

T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mycobacterium tuberculosis PROTEİN KİNAZ K'nın SİNYAL İLETİMİNDEKİ
ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA
ARAŞTIRILMASI

ALEV ARSLANTÜRK BİNGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
HAZİRAN - 2019

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DIYARBAKIR

Alev ARSLANTÜRK BİNGÜL tarafından yapılan “Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinaz K'nın Sinyal İletimindeki Rolünün Moleküler Modelleme Yaklaşımlarıyla Araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYA Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan:Prof. Dr. Ebru İnce Bostancı

Üye : Prof. Dr. Necmettin Pirinçioğlu

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selami Ercan

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/06/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Prof.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Danışmanım Sayın Prof. Dr. Necmettin Pirinççiođlu'na tezimin her adımında katkılarından ve sabrından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Gerek hesaplamalı kimya gerek organik kimya alanındaki engin bilgilerini paylaşımından, her ihtiyacım olduğunda sorularım ve problemlerim için vakit bulabilmesinin yanısıra, çözümcül ve pozitif yaklaşımları için ne kadar teşekkür etsem yetmeyeceğini bilerek çok teşekkür ediyorum. Profesör David Case'e çalışmalarım için AMBER lisansını bana ücretsiz sağladığı için sonsuz şükranlarımı sunarım. Ayrıca çalışmamın, maddi olarak FEN.19.002 nolu projeye desteklenmesinde katkısı olan DUBAP (Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri)'a teşekkür etmek istiyorum. Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne sunduğu olanaklardan dolayı teşekkür ediyorum.

Eşim Murat Bingöl'e desteği ve ileri görüşlülüğu için teşekkürlerimle ve küçük kızım Derin Bingöl'e en içten sevgilerimi bildirmek istiyorum.

Doç. Dr. Şafak Özhan Kocakaya'ya ve Dr. Öğretim Üyesi. Selami Ercan'a destekleri ve yardımları için, Annem Selma Arslantürk ve Babam Atilla Arslantürk'e her zaman devam etmem ve ileriye bakmam yönündeki destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

ÖZET

Mycobacterium Tuberculosis PROTEİN KİNAZ K'nın SİNYAL İLETİMİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alev ARSLANTÜRK BİNGÜL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2019

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) bakterisinin sebep olduğu tüberküloz zorlu ve ölümcül olabilen bir hastalık olmakla beraber tedavisi mümkündür. Kullanımda olan ilaçların 40 yıl üzerinde bir geçmişi olması, gelişen ilaç direnci ile birlikte sinyal iletim süreçlerinin ve mekanizmanın aydınlatılması yeni ilaç keşfi noktasında önemlidir.

Bu çalışmada *Mtb*'deki ökaryotik benzeri 11 Ser/Thr kinazdan biri olan Protein Kinaz K (PknK)'ın sinyal iletimindeki yeri ve bu iletişimde VirS ile olan ilişkisini moleküler modelleme (moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik) yaklaşımları ile araştırılması hedeflendi. Fosforlamanın PknK'nın konformasyonundaki rolleri ve bunun VirS ile moleküler tanımasına etkisi araştırıldı. Öncelikle PknK'nın ve virS proteinlerinin üç boyutlu yapıları homoloji modelleme yaklaşımı ile tasarlandı. Moleküler dinamik hesaplamalar PknK'daki Thr179, Thr181, Ser187 artıklarının fosforilasyonu sonucu proteinin anlamlı konformasyonel değişikliğe uğradığını gösterdi. Bu değişikliklerin VirS'nin tanınmasında önemli olabileceğini düşündürdü. Benzer bir şekilde moleküler dinamik hesaplamalar VirS'nin Ser252, Ser311, Thr327, Thr248 artıklarındaki fosforilasyonunun bu proteinde anlamlı konformasyonel değişikliklere neden olduğunu gösterdi. Bu değişikliklerinde VirS'nin MymA operonundaki DNA fragmentine bağlanmada önemli rol oynayacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: PknK, VirS, Moleküler Dinamik Simülasyon, Tüberküloz, Homoloji Modelleme

