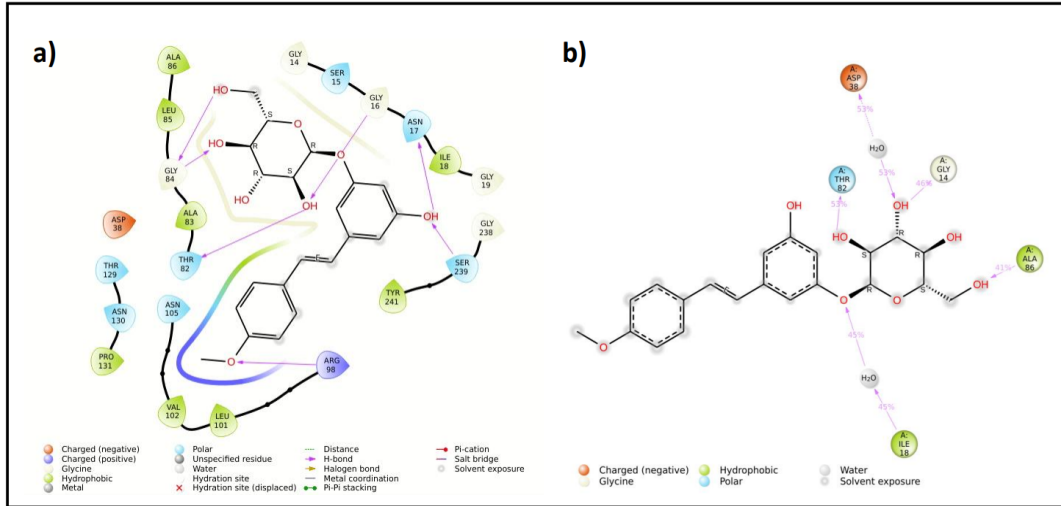
**Şekil 4.13** 278572 ve *TaLDH-7W8A*’ın a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

278572’in *TaLDH-7W8A* ile etkileşimleri moleküler yanaştırma sonucu ve 100 ns MD simülasyonu sonucu olarak sırasıyla a ve b şeklinde Şekil 4.13’te

2 boyutlu olarak gösterilmektedir. ASN130, LEU85, ARG161, SER239 ve SER240 rezidüleri ile simülasyon öncesinde oluşan hidrojen bağlarının sonrasında da oluşturulduğu söylenebilmektedir. Simülasyon süresince ALA83, LEU85, ASN130, ARG98, ARG161 ve HIS185 ile de simülasyon boyunca hidrojen bağı oluşturulmaktadır. 278572'nin *Ta*LDH'nin katalitik bölgesinde bulunan subsrat bağlanma rezidülerinden HIS185, ARG161 ve ARG98 [88, 89] ile hidrojen bağı yaptığı görülmektedir.



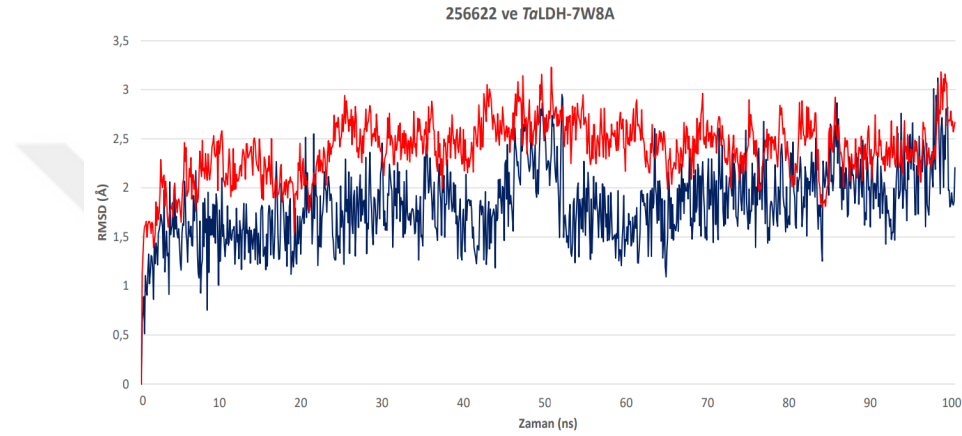
**Şekil 4.14** 6108426 ve *Ta*LDH-7W8A RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-7W8A) RMSD kırmızı, ligand (6108426) RMSD lacivert



**Şekil 4.15** 6108426 ve *Ta*LDH-7W8A'nın a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

100 ns simülasyonu yapılmış olan 6108426 bileşiğine ait ortalama RMSD değeri 2,85 Å olup, RMSD grafiği Şekil 4.14'te verilmektedir. Bileşik ve protein karbon  $\alpha$  RMSD değerleri incelendiğinde etkileşim boyunca hareketlenmelerin bileşik ve proteinde birbirine uyumlu olarak gerçekleştiği görülmektedir. Bileşiğin stabile yakın davranış sergilediği söylenebilmektedir. Bileşiğin bağlı olduğu süre boyunca MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -62,2539 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

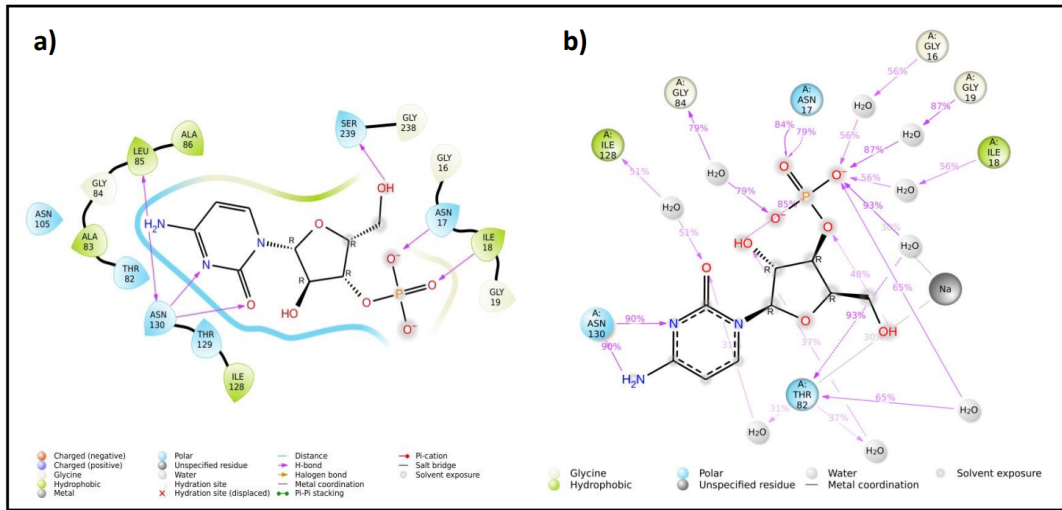
Moleküler yanaştırma sonucu ve 100 ns MD simülasyonu sonucunda 6108426'in *TaLDH-7W8A* ile oluşturduğu etkileşimler, Şekil 4.15'te sırasıyla a ve b şeklinde 2 boyutlu olarak gösterilmektedir. Simülasyon öncesinde GLY85, GLY16, SER239, ASN17 ve ARG98 ile kurulan hidrojen bağları simülasyon sonrasında görülmemektedir. THR82 ile hem simülasyon öncesi hem simülasyon sonrası hidrojen bağı oluşturulmuştur. Pozitif yüklü ASP38 ile hidrojen bağı kurulmuş olup, simülasyon sırasında ASP38 ile su molekülleri arasında da hidrojen bağı oluşturulmuştur. GLY14 ve ALA86'nın ise simülasyon boyunca %30 üzerinde hidrojen bağı yaptığı görülmektedir.



**Şekil 4.16** 256622 ve *TaLDH-7W8A* RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*TaLDH-7W8A*) RMSD kırmızı, ligand (256622) RMSD lacivert

*TaLDH-7W8A* modeline moleküler yanaştırması yapılan 256622 bileşiğinin 100 ns simülasyon analizi sonrası RMSD grafiği Şekil 4.16'da verilmiş olup ortalama RMSD değeri 1,83 Å olarak hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiği incelendiğinde, bileşiğin RMSD değerlerinin protein karbon  $\alpha$  RMSD değerlerine göre daha küçük olduğu görülmektedir. Yaklaşık 50. ns'de bileşik RMSD değerlerinde bir sıçrama olmuş fakat sonrasında stabil harekete geri dönmüştür. Bileşiğin simülasyon boyunca MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -40,5678 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

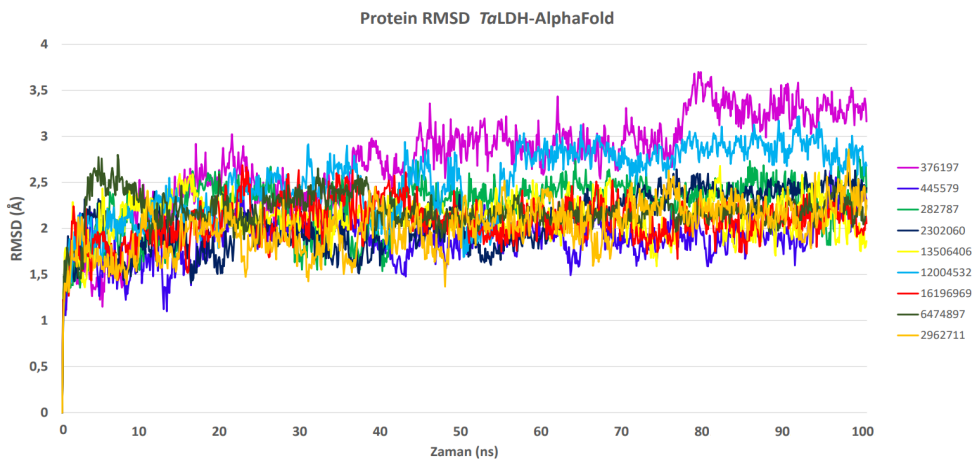
Simülasyon öncesi ve sonrası bileşik ve *TaLDH-7W8A* etkileşimleri Şekil 4.17'de sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. Şekil 4.17 incelendiğinde simülasyondan önce LEU85, ASN130, ASN17 ve SER239 ile hidrojen bağı kurulmuştur. ASN130 ve ILE18'in simülasyondan önce ve sonrasında hidrojen bağı kurduğu görülmektedir. ASN130 100 ns simülasyon boyunca %90 hidrojen bağı kurmuştur. Simülasyon süresince ASN17 gibi rezidüer ile de hidrojen bağı etkileşimleri oluşturulmuştur.



Şekil 4.17 256622 ve *TaLDH-7W8A*'nın a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

#### 4.3.2 *TaLDH-AlphaFold* Modelinin Moleküler Yanaştırma Çalışmaları ve Moleküler Dinamik Simülasyonu

*TaLDH-AlphaFold* modelindeki moleküler yanaştırma sonuçları incelendiğinde ise 17 bileşiğin moleküler dinamik analizi 100 ns boyunca yapılmış ve  $\Delta G$  bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. AlphaFold'un *TaLDH*'in üç boyutlu yapısını yapay zeka ile tahmin ettiği şablonun ve hedef *TaLDH*'in %100 dizi benzerliği olması nedeniyle diğer iki modelden daha fazla bileşik ile moleküler dinamik simülasyon analizi yapılmıştır. Tablo 4.16'da verilen bileşiklerin her birine ait XP Gscore, Hidrojen bağı yapma kapasitelerine göre XP Hidrojen bağı değerleri verilmiş olup, moleküler dinamik simülasyon sonuçlarının incelenmesinin ardından her bileşik için MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.



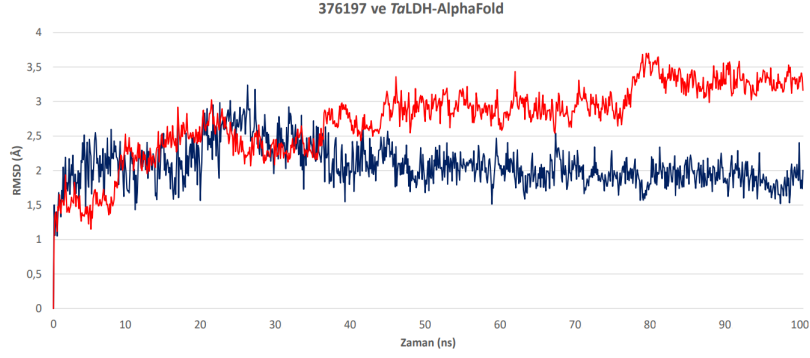
Şekil 4.18 Seçili ligandlar (376197, 6474897, 2302060, 13506406, 282787, 16196969, 445579, 12004532, 2962711) ve *TaLDH-AlphaFold* kompleksinin 100 ns simülasyonu sonucu *TaLDH-AlphaFold*'ın RMSD-Zaman grafiği

MD simülasyonu sonucunda elde edilen bileşiklerin enzime göre RMSD-Zaman grafikleri oluşturulmuştur. Simülasyon etkileşim grafikleri incelendiğinde RMSD değeri 4,5 Å'dan küçük olan 9 bileşik belirlenmiştir. Bu bileşikler ise MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisine göre en düşük olandan artarak sıralanmıştır. Bu durumda bileşiklerin simülasyon süresi boyunca hareketlerinin içeren RMSD-Zaman grafiklerini ve kurdukları etkileşimleri incelenmesi adına 376197, 6474897, 2302060, 13506406, 282787, 16196969, 445579, 12004532, 2962711 sırasıyla verilmiştir. Seçilen bileşiklerin protein karbon  $\alpha$  RMSD değerlerinin grafiği Şekil4.18'de görülmektedir. Protein RMSD değerleri incelendiğinde büyük sapmaların olmadığı görülmektedir.