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE ROLE OF PROTEIN KINASE K IN SIGNAL TRANSDUCTION IN *Mycobacterium Tuberculosis* BY MOLECULAR MODELLING APPROACHES

Msc THESIS

Alev ARSLANTÜRK BİNGÜL

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DICLE UNIVERSITY

2019

Tuberculosis is a disease caused by the bacterium of *Mycobacterium tuberculosis*. The fact that the drugs in use have a history of more than 40 years and the elucidation of the drug resistance as well as the signal transmission processes and the mechanism are important for the discovery of new drugs. The current study has an objective to investigate the role of phosphorylation of Protein Kinase K (PknK), which is one of these 11 kinases, in the molecular recognition of its main substrate by molecular modelling approaches. First of all, because of the lack of 3D structures of PknK and VirS, the homology modelling was applied to have these structures for both proteins. The results indicated that the phosphorylation of corresponding threonine and serine has a significant impact on the recognition of VirS. Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER) was applied throughout the calculations.

MD calculations as in periodic box for both proteins (PknK and VirS) design by homology modelling indicate that both models have been constitute in a good manner. Phosphorylation at Thr179, Thr181, Ser187 residues caused significant changes on the conformation of the protein which maybe the driving force in the recognition of VirS. The conformational changes induced by the phosphprylation of Ser252, Ser311, Thr327, Thr248 resiuies in VirS. The binding to MymA operon.

Key words: Tuberculosis, Homology Modelling, Moleculer Dynamic Simulation, PknK, VirS

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	2016–2020 yıllarında Dünya Sağlık Örgütü tarafından TB, TB/HIV ve MDR-TB için yüksek risk taşıyan bölgeler	2
Şekil 1.2.	Tahmini TB vaka oranları 2017	2
Şekil 1.3.	Tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seviye ilaçlar	3
Şekil 1.4.	Filipinler (6%), Pakistan (5%), Nijerya (4%), Bangladeş (4%) ve GüneyAfrica(3%)	5
Şekil 2.1.	İki bileşenli sistemlerde ve Serin/Threonin Protein Kinazlarda sinyal iletimi	8
Şekil 2.2.	Proteinlere fosfat ilavesini katalize eden protein kinaz aktiviteleri ve proteinlerden fosfat çıkaran fosfataz aktiviteleri ile protein fosforilasyonunun düzenlenmesi (Weber2010)	12
Şekil 4.1.	PknK'nin LOMETS modeli	26
Şekil 4.2.	Mg içeren PknK'nin 25 ns süre ile 300 K de moleküler dinamik hesaplamalar sonucu elde edilen en kalabalık kümenin (mavi) homoloji model (açık kahverengi) ile üst üste çakıştırılmış görüntüsü	26
Şekil 4.3.	PknK-Mg'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı RMSD (sağ) ve enerji (sol) değişimleri	27
Şekil 4.4.	Mg içermeyen PknK'nin 25 ns süre ile MD hesaplamaları sonucu en kalabalık kümeyle ait yapının (açık mavi) PknK-Mg'un 25 ns süreyle 300 K'de MD hesaplamalardan elde edilen en kalabalık kümeyle ait yapıyla (açık kahve) çakıştırılması(1.288 Å ⁰ sapma ile) sonucu oluşan görüntü.	28
Şekil 4.5.	PknK'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri	28
Şekil 4.6.	T179P-PknK'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede	29

periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi)'nin karşılaştırılması (1.323 A^0 sapma ile) sonucu oluşan görüntü.