**Tablo 4.16** *Ta*LDH-AlphaFold modeli için belirlenen bileşiklerin moleküler yanalıtma sonucunda XP-Gscore ve XP-Hidrojen bağı değerleri ve Moleküler dinamik simülasyonunun ardından hesaplanmış  $\Delta G$  bağlanma enerjisi değerleri

Model	PubChem ID	XP Gscore (kcal/mol)	XP H bağı (kcal/mol)	MM/GBSA $\Delta G$ bağlanma enerjisi (kcal/mol)
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	282787	-9,885	-4,107	-68,8790
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	21634257	-9,709	-3,532	-71,5121
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	445579	-9,672	-2,656	-63,3046
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	3894	-9,642	-3,955	-64,6462
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	457911	-9,536	-1,891	-81,9229
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	376197	-9,338	-1,011	-94,9857
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	118716614	-9,227	-2,579	-64,8388
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	6474897	-9,183	-3,662	-75,9084
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	2434227	-9,161	-0,397	-70,1249
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	16196969	-9,425	-1,778	-64,7718
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	12004532	-9,073	-3,847	-62,1916
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	13506406	-8,974	-2,992	-75,0708
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	2302060	-8,886	-1,349	-75,8986
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	301098	-8,813	-4,980	-28,9353
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	373075	-8,691	-2,616	-77,0623
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	2962711	-8,617	-3,584	-61,0385
<i>Ta</i> LDH-AlphaFold	2875367	-8,539	-1,888	-38,6948

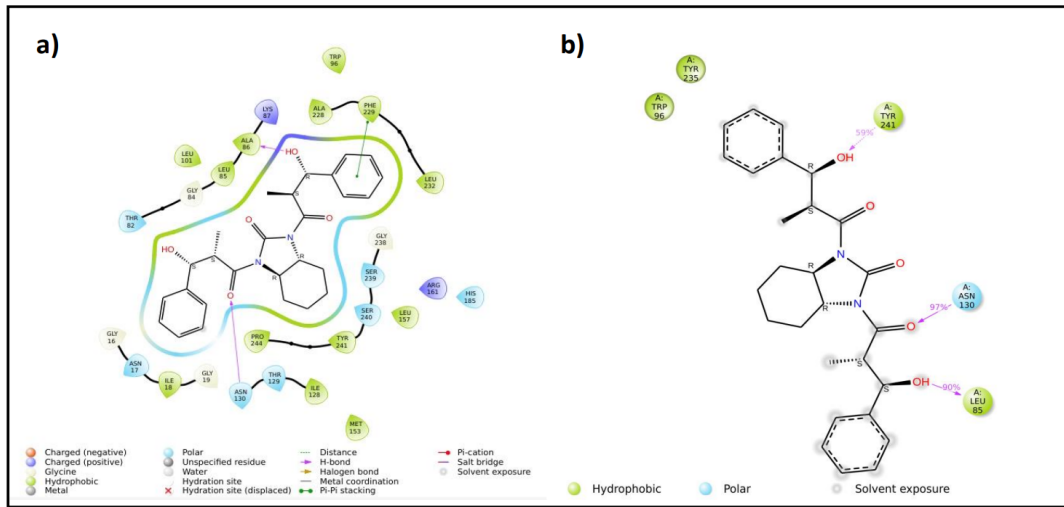
*Ta*LDH-AlphaFold modeli ve 376197 bileşiğinin 100 ns simülasyon analizi sonrası ortalama RMSD değeri 2,08 Å olarak hesaplanmış olup, grafiği Şekil 4.19'da verilmektedir. RMSD-Zaman grafiği incelendiğinde bileşiğin RMSD



**Şekil 4.19** 376197 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (376197) RMSD lacivert

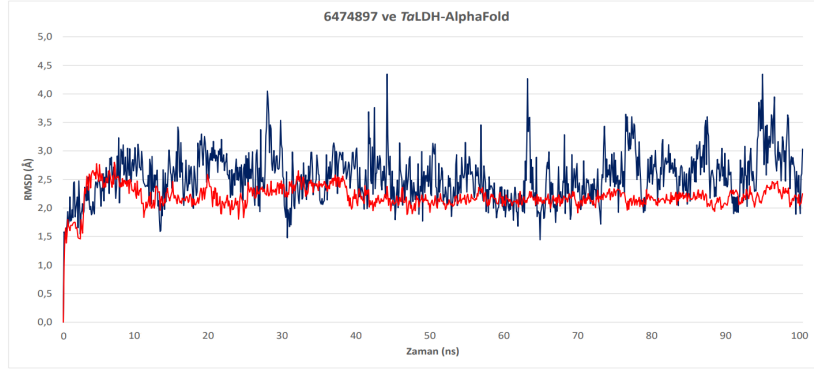
değerlerinin 40. ns'den sonra protein karbon  $\alpha$  RMSD değerlerine göre küçüldüğü görülmektedir. 50-100 nsler arasında bileşik RMSD değerlerinde dalgalanmalar az olup stabilitesini koruduğu söylenebilmektedir.

376197 bileşiğinin simülasyon boyunca MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -94,9857 kcal/mol olarak hesaplanmış olup *Ta*LDH-AlphaFold modeli için seçilmiş bileşikler arasında en düşük MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisidir.



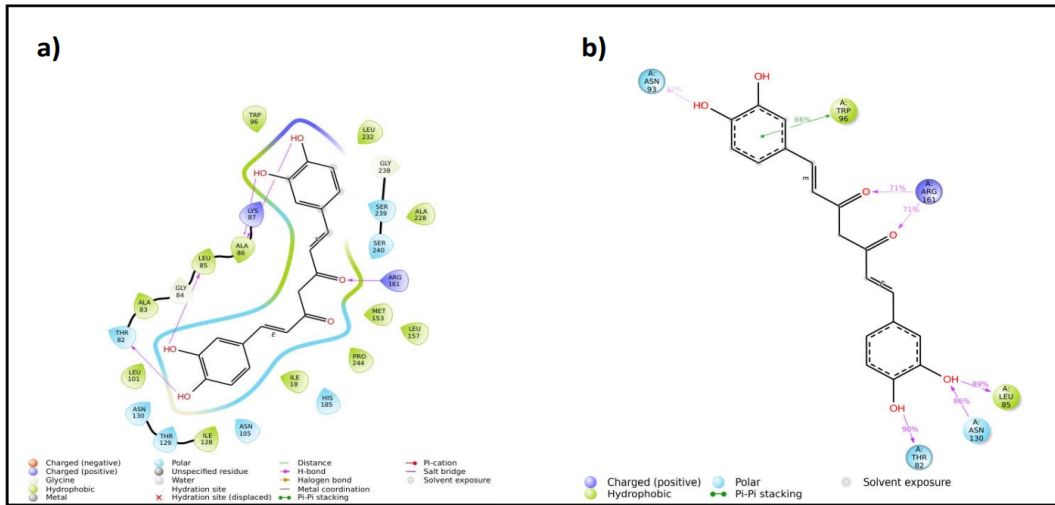
**Şekil 4.20** 376197 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

100 ns simülasyon öncesi ve sonrası bileşik ve *Ta*LDH-AlphaFold 2 boyutlu etkileşimleri Şekil 4.20a ve Şekil 4.20b şeklinde sırasıyla verilmiştir. Etkileşimler incelendiğinde ASN130 ve ALA86 ile simülasyon öncesi hidrojen bağı kurulmuşken simülasyon süresi boyunca ASN130 ile %97 hidrojen bağı kurulduğu söylenebilmektedir. LEU85 ve TRY241 rezidüleri ile simülasyon süresince hidrojen bağı kurulmuştur.



**Şekil 4.21** 6474897 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (6474897) RMSD lacivert

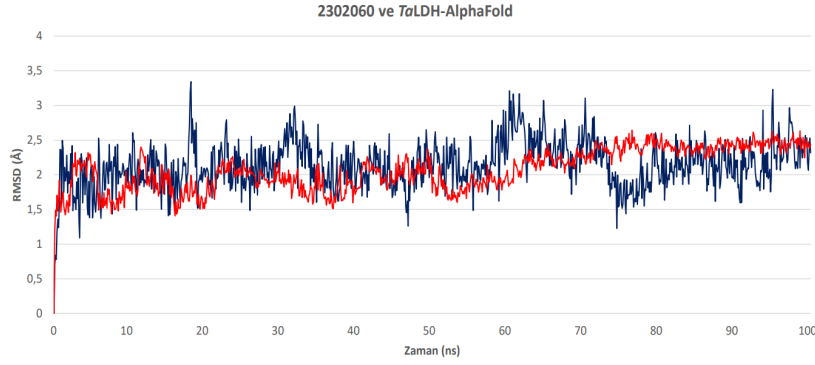
6474897 bileşiği ve *Ta*LDH-AlphaFold modelinin 100 ns simülasyonu sonrası ortalama RMSD değeri 2,54 Å olup, grafiği Şekil 4.21’de verilmektedir. RMSD-Zaman grafiği incelendiğinde bileşiğin ligand RMSD değerlerinin protein karbon  $\alpha$  RMSD değerlerine göre dalgalı olduğu görülmektedir. Model yapının hareketine göre daha oynak yapıda olan bileşiğin kararsızlığının proteine kıyasla daha fazla olduğu söylenebilmektedir. Bileşiğin simülasyon süresince MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -75,9084 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.



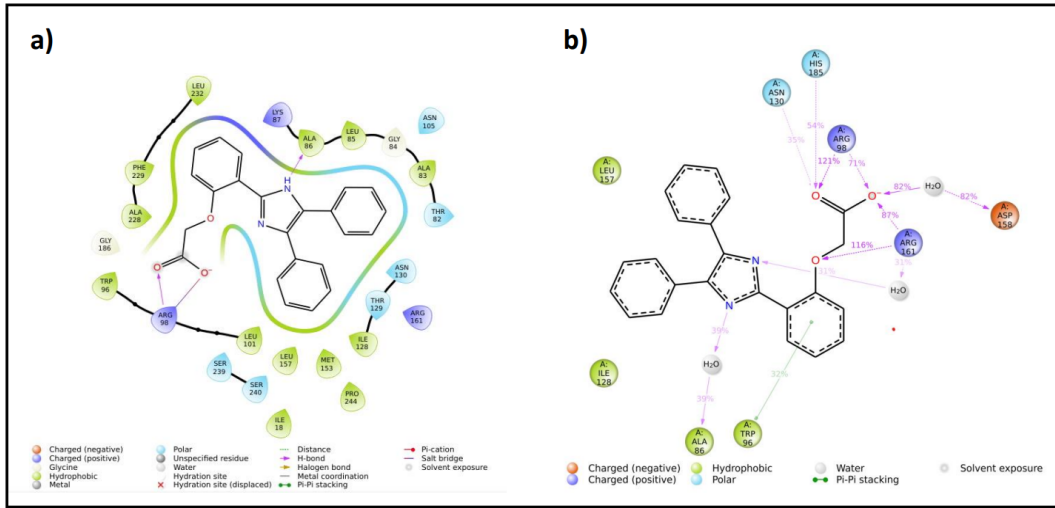
**Şekil 4.22** 6474897 ve *Ta*LDH-AlphaFold’un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

Moleküler dinamik simülasyonu öncesinde ve sonrasında 6474897 ve *Ta*LDH-AlphaFold 2 boyutlu etkileşimleri Şekil 4.22’de sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. 2 boyutlu etkileşim diyagramlarına göre ALA86, LEU85, THR82 ve ARG161 ile hidrojen bağları simülasyon öncesinde oluşturulmuştur. Simülasyon sonrasında ise simülasyon öncesine göre artış göstererek, ASN93, TRP96, pozitif yüklü ARG161, LEU85, ASN130 ve THR82 ile etkileşimlerin kurulmuş olduğu görülmektedir. 6474897’nin katalitik bölgesinde bulunan subsrat ile etkileşim

yapan rezidülerinden ARG161 ve TRP96 [89] ile etkileşim kurduğu görülmektedir.



Şekil 4.23 2302060 ve TaLDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $c\alpha$  (TaLDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (2302060) RMSD lacivert

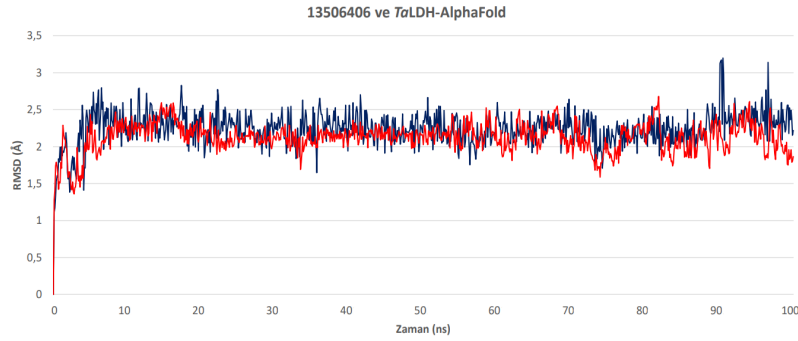


Şekil 4.24 2302060 ve TaLDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

2302060 ve TaLDH-AlphaFold modelinin simülasyonu sonrası ortalama RMSD değeri 2,14 Å olarak hesaplanmış olup, RMSD grafiği Şekil 4.23'te görülmektedir. RMSD-Zaman grafiğine göre bileşik hareketindeki dalgalanmalar protein hareketlerine uyumlu olarak gerçekleşmiştir. 70. ns'de ise bileşik ve protein birbirine göre daha farklı şekilde RMSD değerleri sergilese de 80-100. ns aralığında birbirine göre hareketleri daha stabil olarak görülmektedir. Bileşiğin simülasyon süresince MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -75,8986 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

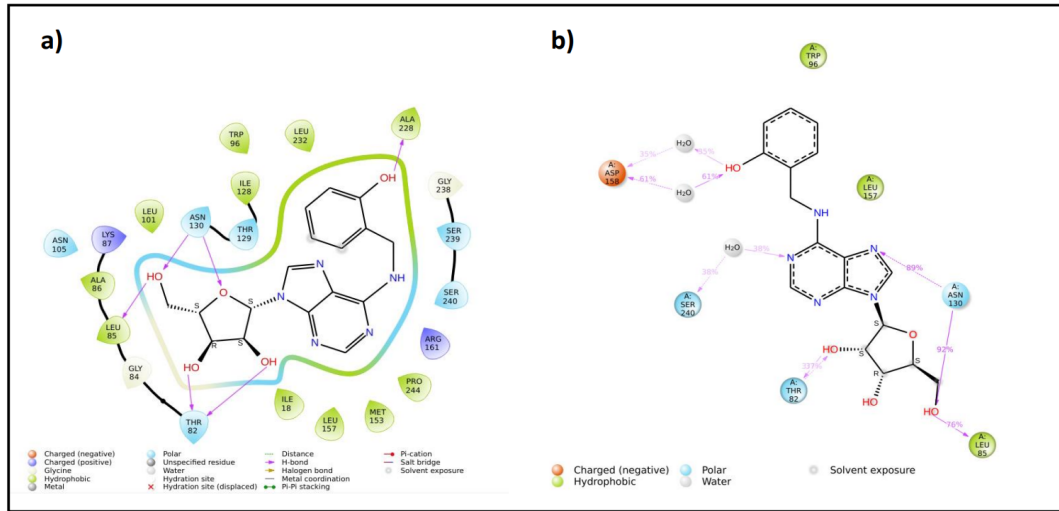
Simülasyonu 100 ns süreyle gerçekleşen 2302060 bileşiği ve TaLDH-AlphaFold'un simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşimleri Şekil 4.24'te sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. Etkileşim diyagramları incelendiğinde simülasyon öncesi ARG98 ve ALA86 ile hidrojen bağları oluşturulmuştur. Simülasyon süresi

boyunca ASN130, HIS185, pozitif yüklü ARG98 ve ARG161 ile hidrojen bağları kurulmuş olup, TRP96 ile de etkileşim kurulmaktadır. 2302060'ın katalitik bölgesinde bulunan subsrat bağlanma rezidülerinden HIS185, ARG161 ve ARG98 [88, 89] ile hidrojen bağı yaptığı TRP96 ile etkileşimde olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.25** 13506406 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (13506406) RMSD lacivert

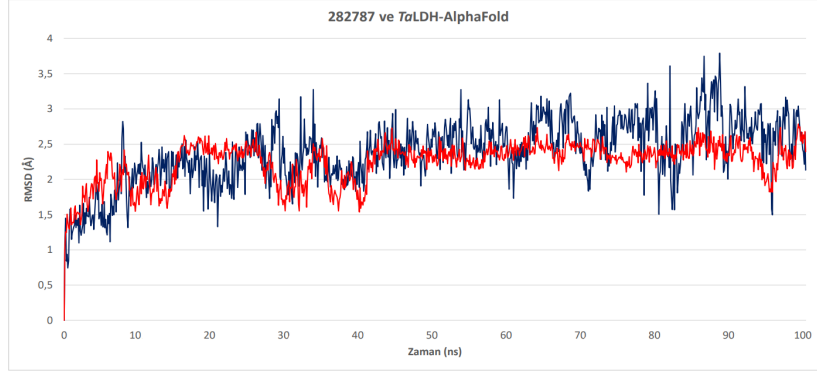
13506406 ve *Ta*LDH-AlphaFold modelinin simülasyonu sonrası ortalama RMSD değeri 2,24 Å olarak hesaplanmış olup, grafiği Şekil 4.25'te verilmektedir. 100 ns boyunca protein ve bileşik RMSD değerleri birbiri ile uyumlu olup, stabil hareket sergiledikleri söylenebilmektedir. 90. ns'de bileşikte bir sıçrama gözlenmede RMSD değeri olarak büyük bir değişim gözlenmemiştir. Bileşiğin simülasyon süresince MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -75,0708 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.26** 13506406 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanıştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

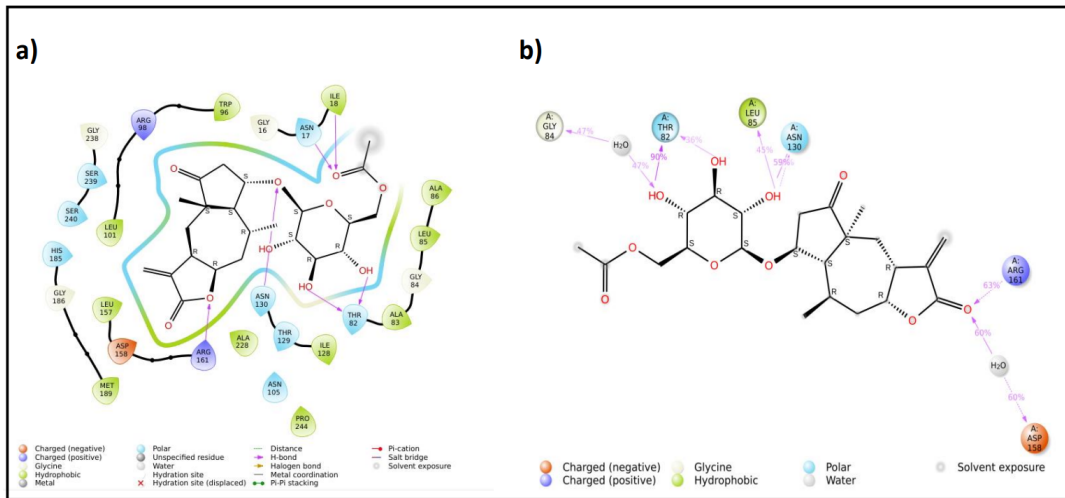
13506406 bileşiği ve *Ta*LDH-AlphaFold'un 100 ns simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşimleri Şekil 4.26'da sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. Etkileşim diyagramları incelendiğinde simülasyon öncesinde ASN130,

ALA228, LEU85 ve THR82 ile hidrojen bağları oluşturulmuştur. Simülasyon süresince en çok hidrojen bağı kurulan rezidüler ASN130, LEU85 ve THR82'dir. Su molekülleri ile kurulan hidrojen bağları da gözükmemektedir.



**Şekil 4.27** 282787 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (282787) RMSD lacivert

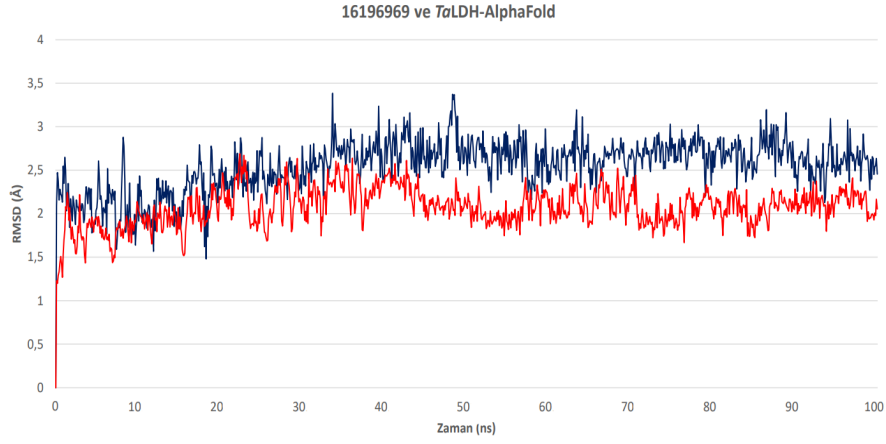
*Ta*LDH-AlphaFold modeli ve 282787 bileşiğinin 100 ns simülasyonu sonrası RMSD grafiği Şekil 4.27'de verilmiş olup, ortalama RMSD değeri 2,38 Å olarak hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiği incelendiğinde bileşiğin ve protein karbon  $\alpha$  RMSD değerlerinin ortalama 1-3,5 Å aralığında atom hareketlerinde dalgalanma olduğu görülmektedir. Model yapının hareketine göre daha oynak yapıda olan bileşiğin kararsızlığının proteine kıyasla daha fazla olduğu söylenebilmektedir. Bileşiğin simülasyon süresince MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -68,8790 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.



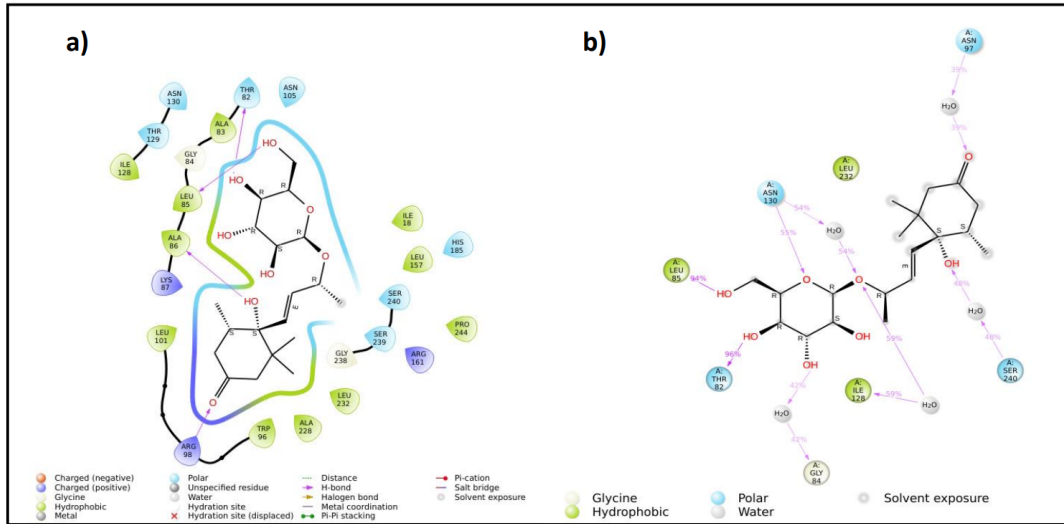
**Şekil 4.28** 282787 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanıştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

100 ns simülasyon analizi yapılmış 282787 bileşiği ve *Ta*LDH-AlphaFold'un simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşimleri Şekil 4.28'de sırasıyla

a ve b şeklinde verilmiştir. 2 boyutlu etkileşim diyagramları incelendiğinde simülasyon öncesinde ASN17, ILE18, THR82, ASN130 ve pozitif yüklü ARG161 ile hidrojen bağları oluşturulmuşken, simülasyon süresince en çok hidrojen bağı kurulan rezidüler ASN130, LEU85, THR82 ve ARG161'dir. Simülasyon öncesi ve sonrasında kurulan hidrojen bağları aynı rezidüler arasında olmuştur. 282787'nin *Ta*LDH'nin katalitik bölgesinde bulunan substrat ile etkileşim yapan rezidülerinden ARG161 [89] ile hidrojen bağı kurduğu görülmektedir.