- Şekil 4.7.** T181P-PknK'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi) 'nin karşılaştırılması(1.272 A^0 sapma ile) sonucu oluşan görüntü 30
- Şekil 4.8.** S187P-PknK'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi)'nin karşılaştırılması(1.262 A^0 sapma ile) sonucu oluşan görüntü 30
- Şekil 4.9.** THR179P-PknK'nin 20 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol). 31
- Şekil 4.10.** THR181P-PknK'nin 23 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol). 31
- Şekil 4.11.** SER187P-PknK'nin 24 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol). 32
- Şekil 4.12.** SER187-THR181-THR179P PknK'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi) 'nin karşılaştırılması(1.476 A^0 sapma ile) sonucu oluşan görüntü. 32

Şekil 4.13.	SER187-THR181-THR179P PknK'nın 20 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).	33
Şekil 4.14.	Homoloji model hesaplamalar ile elde edilen VirS'nin 3 boyutlu yapısı.	34
Şekil 4.15.	VirS'nin 24 ns süre ile 300 K de moleküler dinamik hesaplamalar sonucu elde edilen en kalabalık kümenin (mavi) homoloji model (açık kahverengi) ile karşılaştırılmasıyla oluşan görüntü.	34
Şekil 4.16.	VirS'nin 24 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol)	35
Şekil 4.17	VirS-T248-P'nin 25 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış virS (açık kahve) ile karşılaştırılmasıyla(1.068 Å sapma ile) sonucu oluşan görüntü.	36
Şekil 4.18.	VirS-T248-P'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).	36
Şekil 4.19.	VirS-S252-P'nin 25 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış virS (açık kahve) ile karşılaştırılmasıyla(1.372 Å sapma ile) sonucu oluşan görüntü.	37
Şekil 4.20.	VirS-252-P'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).	38
Şekil 4.21.	VirS-311-P'nin 24 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış virS (açık kahve) ile üst üste karşılaştırılması (1.341 Å sapma ile) sonucu elde	39

edilen görüntü.

- Şekil 4.22** VirS-311-P'nin 24 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol). 40
- Şekil 4.23** VirS-T327-P'nin 25 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış VirS (açık kahve) ile karşılaştırılmasıyla (1.288 \AA sapma ile) sonucu oluşan görüntü. 41
- Şekil 4.24** VirS-T327-P'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol). 41

KISALTMA VE SİMGELER

TB	: Tüberküloz
Mtb	: Mycobacterium Tuberculosis
PknK	: Protein Kinaz K
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
VirS	: Transkripsiyonel regülatör
MymA	: Mycobacterial monooxygenase
Thr	: Threonin
Ser	: Serin
BCG	: Bacille Calmette-Guérin
CADD	: Bilgisayar destekli ilaç tasarımı
AMBER	: Assisted Model Building with Energy Refinement