**Şekil 4.29** 16196969 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (16196969) RMSD lacivert

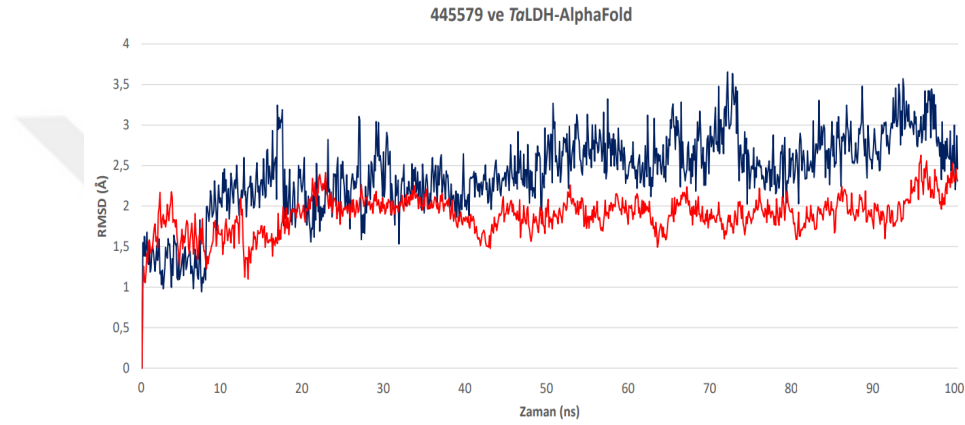


**Şekil 4.30** 16196969 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanıştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

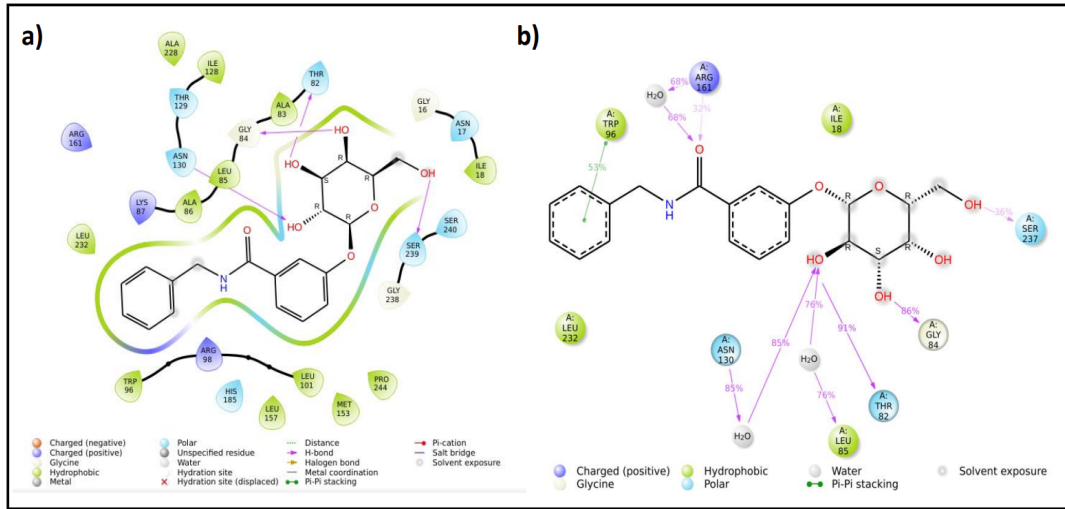
*Ta*LDH-AlphaFold modeli ve 16196969 bileşiğinin 100 ns simülasyonu ardından oluşturulan RMSD-Zaman grafiği Şekil 4.29'da görülmekte olup ortalama RMSD değeri 2,54 Å olarak hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiğine göre lacivert ile verilen bileşiğin ortalama yer değiştirme değerleri ve kırmızı renk ile verilen protein karbon $\alpha$  atomlarının ortalama yer değiştirmelerinin birbirine yakın olarak

değiştii söylenebilmektedir. Bileşik RMSD değerlerinde gözle görülür sıçramalar bulunmamaktadır. Bileşimin simülasyon süresince MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -64,7718 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

Moleküler dinamik simülasyonu öncesi ve sonrasında 16196969 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un 2 boyutlu etkileşim diyagramları Şekil 4.30'da sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. Diyagramlar incelendiğinde simülasyon öncesinde ALA86, LEU85, THR82 ve ARG98 ile hidrojen bağları yapılmışken, simülasyon sonrasında ASN130, THR82 ve LEU85 ile hidrojen bağlarının kurulmuş olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.31** 445579 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha C$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (445579) RMSD lacivert

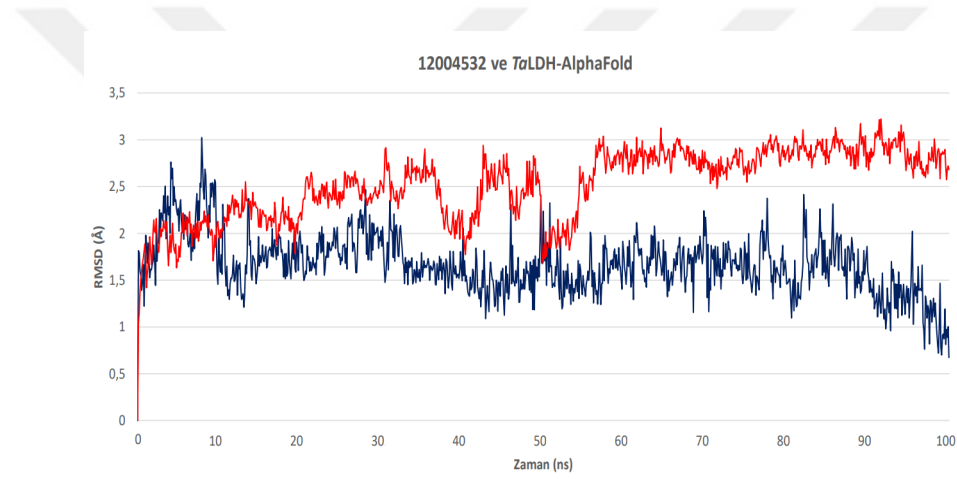


**Şekil 4.32** 445579 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanıştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

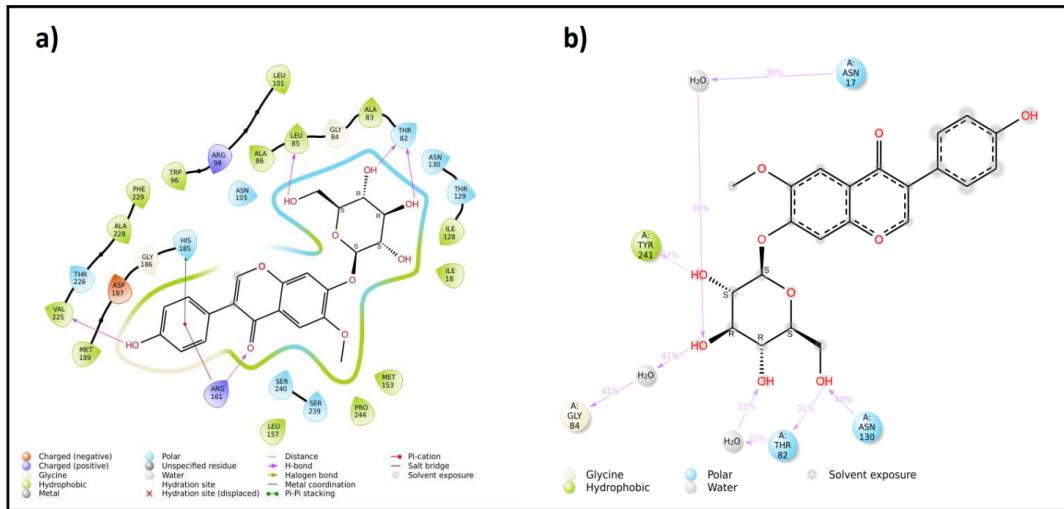
*Ta*LDH-AlphaFold modeli ve 445579 bileşiminin 100 ns simülasyon analizi yapılmış olup, oluşturulan RMSD-Zaman grafiği Şekil 4.31'de verilmiştir. Ortalama RMSD değeri ise 2,41 Å olarak hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiğine

göre bileşik ve enzimin simülasyon boyunca atom hareketlerinde büyük sapmalar olmadığı söylenebilmektedir. Bileşiğin simülasyon süresince MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -63,3046 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

100 ns simülasyon analizi yapılmış 445579 bileşiği ve *Ta*LDH-AlphaFold'un simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşim diyagramları Şekil 4.32'de sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. Diyagramlara göre simülasyon öncesinde THR82, GLY84, ASN130 ve SER239 ile hidrojen bağları oluşturulduğu görülmektedir. Simülasyon süresince en çok hidrojen bağı kurulan rezidüler ise ARG161, GLY84, THR82 ve SER237'dir. TRP96 ile ise hidrofobik etkileşimler kurulmuştur. 445579'nin *Ta*LDH'nin katalitik bölgesinde bulunan subsrat ile etkileşim yapan rezidülerinden ARG161 ve TRP96 [89] ile etkileşim kurduğu görülmektedir.



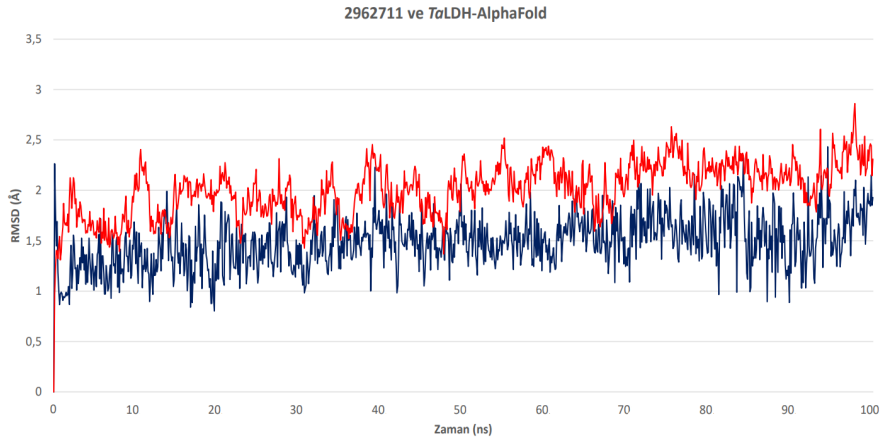
Şekil 4.33 12004532 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (12004532) RMSD lacivert



Şekil 4.34 12004532 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanıştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

*Ta*LDH-AlphaFold ve 12004532'nin simülasyonu sonucu atomların yer değiştirmelerine göre oluşturulan RMSD-Zaman grafiği Şekil 4.33'te verilmiş olup ortalama RMSD değeri 1,67 Å olarak hesaplanmıştır. Grafiğe göre enzimin RMSD değerleri yaklaşık 60. ns'den sonra 3 Å civarında dalgalanmalar gösterirken, 12004532'ün RMSD değerleri 10. ns'den sonra 1-2 Å arasında değişirken, 90. ns'den sonra RMSD değerlerinde küçük bir düşüş gerçekleşmiştir. Bileşiğe ait MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -62,1916 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

100 ns simülasyon analizi yapılmış 12004532 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşimleri Şekil 4.34'de sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. Diyagramlara göre simülasyondan önce THR82, ARG161, LEU85 ve VAL225 ile hidrojen bağları kurulmuş olup HIS185 ile hidrofobik etkileşimler kurulmuştur. Simülasyon süresince en çok hidrojen bağı kurulan rezidüer ise ASN130, THR82 ve TYR241 olmuştur.



**Şekil 4.35** 2962711 ve *Ta*LDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*Ta*LDH-AlphaFold) RMSD kırmızı, ligand (2962711) RMSD lacivert

*Ta*LDH-AlphaFold ve 2962711'nin simülasyon sonucu oluşturulan RMSD-Zaman grafiği Şekil 4.35'te verilmiştir. Ortalama RMSD değeri ise 1,48 Å olarak hesaplanmış olup, 37 bileşik arasında en düşük ortalama RMSD değeri olduğu söylenebilmektedir. Grafik incelendiğinde enzim ve 2962711 bileşiğinin atomlarının RMSD değerlerindeki değişim küçük olmakla birlikte, değerlerde ani sapmalar görülmemektedir. Enzimin karbon  $\alpha$  atomlarının ortalama yer değiştirmesi bileşiğe göre fazla olsa da kompleks simülasyon süresince birbiri ile uyumlu ve stabil olarak hareketlilik göstermiştir. Bileşiğin simülasyon boyunca MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -61,0385 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.