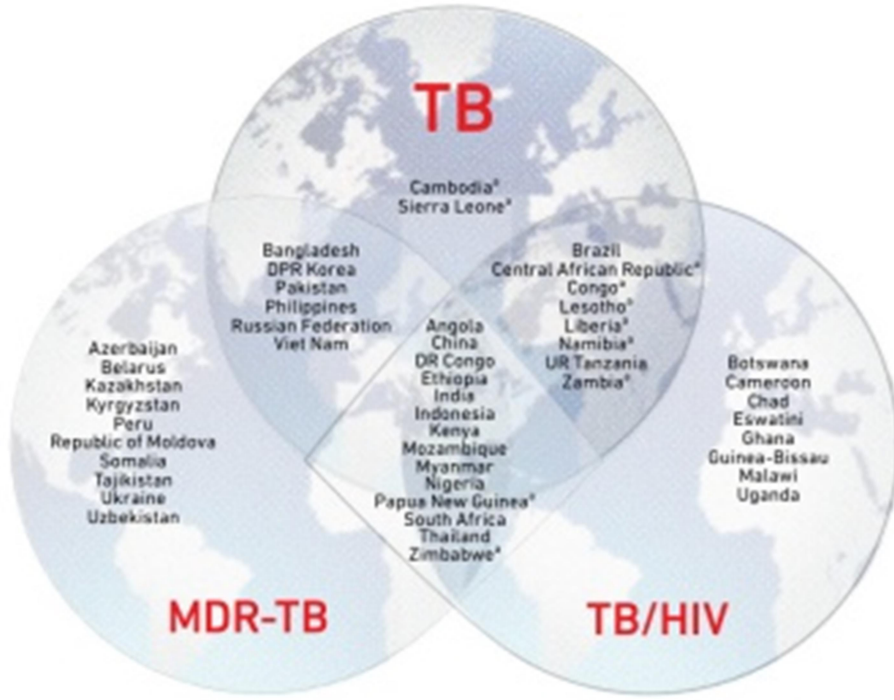
1.GİRİŞ

1.1. Tüberküloz

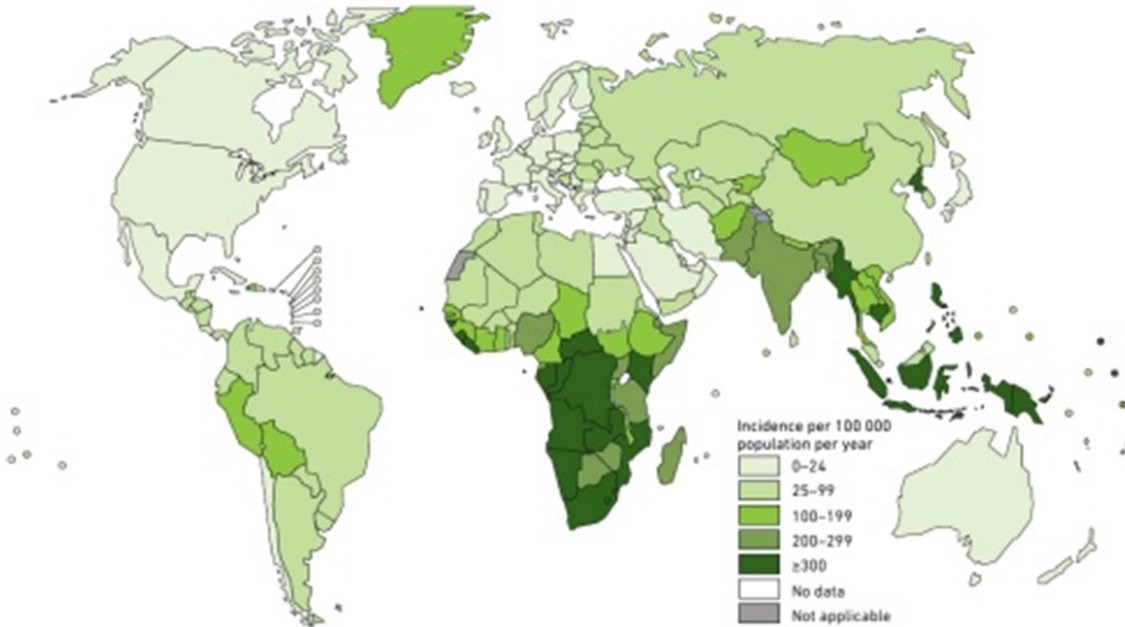
Dünyanın en eski ve en ölümcül hastalıklarından biri olma özelliğini halen koruyan Tüberküloz (TB), insan alveolar makrofajlarında hayatta kalan ve çoğalan basil *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* bakterisinin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Mtb bakterisinin neden olduğu hastalık, 1882 yılında Robert Koch tarafından keşfedilmiş (Koch 1884, Koch 1982) ve 1905 yılında Koch'a tıp alanında Nobel ödülünü kazandırmıştır. Bu nedenle Koch bacillus olarak da tanınan bakterinin genomu 1999 yılında çözülebilmiştir. Mtb bakterisinin en önemli özelliklerinden biri hücre duvarında çok miktarda mikolik asit içermesidir. *Mycobacterium tuberculosis* ve leprae bakterilerinin tek konakçuları insandır.