2962711 ve *Ta*LDH-AlphaFold'un 100 ns simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşimleri Şekil 4.36'da sırasıyla a ve b şeklinde verilmiştir. 2 boyutlu etkileşimlere göre simülasyon öncesinde ASN130 ve HIS185 ile hidrojen bağları

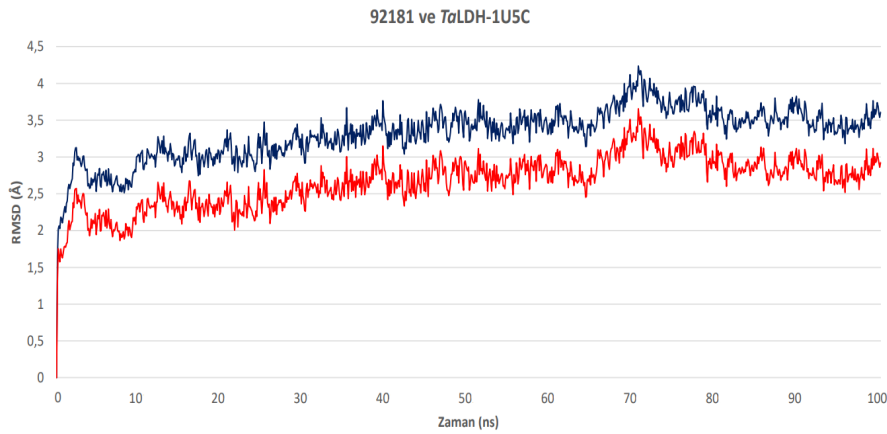


olduğu görülmektedir.

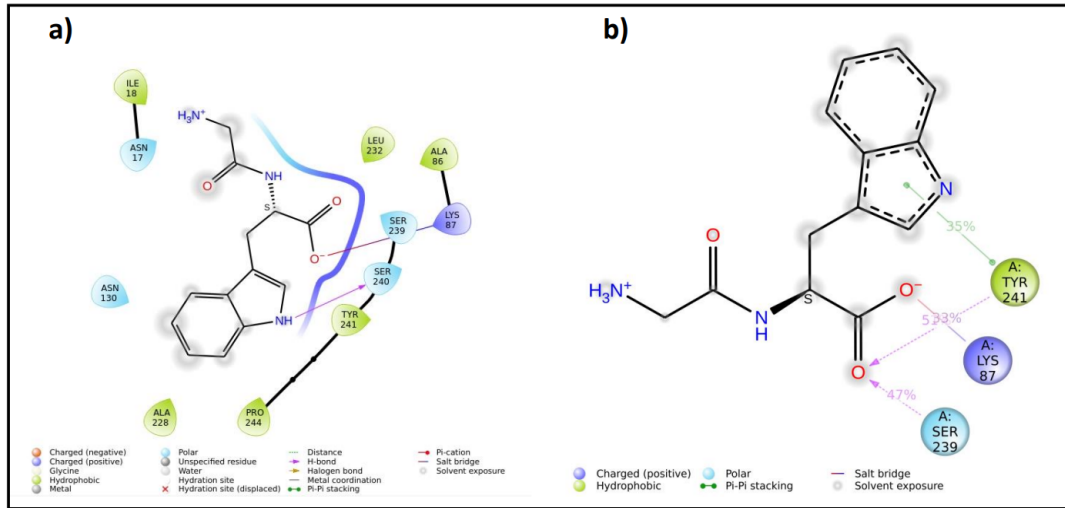
**Tablo 4.17** *TaLDH-1U5C* modeli için belirlenen bileşiklerin moleküler yanıştırma sonucunda XP-Gscore ve XP-Hidrojen bağı değerleri ve Moleküler dinamik simülasyonunun ardından hesaplanmış  $\Delta G$  bağlanma enerjisi değerleri

Model	PubChem ID	XP Gscore (kcal/mol)	XP H bağı (kcal/mol)	MM/GBSA $\Delta G$ bağlanma enerjisi (kcal/mol)
<i>TaLDH-1U5C</i>	135471524	-10,453	-1,760	-81,1839
<i>TaLDH-1U5C</i>	95699	-10,496	-2,085	-84,6484
<i>TaLDH-1U5C</i>	2827805	-9,923	-1,881	-94,5578
<i>TaLDH-1U5C</i>	92181	-10,110	-1,784	-98,0616
<i>TaLDH-1U5C</i>	67963007	-9,610	-1,602	-91,7476
<i>TaLDH-1U5C</i>	67962992	-9,489	-1,775	-81,5262
<i>TaLDH-1U5C</i>	53464326	-9,396	-1,823	-80,1077
<i>TaLDH-1U5C</i>	22868930	-8,915	0,000	-83,7623
<i>TaLDH-1U5C</i>	53254442	-8,728	-1,230	-85,4810
<i>TaLDH-1U5C</i>	59627133	-9,013	-0,512	-87,1577

Bileşiğin simülasyon boyunca MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -98,0616 kcal/mol olarak hesaplanmış olup *TaLDH-1U5C* modeli için seçilmiş bileşikler arasında en düşük MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisidir. Moleküler dinamik simülasyon analizi yapılmış diğer bileşiklerin MM/GBSA  $\Delta G$  değerleri düşük olmasına rağmen RMSD grafikleri sonucu bileşiklerde proteine göre büyük oranda hareketlilik gözlenmiştir.



**Şekil 4.37** 92181 ve *TaLDH-1U5C* RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (*TaLDH-1U5C*) RMSD kırmızı, ligand (92181) RMSD lacivert

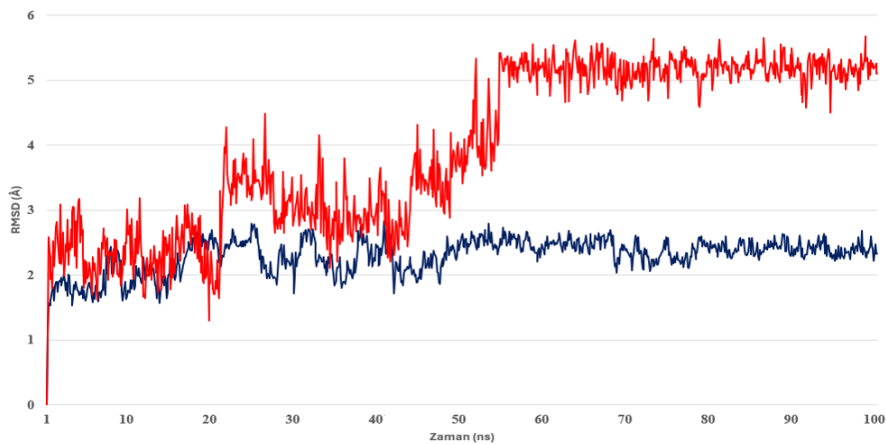


Şekil 4.38 92181 ve TaLDH-1U5C'nin a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

92181 ve TaLDH-1U5C'un 100 ns simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşim diyagramları sırasıyla a ve b olarak Şekil 4.38'de verilmiştir. 2 boyutlu etkileşim diyagramları incelendiğinde simülasyon öncesinde SER240 ve pozitif yüklü LYS87 ile hidrojen bağları oluşturulmuştur. Simülasyon süresince TYR241, SER239 ve pozitif yüklü LYS87 en çok hidrojen bağı kurulan rezidülerdir.

#### 4.3.4 TaLDH-AlphaFold ve Buparvaquone Modelinin Moleküler Yanaştırma Çalışmaları ve Moleküler Dinamik Simülasyonu

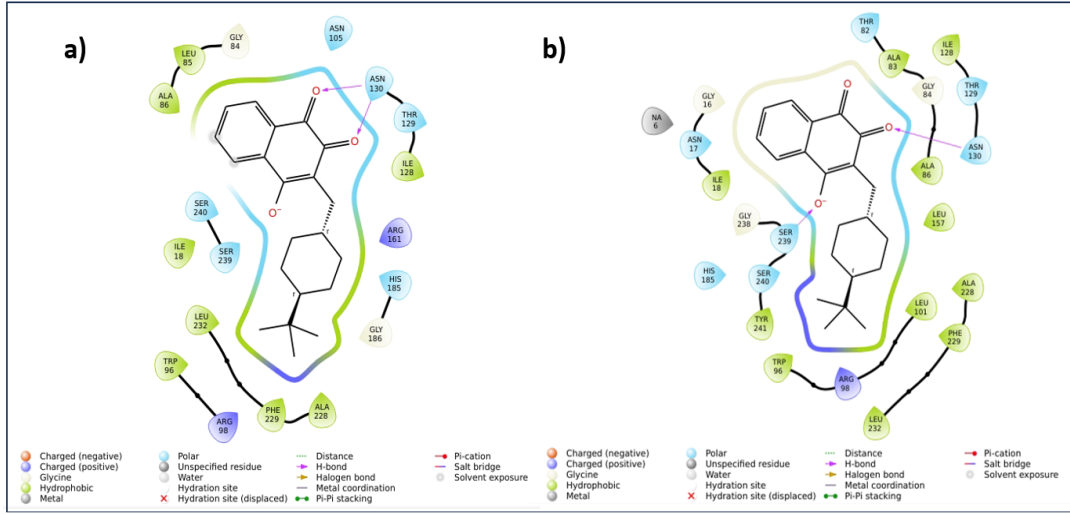
TaLDH-AlphaFold modeli ve buparvaquone ile yapılan 100 ns moleküler dinamik simülasyon analizi gerçekleştirilmiş ve ilacın TaLDH ile olan etkileşimleri incelenmiştir. Moleküler yanaştırma sonucunda XP Gskoru -3,447 kcal/mol olarak hesaplanmış olup, XP Hbond skoru -1,043 kcal/mol olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.39 Buparvaquone ve TaLDH-AlphaFold RMSD grafiği: protein  $\alpha$  (TaLDH-AlphaFold) RMSD lacivert, ligand (buparvaquone) RMSD kırmızı

Bu analiz, ilaca ait moleküler yanaştırma ve simülasyon analizlerini diğer bileşiklerle karşılaştırmak üzere referans olarak yapılmıştır. 100 ns simülasyon analizi sonrası RMSD grafiği Şekil 4.39'da verilmiş olup ortalama RMSD değeri 3,95 Å olarak hesaplanmıştır. RMSD-Zaman grafiğine göre bileşiğin ve protein RMSD değerlerinin 60. ns'de artış gösterdiği ve sonrasında stabile yakın bir hareket gösterdiği görülmektedir.

İlacın simülasyon boyunca MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi -48.1589 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.40'ta 100 ns simülasyon öncesinde ve sonrasındaki 2 boyutlu etkileşim diyagramları sırasıyla a ve b olarak verilmiştir. 2 boyutlu etkileşim diyagramları incelendiğinde simülasyon öncesinde ASN130 ile hidrojen bağı oluşturulmuştur. Simülasyon süresince ASN130 ve SER239 en çok hidrojen bağı kurulan rezidülerdir.



**Şekil 4.40** Buparvaquone ve *Ta*LDH-AlphaFold'un a) moleküler yanaştırma sonrası, b) moleküler dinamik simülasyon sonrası 2 boyutlu etkileşimleri

### 5.1 Sonuçlar

Son yüz yılda iklim değişikliğinin küresel çapta etkileri günden güne artış göstermektedir. Kenelerin hayatta kalması, çeşitliliği, aktivitesi, taşıdıkları patojenlerin yayılma potansiyeli ve konak arama süresi gibi süreçler doğrudan iklim değişikliğinden etkilenmektedir [3].

Evcil veya yabani geviş getiren hayvanlarda görülen theileriosis, *T. annulata* ile enfekte olmuş büyükbaş hayvanlarda ciddi klinik belirtiler göstermekte ve bazılarında ölümlerle sonuçlanmaktadır [23].

Tez kapsamında, sığırlarda tropikal theileriosise neden olan apikompleksan parazit *Theileria annulata*'nın tedavisinde kullanılacak yeni ilaç geliştirme çalışmalarına yönelik *in silico* ve *in vitro* deneyler eş zamanlı olarak yürülmüştür. *T. annulata* laktat dehidrogenazı ilaç hedefi olarak seçilmiş olup *TaLDH*'ı inhibe etmek amaçlanmış ve inhibitör taraması yapılmıştır. Bu amaçla;

İnhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere *TaLDH*'ın ifadesi için *TaLDH* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücreleri kullanılmış olup, TALON® kolonu ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel elektroforez analizi ile %95 üzeri saflıkta *TaLDH* elde edildiği tespit edilmiştir. *TaLDH*'ın inhibisyon çalışmalarından önce zamana bağlı aktivitesini belirlemek için etilen glikol ve sükröz stabilizatörlerinin saf *TaLDH*'a eklenmesi ile belirli zaman aralıklarında (3 - 24 saat) aktive değerleri ölçülmüştür. Kaydedilen veriler sonucunda saflaştırılan *TaLDH*'ın 1 M sükröz eklendikten 24 saat sonrasında aktivitesini çok büyük bir oranda koruduğu tespit edilmiştir. Saf *TaLDH* aktivitesi 24 saat sonrasında büyük oranda korunduğundan dolayı inhibisyon çalışmaları stabilizatör eklenmeyen *TaLDH* ile yürütülmüştür. 21 adet FDA onaylı ilaç etken maddeden oluşan bileşik kütüphanesinin inhibitör potansiyellerinin belirlenmesi için *TaLDH*'ın aktivitesi üzerinde %inhibisyon oranları tespit edilmiştir. FDA

onaylı ilaç etken maddelerin saf *Ta*LDH üzerindeki inhibisyon potansiyellerine yönelik yapılan çalışma sonucunda 21 etken maddeden 6 tanesinde %60 üzerinde inhibisyon gözlenmiş olup bu etken maddelerin; Pantoprazol sodyum, Nateglinid, Buspiron hidroklorür, Paracetamol, Piperacillin/tazobactam, Omeprazol olduğu belirlenmiştir. *Ta*LDH aktivitesini %73,36 oranla en yüksek oranda inhibe eden etken maddenin Omeprazol olduğu saptanmıştır. Litaratürde ilk defa FDA onaylı ilaç etken maddelerinin *Ta*LDH'ı inhibisyon potansiyeli *in vitro* olarak tespit edilmiştir.