Tüberküloz Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2018 yılı raporlarına göre, 2017 yılında tahmini 1.3 milyon kişinin ölümüyle sonuçlanmasının yanı sıra üç yüz bin HIV'li hastanın ölümüne de sebep olduğu belirlenmiştir. 2017 yılında dünya genelinde 1 milyonunu 15 yaşından küçük çocukların oluşturduğu tahmini 10 milyon kişi hastalığa yakalanmıştır. %9'unu HIV'li hastaların oluşturduğu %90'luk yetişkin kesim içinde Afrika %72, Hindistan %27, Çin % 9, Endonezya %8, Filipinler %6, Pakistan % 5, Nijerya %4, Bangladeş %4 , ve Güney Afrika %3 oranında yer almaktadır. %3 Avrupa ve %3 Amerika oranları ile de tüm dünyada varlığını göstermiştir.

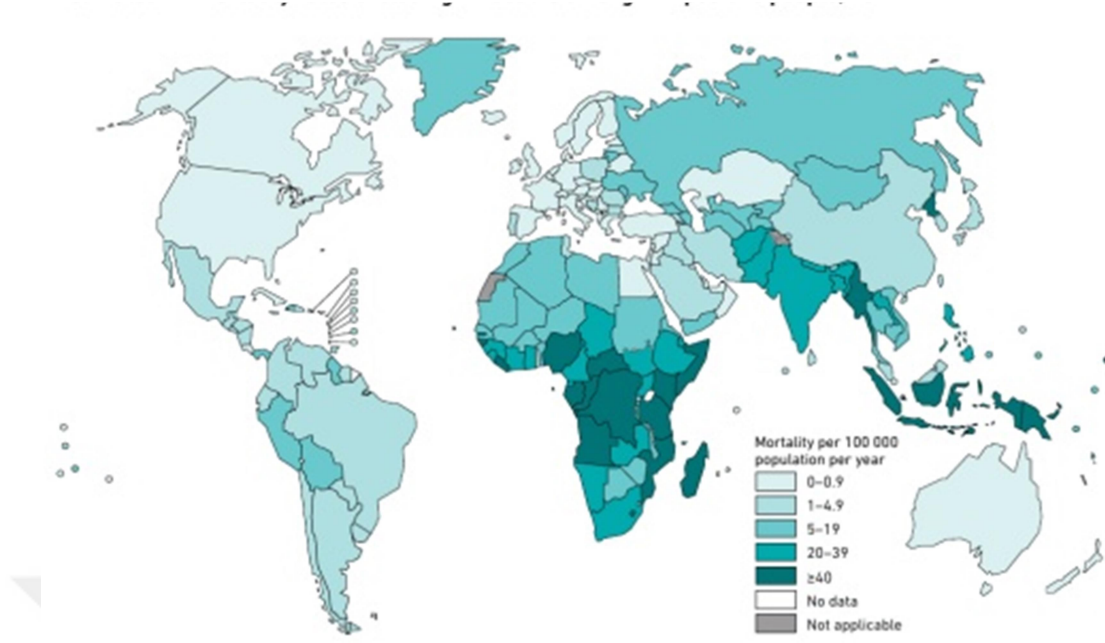
1. GİRİŞ



Şekil 1.1. 2016–2020 yılları arasında Dünya Sağlık Örgütü tarafından TB, TB/HIV ve MDR-TB için yüksek risk taşıyan bölgeler