Tez çalışmalarının *in silico* analiz bölümünde ilk aşamada *Ta*LDH'ın üç adet homoloji modeli tasarlanmıştır. *Ta*LDH-7W8A ve *Ta*LDH-AlphaFold modelleri SWISS-MODEL web tabanlı sunucusu ile modellenirken, *Ta*LDH-1U5C modeli Modeller v10.4 programı ile katalitik bölgesinde NAD bulunacak şekilde modellenmiştir. Tasarımı yapılan modellerin katalitik bölgelerine Enamine (www.enamine.net) anti-bakteriyel bileşik kütüphanesi, PubChem-Metabolit ve PubChem-Bioassay bileşik kütüphanelerine ait yaklaşık 650000 bileşiğin Glide (Schrödinger Release 2022-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.) programı kullanılarak moleküler yanaştırması yapılmıştır. Moleküler yanaştırma sonucu hesaplanan XP-Gscore değerlerine göre her model için en düşük skorlu bileşikler belirlenip, bileşiklerin her birine 100 ns moleküler dinamik simülasyon analizi yapılmıştır. *Ta*LDH-7W8A modeli için 10, *Ta*LDH-AlphaFold modeli için 17, *Ta*LDH-1U5C modeli için 10 bileşik olmaz üzere toplam 37 bileşiğin simülasyonu gerçekleştirilmiş olup, sonrasında her biri için MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi hesaplanmıştır. Bileşiklerin simülasyon etkileşim diyagramları incelenmiş olup, atom hareketlerinde 100 ns'de sapmaların en az olduğu 14 bileşik tespit edilmiş ve moleküler yanaştırma sonrasındaki ve simülasyon boyunca kurdukları etkileşimler tespit edilmiştir. Hesaplanan MM/GBSA  $\Delta G$  bağlanma enerjisi değerlerine göre en iyi ligand bağlanma afinitesi *Ta*LDH-1U5C modelinin 92181 bileşiğinde olup, -98,0616 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. ARG161, ARG98, HİS185, TRP96 *Ta*LDH'ın katalitik bölgesindeki önemli rezidülerdir [87–89]. 278572 bileşiği ve *Ta*LDH-7W8A simülasyon boyunca ALA83, LEU85, ASN130, ARG98, ARG161 ve HİS185 rezidüleri hidrojen bağı kurmaktadır. 2302060 bileşiği ve *Ta*LDH-AlphaFold ise simülasyon süresi boyunca ASN130, HİS185, pozitif yüklü ARG98 ve ARG161 ile hidrojen bağları kurulmuş olup, TRP96 ile de etkileşim kurmaktadır. *In silico* analizler sonucu seçilen en iyi RMSD değerine sahip bileşiklerden ilki 2962711 olup *Ta*LDH-AlphaFold ile yapılan 100 ns simülasyon sonucu ortalama RMSD değeri 1,48 Å olarak hesaplanmıştır. *Ta*LDH'ın katalitik bölgesinde bulunan subsrat ile etkileşim yapan rezidülerinden ARG161 ile hidrojen bağı kurduğu tespit edilmiştir. İkinci bileşik 12004532 olup

TaLDH-AlphaFold ile yapılan MD simülasyon sonucu ortalama RMSD değeri 1,67 Å'dır. TaLDH-7W8A'ya yanaştırması yapılmış 256622 bileşiğinin MD simülasyon sonucu ortalama RMSD değeri 1,82 Å olarak hesaplanmış olup en iyi üçüncü bileşik seçilmiştir.

## 5.2 Öneriler

TaLDH ve inhibitörler ile yapılacak ileri *in silico* analizler için 3B yapısı X ışını kristalografisi veya nükleer manyetik rezonans spektroskopisi gibi deneysel yöntemler ile belirlenmelidir. FDA onaylı ilaç etken bileşiklerden %inhibisyon değerleri yüksek olanlar ile ileri kinetik analizleri yapılmalıdır. 100 ns simülasyon analizi sonucu belirlenen en iyi üç bileşiğin önce 1 mikro saniye simülasyon analizleri yapılmalı ve sonrasında bu bileşiklerin *in vitro* inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmelidir. İnhibitör bileşiklerin ileri hücre kültürü çalışmaları ve prelinik analizleri yapılmalıdır. Prelinik analizleri doğrultusunda belirlenen inhibitörlerin ileri *in vivo* analizleri yapılmalıdır.

- [1] C. C. IPCC, "Impacts, adaptation and vulnerability. contribution of working group ii to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change," *Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*, 2007.
- [2] B. Bett, P. Kiunga, J. Gachohi, C. Sindato, D. Mbotha, T. Robinson, J. Lindahl, D. Grace, "Effects of climate change on the occurrence and distribution of livestock diseases," *Preventive veterinary medicine*, vol. 137, pp. 119–129, 2017.
- [3] C. Bouchard, A. Dibernardo, J. Koffi, H. Wood, P. Leighton, L. Lindsay, "Climate change and infectious diseases: The challenges: N increased risk of tick-borne diseases with climate and environmental changes," *Canada Communicable Disease Report*, vol. 45, no. 4, p. 83, 2019.
- [4] S. M. Adl, B. S. Leander, A. G. Simpson, J. M. Archibald, O. R. Anderson, D. Bass, S. S. Bowser, G. Brugerolle, M. A. Farmer, S. Karpov, *et al.*, "Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists," *Systematic biology*, vol. 56, no. 4, pp. 684–689, 2007.
- [5] F. Seeber, S. Steinfelder, "Recent advances in understanding apicomplexan parasites [version 1; referees: 2 approved]," 2016.
- [6] B. Minjauw, A. McLeod, "Tick-borne diseases and poverty. the impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihood and marginal livestock owners in india and eastern and southern africa," in *DFID Animal Health Programme, Centre of Tropical Veterinary Medicine*, University of Edinburgh UK, 2003.
- [7] N. McHardy, L. Wekbsa, A. Hudson, A. Randall, "Antitheilerial activity of bw720c (buparvaquone): A comparison with parvaquone," *Research in veterinary science*, vol. 39, no. 1, pp. 29–33, 1985.
- [8] M. Mhadhbi, A. Naouach, A. Boumiza, M. F. Chaabani, S. BenAbderazzak, M. A. Darghouth, "In vivo evidence for the resistance of theileria annulata to buparvaquone," *Veterinary Parasitology*, vol. 169, no. 3-4, pp. 241–247, 2010.
- [9] H. Sharifiyazdi, F. Namazi, A. Oryan, R. Shahriari, M. Razavi, "Point mutations in the theileria annulata cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure," *Veterinary parasitology*, vol. 187, no. 3-4, pp. 431–435, 2012.
- [10] J. Kopp, T. Schwede, "Automated protein structure homology modeling: A progress report," *Pharmacogenomics*, vol. 5, no. 4, pp. 405–416, 2004.

- [11] R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, "The art and practice of structure-based drug design: A molecular modeling perspective," *Medicinal research reviews*, vol. 16, no. 1, pp. 3–50, 1996.
- [12] W. F. Van Gunsteren, H. J. Berendsen, "Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 29, no. 9, pp. 992–1023, 1990.
- [13] K. Al-Khafaji, T. T. Tok, "Molecular dynamics simulation, free energy landscape and binding free energy computations in exploration the anti-invasive activity of amygdalin against metastasis," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 195, p. 105 660, 2020.
- [14] G. Myhre, D. Shindell, J. Pongratz, "Anthropogenic and natural radiative forcing," 2014.
- [15] N. H. Ogden, C. Ben Beard, H. S. Ginsberg, J. I. Tsao, "Possible effects of climate change on ixodid ticks and the pathogens they transmit: Predictions and observations," *Journal of Medical Entomology*, vol. 58, no. 4, pp. 1536–1545, 2021.
- [16] M. Ramzan, G. Murtaza, A. Sattar, N. Munawar, A. Ullah, A. Ejaz, F. Ayaz, S. Anwar, K. Jameel, F. Kamran, *et al.*, "Techniques for managing ticks and tick-borne diseases under changing climate; a review," *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, B. Zoology*, vol. 13, no. 1, pp. 117–128, 2021.
- [17] V. Danielová, M. Daniel, L. Schwarzová, J. Materna, N. Rudenko, M. Golovchenko, J. Holubová, L. Grubhoffer, P. Kilián, "Integration of a tick-borne encephalitis virus and borrelia burgdorferi sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, ixodes ricinus (krkonoše mountains, czech republic)," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 10, no. 3, pp. 223–230, 2010.
- [18] U. Farooq, N. Tufani, H. Malik, M. Mir, "Clinical and morpho-molecular epidemiology of bovine theileriosis in kashmir, india," *Indian Journal of Animal Research*, vol. 53, no. 3, pp. 375–381, 2019.
- [19] L. Gilbert, "The impacts of climate change on ticks and tick-borne disease risk," *Annual review of entomology*, vol. 66, pp. 373–388, 2021.
- [20] E. J. Kim, "The impacts of climate change on human health in the united states: A scientific assessment, by us global change research program," *Journal of the American Planning Association*, vol. 82, no. 4, pp. 418–419, 2016.
- [21] G. S. Cumming, D. P. Van Vuuren, "Will climate change affect ectoparasite species ranges?" *Global Ecology and Biogeography*, vol. 15, no. 5, pp. 486–497, 2006.
- [22] M. A. Hassan, J. Liu, M. S. Sajid, M. Rashid, A. Mahmood, Q. Abbas, G. Guan, H. Yin, J. Luo, "Simultaneous detection of theileria annulata and theileria orientalis infections using recombinase polymerase amplification," *Ticks and tick-borne diseases*, vol. 9, no. 4, pp. 1002–1005, 2018.

- [23] Z. Ganaie, R. Shahardar, I. Maqbool, K. Bulbul, I. Allaie, Z. Wani, “An overview of bovine theileriosis,” *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb*, vol. 4, pp. 9–14, 2019.
- [24] M. Darghouth, A. Bouattour, L. B. Miled, M. Kilani, C. Brown, “Epidemiology of tropical theileriosis (theileria annulata infection of cattle) in an endemic region of tunisia: Characterisation of endemicity states,” *Veterinary parasitology*, vol. 65, no. 3-4, pp. 199–211, 1996.
- [25] G. J. Eamens, J. R. Gonsalves, C. Jenkins, D. Collins, G. Bailey, “Theileria orientalis mpsp types in australian cattle herds associated with outbreaks of clinical disease and their association with clinical pathology findings,” *Veterinary parasitology*, vol. 191, no. 3-4, pp. 209–217, 2013.
- [26] G. Aulakh, L. Singla, “Clinico-haematobiochemical observations on bovines naturally infected with theileria annulata,” *Journal of Veterinary Parasitology*, vol. 20, no. 1, pp. 49–52, 2006.
- [27] M. Gharbi, B. Rekik, M. Mabrouk, M. Hassni, W. Zroud, M. Mhadhbi, L. Sassi, M. Jedidi, M. A. Darghouth, “Impact of the carrier state by theileria annulata on milk yield in tunisian crossbred (bos taurus) cattle,” *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol. 5, no. 11, pp. 884–887, 2015.
- [28] K. Elati, A. M. Nijhof, M. M. Mwamuye, V. Ameen, M. Mhadhbi, M. A. Darghouth, I. Obara, “Sequence polymorphisms in a theileria annulata surface protein (tasp) known to augment the immunity induced by live attenuated cell line vaccine,” *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 69, no. 6, pp. 3350–3359, 2022.
- [29] A. Deniz, Z. Karaer, “Sığırlarda theileria türlerinin reverse line blotting ve indirek floresan antikor testi ile karşılaştırmalı tanısı üzerine araştırmalar,” *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, vol. 17, no. 1-2, pp. 43–54, 2006.
- [30] F. Sayin, S. Dincer, Z. Karaer, A. Cakmak, A. Inci, B. Yukari, H. Eren, Z. Vatansever, S. Nalbantoglu, “Studies on the epidemiology of tropical theileriosis (theileria annulata infection) in cattle in central anatolia, turkey,” *Tropical animal health and production*, vol. 35, pp. 521–539, 2003.
- [31] M. Gharbi, L. Sassi, P. Dorchie, M. A. Darghouth, “Infection of calves with theileria annulata in tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination,” *Veterinary Parasitology*, vol. 137, no. 3-4, pp. 231–241, 2006.
- [32] A. Inci, A. Ica, A. Yildirim, Z. Vatansever, A. Cakmak, H. Albasan, Y. Cam, A. Atasever, S. Sariozkan, O. Duzlu, “Economical impact of tropical theileriosis in the cappadocia region of turkey,” *Parasitology Research*, vol. 101, pp. 171–174, 2007.
- [33] F. Kivaria, M. Ruheta, P. Mkonyi, P. Malamsha, “Epidemiological aspects and economic impact of bovine theileriosis (east coast fever) and its control: A preliminary assessment with special reference to kibaha district, tanzania,” *The veterinary journal*, vol. 173, no. 2, pp. 384–390, 2007.

- [34] M. Rashid, H. Akbar, I. Rashid, K. Saeed, L. Ahmad, A. S. Ahmad, W. Shehzad, S. Islam, S. Farooqi, "Economic significance of tropical theileriosis on a holstein friesian dairy farm in pakistan," *The Journal of Parasitology*, vol. 104, no. 3, pp. 310–312, 2018.
- [35] D. E. Sonenshine, R. S. Lane, W. L. Nicholson, "Ticks (ixodida)," in *Medical and veterinary entomology*, Elsevier, 2002, pp. 517–558.
- [36] J. Liu, G. Guan, H. Yin, "Theileria annulata," *Trends in parasitology*, vol. 38, no. 3, pp. 265–266, 2022.
- [37] M. Gharbi, M. A. Darghouth, "Control of tropical theileriosis (theileria annulata infection in cattle) in north africa," *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol. 5, no. 7, pp. 505–510, 2015.
- [38] A. Mugisha, A. McLeod, R. Percy, E. Kyewalabye, "Strategies, effectiveness and rationale of vector-borne disease control in the pastoralist system of south-western uganda," *Tropical Animal Health and Production*, vol. 37, pp. 479–489, 2005.
- [39] M. A. Darghouth, "Review on the experience with live attenuated vaccines against tropical theileriosis in tunisia: Considerations for the present and implications for the future," *Vaccine*, vol. 26, G4–G10, 2008.
- [40] W. Morrison *et al.*, "The aetiology, pathogenesis and control of theileriosis in domestic animals," *Rev. Sci. Tech*, vol. 34, no. 2, pp. 599–611, 2015.
- [41] C. W. Wright, J. D. Phillipson, "Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs," *Phytotherapy Research*, vol. 4, no. 4, pp. 127–139, 1990.
- [42] M. Mirzaei, "Treatment of natural tropical theileriosis with the extract of the plant peganum harmala," *The Korean journal of parasitology*, vol. 45, no. 4, p. 267, 2007.
- [43] N. Gul, S. Ayaz, I. Gul, M. Adnan, S. Shams, N. Akbar, *et al.*, "Tropical theileriosis and east coast fever in cattle: Present, past and future perspective," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, vol. 4, no. 8, pp. 1000–1018, 2015.
- [44] A. K. Nehra, A. Kumari, A. D. Moudgil, S. Vohra, "An insight into misidentification of the small-subunit ribosomal rna (18s rna) gene sequences of theileria spp. as theileria annulata," *BMC Veterinary Research*, vol. 18, no. 1, pp. 1–9, 2022.
- [45] C. D. Brown, "Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle," *Tropical animal health and production*, vol. 29, 1S–3S, 1997.
- [46] Z. Tian, X. Du, J. Du, S. Gao, R. Yu, M. A. Hassan, G. Liu, J. Luo, H. Yin, "Development of an indirect elisa based on the recombinant spm2 protein for detection of tropical theileriosis," *Acta tropica*, vol. 182, pp. 232–236, 2018.
- [47] M. Chaussepied, G. Langsley, "Theileria transformation of bovine leukocytes: A parasite model for the study of lymphoproliferation," *Research in immunology*, vol. 147, no. 3, pp. 127–138, 1996.

- [48] D. Dobbelaere, V. Heussler, “Transformation of leukocytes by theileria parva and t. annulata,” *Annual Reviews in Microbiology*, vol. 53, no. 1, pp. 1–42, 1999.
- [49] K. Tretina, H. T. Gotia, D. J. Mann, J. C. Silva, “Theileria-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks,” *Trends in parasitology*, vol. 31, no. 7, pp. 306–314, 2015.
- [50] R. Kannaiyan, D. Mahadevan, “A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy,” *Expert review of anticancer therapy*, vol. 18, no. 12, pp. 1249–1270, 2018.
- [51] P. P. Kar, P. B. Araveti, A. Srivastava, “Deciphering the kinome of theileria annulata for identification of drug targets and anti-theilerial drug,” *Ticks and Tick-borne Diseases*, vol. 13, no. 6, p. 102 049, 2022.
- [52] J. Ferrolho, A. Domingos, L. Campino, “Cattle specific immune mechanisms used against the protozoan theileria annulata,” *International Trends in Immunity*, vol. 4, no. 2, pp. 45–49, 2016.
- [53] B. J. Mans, R. Pienaar, A. A. Latif, “A review of theileria diagnostics and epidemiology,” *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, vol. 4, no. 1, pp. 104–118, 2015.
- [54] D. J. McKeever, “Bovine immunity—a driver for diversity in theileria parasites?” *Trends in Parasitology*, vol. 25, no. 6, pp. 269–276, 2009.
- [55] M. K. Shaw, “Cell invasion by theileria sporozoites,” *Trends in parasitology*, vol. 19, no. 1, pp. 2–6, 2003.
- [56] S. C. Bishop, J. A. Woolliams, “Genomics and disease resistance studies in livestock,” *Livestock science*, vol. 166, pp. 190–198, 2014.
- [57] N. McHardy, D. Morgan, “Treatment of theileria annulata infection in calves with parvaquone,” *Research in veterinary science*, vol. 39, no. 1, pp. 1–4, 1985.
- [58] G. Wilkie, C. Brown, E. Kirvar, M. Thomas, S. Williamson, L. Bell-Sakyi, O. Sparagano, “Chemoprophylaxis of theileria annulata and theileria parva infections of calves with buparvaquone,” *Veterinary parasitology*, vol. 78, no. 1, pp. 1–12, 1998.
- [59] H. M. Staines, R. Burrow, B. H.-Y. Teo, I. Chis Ster, P. G. Kremsner, S. Krishna, “Clinical implications of plasmodium resistance to atovaquone/proguanil: A systematic review and meta-analysis,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 73, no. 3, pp. 581–595, 2018.
- [60] S. G. Yousef, F. A. El Balkemy, H. M. El Damaty, “Mutations in theileria annulata cytochrome b gene associated with buparvaquone resistance in cattle, egypt.,” *Pakistan Veterinary Journal*, vol. 40, no. 2, 2020.
- [61] J. E. Hyde, “Drug-resistant malaria- an insight,” *The FEBS journal*, vol. 274, no. 18, pp. 4688–4698, 2007.
- [62] M. Mhadhbi, M. Chaouch, K. Ajroud, M. A. Darghouth, S. BenAbderrazak, “Sequence polymorphism of cytochrome b gene in theileria annulata tunisian isolates and its association with buparvaquone treatment failure,” *PloS one*, vol. 10, no. 6, e0129678, 2015.

- [63] E. Chatanga, E. Mosssad, H. A. Abubaker, S. A. Alnour, K. Katakura, R. Nakao, B. Salim, "Evidence of multiple point mutations in theileria annulata cytochrome b gene incriminated in buparvaquone treatment failure," *Acta tropica*, vol. 191, pp. 128–132, 2019.
- [64] R. Ullah, S. Shams, M. A. Khan, S. Ayaz, N. u. Akbar, Q. u. Din, A. Khan, R. Leon, J. Zeb, "Epidemiology and molecular characterization of theileria annulata in cattle from central khyber pakhtunkhwa, pakistan," *PloS one*, vol. 16, no. 9, e0249417, 2021.
- [65] Q. Ali, O. Zahid, M. Mhadhbi, B. Jones, M. A. Darghouth, G. Raynes, K. Afshan, R. Birtles, N. D. Sargison, M. Betson, *et al.*, "Genetic characterisation of the theileria annulata cytochrome b locus and its impact on buparvaquone resistance in bovine," *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol. 20, pp. 65–75, 2022.
- [66] S. Al-Hamidhi, M. H. Tageldin, W. Weir, A. Al-Fahdi, E. H. Johnson, P. Bobade, B. Alqamashoui, A. Beja-Pereira, J. Thompson, J. Kinnaird, *et al.*, "Genetic diversity and population structure of theileria annulata in oman," *Plos one*, vol. 10, no. 10, e0139581, 2015.
- [67] U. Chaudhry, Q. Ali, L. Zheng, I. Rashid, M. Z. Shabbir, M. Numan, K. Ashraf, M. Evans, S. Rafiq, M. Oneeb, *et al.*, "Contrasting population genetics of co-endemic cattle-and buffalo-derived theileria annulata," *Ticks and tick-borne diseases*, vol. 12, no. 1, p. 101 595, 2021.
- [68] T. Kiama, J. Kiara, V. Konji, A. Musoke, "Enzymes of glucose and glycerol catabolism in in vitro-propagated theileria parva schizonts," *The Veterinary Journal*, vol. 158, no. 3, pp. 221–227, 1999.
- [69] I. Icen-Taskin, O. Munzuroglu, H. Geckil, "Genetic engineering of theileria parva lactate dehydrogenase gene: A new anti-theilerial target," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 38, pp. 883–888, 2018.
- [70] D. L. Vander Jagt, L. A. Hunsaker, J. E. Heidrich, "Partial purification and characterization of lactate dehydrogenase from plasmodium falciparum," *Molecular and biochemical parasitology*, vol. 4, no. 5-6, pp. 255–264, 1981.
- [71] W. M. Brown, C. A. Yowell, A. Hoard, T. A. Vander Jagt, L. A. Hunsaker, L. M. Deck, R. E. Royer, R. C. Piper, J. B. Dame, M. T. Makler, *et al.*, "Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from the four species of human malarial parasites," *Biochemistry*, vol. 43, no. 20, pp. 6219–6229, 2004.
- [72] F. Kayamba, M. Faya, O. J. Poee, B. Kushwaha, N. D. Kushwaha, V. A. Obakachi, V. O. Nyamori, R. Karpoormath, "Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase: Potential antiparasitic targets for drug development studies," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 50, p. 116 458, 2021.
- [73] J. Penna-Coutinho, W. A. Cortopassi, A. A. Oliveira, T. C. C. França, A. U. Krettli, "Antimalarial activity of potential inhibitors of plasmodium falciparum lactate dehydrogenase enzyme selected by docking studies," *PloS one*, vol. 6, no. 7, e21237, 2011.

- [74] R. E. Royer, L. M. Deck, N. M. Campos, L. A. Hunsaker, D. L. Vander Jagt, “Biologically active derivatives of gossypol: Synthesis and antimalarial activities of peri-acylated gossylic nitriles,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 29, no. 9, pp. 1799–1801, 1986.
- [75] S. Bork, M. Okamura, S. Boonchit, H. Hirata, N. Yokoyama, I. Igarashi, “Identification of babesia bovis l-lactate dehydrogenase as a potential chemotherapeutical target against bovine babesiosis,” *Molecular and biochemical parasitology*, vol. 136, no. 2, pp. 165–172, 2004.
- [76] L. He, R. G. Bastos, L. Yu, J. M. Laughery, C. E. Suarez, “Lactate dehydrogenase as a potential therapeutic drug target to control babesia bigemina,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 12, p. 870852, 2022.
- [77] K. L. Kavanagh, R. A. Elling, D. K. Wilson, “Structure of toxoplasma gondii ldh1: Active-site differences from human lactate dehydrogenases and the structural basis for efficient apad+ use,” *Biochemistry*, vol. 43, no. 4, pp. 879–889, 2004.
- [78] D. Turgut-Balik, D. K. Shoemark, K. M. Moreton, R. B. Sessions, J. J. Holbrook, “Over-production of lactate dehydrogenase from plasmodium falciparum opens a route to new antimalarials,” *Biotechnology letters*, vol. 23, pp. 917–921, 2001.
- [79] A. Erdemir, M. Aktas, N. Dumanli, D. Turgut-Balik, *et al.*, “Isolation, cloning and sequence analysis of the lactate dehydrogenase gene from theileria annulata may lead to design of new anti theilerial drugs,” *Veterinárni medicína*, vol. 57, no. 10, pp. 559–567, 2012.
- [80] M. Adeva-Andany, M. López-Ojén, R. Funcasta-Calderón, E. Ameneiros-Rodríguez, C. Donapetry-García, M. Vila-Altesor, J. Rodríguez-Seijas, “Comprehensive review on lactate metabolism in human health,” *Mitochondrion*, vol. 17, pp. 76–100, 2014.
- [81] A. Farhana, S. L. Lappin, “Biochemistry, lactate dehydrogenase,” 2020.
- [82] M. Maes, T. Vanhaecke, B. Cogliati, S. C. Yanguas, J. Willebrords, V. Rogiers, M. Vinken, “Measurement of apoptotic and necrotic cell death in primary hepatocyte cultures,” *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, pp. 349–361, 2015.
- [83] J. I. Boucher, J. R. Jacobowitz, B. C. Beckett, S. Classen, D. L. Theobald, “An atomic-resolution view of neofunctionalization in the evolution of apicomplexan lactate dehydrogenases,” *Elife*, vol. 3, e02304, 2014.
- [84] M. S. Gomez, R. C. Piper, L. A. Hunsaker, R. E. Royer, L. M. Deck, M. T. Makler, D. L. Vander Jagt, “Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite p. falciparum,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 90, no. 1, pp. 235–246, 1997.
- [85] A. Fersht, *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Macmillan, 1999.