Şekil 1.2. Tahmini TB vaka oranları, 2017



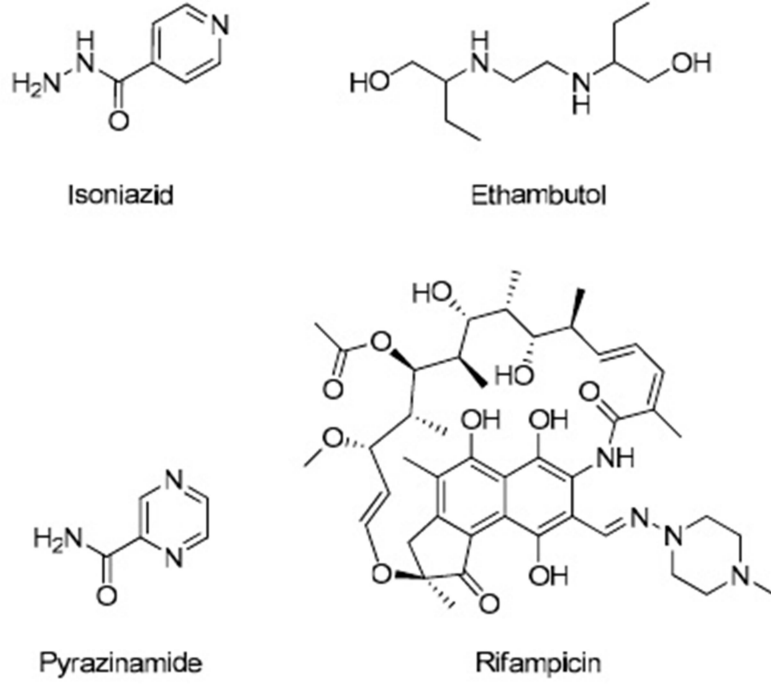
Şekil 1.3. Filipinler (6%), Pakistan (5%), Nijerya (4%), Bangladeş (4%) ve Güney Africa (3%)

Mtb bakterisi birçok bileşiğe karşı geçirimsiz bir hücre duvarı ile çok yavaş bir şekilde bölünen bir bakteridir (Hett ve Rubin 2008). Mikroorganizma, aktif enfeksiyonu olan insanlardan yayılan bakteri içeren damlacıkların solunması yoluyla yayılır. Pulmoner alveollerde konağın makrofajları ile fagosite olur. Kapsüllenmiş bakteriler, bireyin içinde yıllarca uykuda kalma yeteneğine sahiptir. Enfekte bir bireyin bağışıklık sistemi yaş, bağışıklık sistemi baskılayıcı tedavi ya da HIV gibi faktörlerle zayıflarsa, enfeksiyon aktif hale gelebilir (Saunders ve Britton 2007). Uzun tedavi süresinin yanı sıra çeşitli yan etkilerin bir sonucu olarak, çoklu dirence sahip tüberküloz (Multidrug-resistant tuberculosis MDR-TB) gelişimini kolaylaştıran ilaç uygulama programlarına düşük bir bağlılık vardır.

TB tedavisindeki ilk ilaç *Streptomyces griseus*'dan izole edilen bir antibiyotik olan Streptomycin (SM) dir (Youmans ve Williston 1946). 1943 yılında Selman A. Waksman tarafından keşfedilmiş ve 1952 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür (Schatz ve Waksman 1944). Kısa bir süre sonra ikinci anti-TB ilacı, para-amino salisilik asit (PAS), İsviçreli kimyager Jörgen Lehmann tarafından 1949 yılında keşfedilmiştir. 1946 dan sonra İsoniazid (1952), Pyrazinamide (1954), Cycloserine (1955), Ethambutol

(1962) ve Rifampin (Rifampicin; 1963) başta olmak üzere yeni ilaçların keşfi devam etmiştir. Hem SM hemde PAS birincil ilaçlardan olmasa da halen kullanılmaktadır. SM'nin kullanımı ilaç direncine bağlıdır.

DSÖ'nün rapor ettiği üzere, tipik TB tedavisi, dört antibiyotikten oluşan altı aylık bir kombinasyonel terapi (Rifampisin, İsoniazid, Pirazinamid ve Etambutol) uygulamasından oluşmaktadır (Blumberg ve ark. 2003, Blasive ark. 2009). Rifampisin (RIF) terapinin temel bileşeni olarak bildirilmiştir (Burman ve ark. 2001) (Petri ve ark. 2001). İsoniazid, Pyrazinamide, Ethambutol ve Rifampicin ilk 2 aylık süreçte başlanarak, takip eden 4 ay ise tedavi Rifampicin ve İsoniazid kullanımıyla devam etmektedir. Isoniazid ve Ethambutol bakterinin hücre duvarı sentezini engellediği düşünülmektedir. Pyrazinamide (PZA)'nın hedefi çok belirli olmamakla beraber yağ asidi sentezini engellediği ya da zar (membrane) kuvvetlerini (energetics) değiştirebildiği ileri sürülmektedir. Rifampicin RNA polimeraz aktivitesini inhibe ederek gen transkripsiyonunu durdurarak (Petri ve ark. 2001). bakteriyel RNA sentezini hedef alır. İlaçların yan etkileri oldukça geniş bir spektrumda gözlenebilir. Cilt reaksiyonları, görme kalitesinde azalma, hepatit, karaciğerde fonksiyon bozuklukları, bulantı, kusma, karın ağrısı gibi mide bağırsak problemleri periferik nörotoksisite nörolojik rahatsızlıklar gibi hastanın yaşam şartlarını zorlaştıran yan etkiler, hastanın ilaçları gerekli şekilde kullanmasına engel olarak durumun ilaç direnci geliştirmesine kadar gitmesine sebep olabilmektedir. İlaç direnç gelişimi ilacın düzenli alınmaması, verilen tedaviye düzgün bir şekilde devam edilmemesi ile ortaya çıkabileceği gibi büyük bir bakteri topluluğu, tedaviye uygun olmayan ilaç ve dozların reçete edilmesi, ilaç sağlanamaması ve gelişmemiş sağlık hizmetlerinden de kaynaklanabilir (Saxena ve ark. 2014).



Şekil 1.4. Tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seviye ilaçlar

Kullanılan birincil ve ikincil derece ilaçlara ilave olarak tüberküloza karşı geliştirilen ilk aşı Bacille Calmette-Guérin (BCG) yani BCG aşısıdır. (BCG) aşısı 80 yıldır var olan bir aşı olmasına rağmen çocuklarda menenjitte karşı koruma sağladığı ve tüberkülozun yayılmasına karşı koruyucu etkisi nedeniyle tüm aşılar içinde halen en çok kullanılan aşılarından biridir (Andersen 2005). Bu aşının önemi Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2018 yılında yayınladığı aşı standart dizasyonu raporlarında vurgulanmış, aşının kontrolü ve üretimi için uluslararası şartlar belirlenmiştir. Buna karşın, BCG ilk enfeksiyonu engelleyememesi ve daha önemlisi kuluçka dönemindeki pulmonar enfeksiyonun aktif hale gelmesini durduramaması sebepleriyle bu aşısının etkisi sınırlıdır. Mtb ile insan konağı arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasıyla yeni deneysel aşılar araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarla etkinliği BCG den daha fazla olan aşıların keşfi hedeflenmektedir. Yeni keşifler gerçekleşene kadar kulanımda olan BCG aşısı tavsiye edilmektedir (Kaufmann 2005). İlaça dirençli Mtb bakterisi, dünya sağlığı için her geçen yıl daha ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. DSÖ'nün yayınladığı güncel rapora göre, 2017 yılında TB'a yakalanan beş yüz elli bin kişi hastalığa karşı kullanılan birincil seviye ilaçlardan Rifampicin'e direnç göstermiş bununla beraber bu beş yüz elli

bin kişinin %82 gibi büyük bir yüzdesi çoklu ilaç direnci göstererek durumun ciddiyetini üst seviyelere taşımıştır. Rifampicin (RIF) ve İsoniazid için tanımlanan çoklu ilaç direncinin (ÇİD) yanı sıra Fluoroquinolone türevleri ve enjekte edilebilen ilaçlardan olan Capreomycin, Kanamycin Andamikacin için gelişmiş ilaç direnci (extensively drug-resistant -XDR) tanımlanmıştır. Tedavi edilebilir bir hastalık olan TB'a karşı geliştirilen bu ilaç direnç kavramları tedaviyi ve hastalığın dünya genelinde sona erdirilmesini zorlaştırmaktadır (Youmans ve Williston 1946, Gillespie 2002).