- [86] K. Suzuki, S. Maeda, K. Morokuma, “Roles of closed-and open-loop conformations in large-scale structural transitions of l-lactate dehydrogenase,” *ACS omega*, vol. 4, no. 1, pp. 1178–1184, 2019.
- [87] A. A. Khan, K. S. Allemailem, F. A. Alhumaydhi, S. J. Gowder, A. H. Rahmani, “The biochemical and clinical perspectives of lactate dehydrogenase: An enzyme of active metabolism,” *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, vol. 20, no. 6, pp. 855–868, 2020.
- [88] H.-L. Peng, H. Deng, R. B. Dyer, R. Callender, “Energy landscape of the michaelis complex of lactate dehydrogenase: Relationship to catalytic mechanism,” *Biochemistry*, vol. 53, no. 11, pp. 1849–1857, 2014.
- [89] A. Erdemir, O. Mutlu, “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*, vol. 74, pp. 344–351, 2017.
- [90] P. Nitisewojo, H. O. Hultin, “A comparison of some kinetic properties of soluble and bound lactate dehydrogenase isoenzymes at different temperatures,” *European journal of biochemistry*, vol. 67, no. 1, pp. 87–94, 1976.
- [91] H. Gutfreund, R. Cantwell, C. McMurray, R. Criddle, G. Hathaway, “The kinetics of the reversible inhibition of heart lactate dehydrogenase through the formation of the enzyme–oxidized nicotinamide–adenine dinucleotide–pyruvate compound,” *Biochemical Journal*, vol. 106, no. 3, pp. 683–687, 1968.
- [92] J. W. Burgner, W. J. Ray Jr, “On the origin of the lactate dehydrogenase induced rate effect,” *Biochemistry*, vol. 23, no. 16, pp. 3636–3648, 1984.
- [93] M. W. Eggert, M. E. Byrne, R. P. Chambers, “Impact of high pyruvate concentration on kinetics of rabbit muscle lactate dehydrogenase,” *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 165, pp. 676–686, 2011.
- [94] V. Sharma, S. Wakode, H. Kumar, “Structure-and ligand-based drug design: Concepts, approaches, and challenges,” *Chemoinformatics and bioinformatics in the pharmaceutical sciences*, pp. 27–53, 2021.
- [95] N. M. Tripathi, A. Bandyopadhyay, “High throughput virtual screening (htvs) of peptide library: Technological advancement in ligand discovery,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 243, p. 114 766, 2022.
- [96] E. O. Pyzer-Knapp, C. Suh, R. Gómez-Bombarelli, J. Aguilera-Iparraguirre, A. Aspuru-Guzik, “What is high-throughput virtual screening? a perspective from organic materials discovery,” *Annual Review of Materials Research*, vol. 45, pp. 195–216, 2015.
- [97] B. Shaker, K. M. Tran, C. Jung, D. Na, “Introduction of advanced methods for structure-based drug discovery,” *Current Bioinformatics*, vol. 16, no. 3, pp. 351–363, 2021.

- [98] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 23, no. 1-3, pp. 3–25, 1997.
- [99] S. Liu, M. Alnammi, S. S. Ericksen, A. F. Voter, G. E. Ananiev, J. L. Keck, F. M. Hoffmann, S. A. Wildman, A. Gitter, “Practical model selection for prospective virtual screening,” *Journal of chemical information and modeling*, vol. 59, no. 1, pp. 282–293, 2018.
- [100] M. A. Martí-Renom, A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Šali, “Comparative protein structure modeling of genes and genomes,” *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, vol. 29, no. 1, pp. 291–325, 2000.
- [101] “Protein data bank: The single global archive for 3d macromolecular structure data,” *Nucleic acids research*, vol. 47, no. D1, pp. D520–D528, 2019.
- [102] W. Li, K. R. O’Neill, D. H. Haft, M. DiCuccio, V. Chetvernin, A. Badretdin, G. Coulouris, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, A. S. Durkin, *et al.*, “Refseq: Expanding the prokaryotic genome annotation pipeline reach with protein family model curation,” *Nucleic acids research*, vol. 49, no. D1, pp. D1020–D1028, 2021.
- [103] S. Kim, P. A. Thiessen, E. E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, L. Han, J. He, S. He, B. A. Shoemaker, *et al.*, “Pubchem substance and compound databases,” *Nucleic acids research*, vol. 44, no. D1, pp. D1202–D1213, 2016.
- [104] J. J. Irwin, B. K. Shoichet, “Zinc- a free database of commercially available compounds for virtual screening,” *Journal of chemical information and modeling*, vol. 45, no. 1, pp. 177–182, 2005.
- [105] F. Stanzione, I. Giangreco, J. C. Cole, “Use of molecular docking computational tools in drug discovery,” *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 60, pp. 273–343, 2021.
- [106] R. Thomsen, M. H. Christensen, “Moldock: A new technique for high-accuracy molecular docking,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 49, no. 11, pp. 3315–3321, 2006.
- [107] A. Volkamer, D. Kuhn, T. Grombacher, F. Rippmann, M. Rarey, “Combining global and local measures for structure-based druggability predictions,” *Journal of chemical information and modeling*, vol. 52, no. 2, pp. 360–372, 2012.
- [108] J. Fan, A. Fu, L. Zhang, “Progress in molecular docking,” *Quantitative Biology*, vol. 7, pp. 83–89, 2019.
- [109] D. Rapaport, “Molecular dynamics simulation,” *Computing in Science & Engineering*, vol. 1, no. 1, pp. 70–71, 1999.
- [110] S. A. Adcock, J. A. McCammon, “Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins,” *Chemical reviews*, vol. 106, no. 5, pp. 1589–1615, 2006.

- [111] J. D. Durrant, J. A. McCammon, “Molecular dynamics simulations and drug discovery,” *BMC biology*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2011.
- [112] B. Wang, S. Tchessalov, N. W. Warne, M. J. Pikal, “Impact of sucrose level on storage stability of proteins in freeze-dried solids: I. correlation of protein–sugar interaction with native structure preservation,” *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 98, no. 9, pp. 3131–3144, 2009.
- [113] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, “Development and testing of the opls all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, no. 45, pp. 11 225–11 236, 1996.
- [114] M. D. Smith, J. S. Rao, E. Segelken, L. Cruz, “Force-field induced bias in the structure of  $\alpha\beta 21-30$ : A comparison of opls, amber, charmm, and gromos force fields,” *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 55, no. 12, pp. 2587–2595, 2015.
- [115] S. Singh, Q. B. Baker, D. B. Singh, “Molecular docking and molecular dynamics simulation,” in *Bioinformatics*, Elsevier, 2022, pp. 291–304.
- [116] O. M. Salo-Ahen, I. Alanko, R. Bhadane, A. M. Bonvin, R. V. Honorato, S. Hossain, A. H. Juffer, A. Kabedev, M. Lahtela-Kakkonen, A. S. Larsen, *et al.*, “Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development,” *Processes*, vol. 9, no. 1, p. 71, 2020.
- [117] V. Spahn, G. Del Vecchio, D. Labuz, A. Rodriguez-Gaztelumendi, N. Massaly, J. Temp, V. Durmaz, P. Sabri, M. Reidelbach, H. Machelska, *et al.*, “A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations,” *Science*, vol. 355, no. 6328, pp. 966–969, 2017.
- [118] B. Nural, A. Erdemir, O. Mutlu, S. Yakarsonmez, O. Danis, M. Topuzogullari, D. Turgut-Balik, “Biochemical and in silico characterization of recombinant l-lactate dehydrogenase of theileria annulata,” *Molecular biotechnology*, vol. 58, pp. 256–267, 2016.
- [119] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4,” *nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [120] S. Yakarsonmez, O. Danis, O. Mutlu, M. Topuzogullari, E. Sariyer, B. Yuce-Dursun, D. Turgut-Balik, “Discovery and evaluation of inhibitory activity and mechanism of arylcoumarin derivatives on theileria annulata enolase by in vitro and molecular docking studies,” *Molecular Diversity*, vol. 24, pp. 1149–1164, 2020.
- [121] M. Nita, A. Raducan, M. Puiu, D. Oancea, “Stabilization of catalase in the presence of additives,” *An. Univ. Bucur. Chimie*, vol. 1, pp. 39–44, 2007.
- [122] C. N. Cavasotto, S. S. Phatak, “Homology modeling in drug discovery: Current trends and applications,” *Drug discovery today*, vol. 14, no. 13-14, pp. 676–683, 2009.
- [123] L. Bordoli, F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey, T. Schwede, “Protein structure homology modeling using swiss-model workspace,” *Nature protocols*, vol. 4, no. 1, pp. 1–13, 2009.

- [124] N. Eswar, D. Eramian, B. Webb, M.-Y. Shen, A. Sali, "Protein structure modeling with modeller," *Structural proteomics: high-throughput methods*, pp. 145–159, 2008.
- [125] C. Colovos, T. O. Yeates, "Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions," *Protein science*, vol. 2, no. 9, pp. 1511–1519, 1993.
- [126] M. Wiederstein, M. J. Sippl, "Prosa-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins," *Nucleic acids research*, vol. 35, no. suppl\_2, W407–W410, 2007.
- [127] R. Laskowski, M. MacArthur, J. Thornton, "Procheck: Validation of protein-structure coordinates," 2006.
- [128] A. Volkamer, D. Kuhn, F. Rippmann, M. Rarey, "Dogsite scorer: A web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 15, pp. 2074–2075, 2012.
- [129] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, "Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments," *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 27, pp. 221–234, 2013.
- [130] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, *et al.*, "Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. method and assessment of docking accuracy," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1739–1749, 2004.
- [131] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, "Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 49, no. 21, pp. 6177–6196, 2006.
- [132] E. Albayrak, S. Koçer, O. Mutlu, "Identification of novel compounds against acinetobacter baumannii 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase i (fabB) via comprehensive structure-based computational approaches," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 124, p. 108565, 2023.
- [133] A. Fernández-Castané, C. E. Vine, G. Caminal, J. López-Santín, "Evidencing the role of lactose permease in iptg uptake by escherichia coli in fed-batch high cell density cultures," *Journal of biotechnology*, vol. 157, no. 3, pp. 391–398, 2012.
- [134] "Protein calculator." (2015), [Online]. Available: <https://pepcalc.com/protein-calculator.php> (visited on 12/11/2023).
- [135] R. J. Simpson, "Stabilization of proteins for storage," *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2010, no. 5, pdb-top79, 2010.
- [136] L. Momeni, S. Farhadian, B. Shareghi, "Study on the interaction of ethylene glycol with trypsin: Binding ability, activity, and stability," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 350, p. 118542, 2022.

- [137] D. Eisenberg, R. Lüthy, J. U. Bowie, “[20] verify3d: Assessment of protein models with three-dimensional profiles,” in *Methods in enzymology*, vol. 277, Elsevier, 1997, pp. 396–404.
- [138] K. Gopalakrishnan, G. Sowmiya, S. Sheik, K. Sekar, “Ramachandran plot on the web (2.0),” *Protein and peptide letters*, vol. 14, no. 7, pp. 669–671, 2007.
- [139] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, *et al.*, “Swiss-model: Homology modelling of protein structures and complexes,” *Nucleic acids research*, vol. 46, no. W1, W296–W303, 2018.
- [140] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, *et al.*, “Highly accurate protein structure prediction with alphafold,” *Nature*, vol. 596, no. 7873, pp. 583–589, 2021.
- [141] E. Krieger, K. Joo, J. Lee, J. Lee, S. Raman, J. Thompson, M. Tyka, D. Baker, K. Karplus, “Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in casp8,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 77, no. S9, pp. 114–122, 2009.
- [142] A. A. Al-Karmalawy, R. Alnajjar, M. Dahab, A. Metwaly, I. Eissa, “Molecular docking and dynamics simulations reveal the potential of anti-hcv drugs to inhibit covid-19 main protease,” *Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, no. Covid-19, S109–S121, 2021.

## TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

---

### Konferans Bildirisi

1. Selcan Akar, Mustafa Necati Hasimoglu, Özal Mutlu, Maria Orlenco, Erennur Uğurel, Dilek Turgut Balik, “ Homology Modeling and *In Silico* Inhibitor Screening of Lactate Dehydrogenase from *Theileria annulata*” 9th International BAU Drug Design Congress, 29 November- December 02, 2023, Istanbul/Türkiye.