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

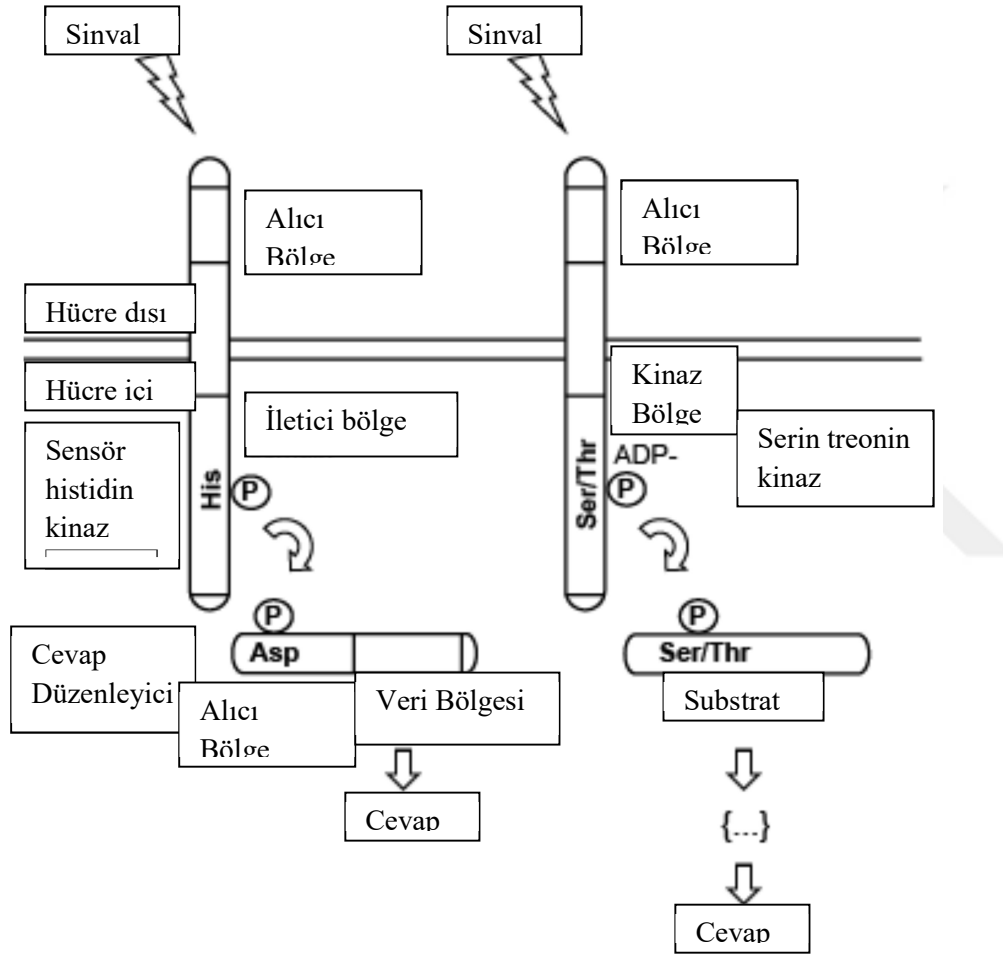
Mycobacterium tuberculosis patogenezinin önemli bir özelliği, makrofajlarda *Mtb* enfeksiyonu sırasında karşılaşılan stres ortamlarında sağkalımı sağlamak için büyüme hızını değiştirme konusundaki doğuştan gelen yeteneğidir (Beste ve ark. 2007). Olumsuz koşullar altında bakteri hücrelerinin büyümeyi yavaşlatma kabiliyeti nadir değildir, ancak *Mtb* için etkileri büyüktür. Tam olarak anlaşılmayan mekanizmalar sayesinde, *Mtb*, bugün gizli latent TB riskinin temelini oluşturan bir uyku hali veya devamlılık durumuna geçiş yapabilir (Ginsberg ve Spigelman 2007). Mikobakteriyel devamlılık/uyku haline yol açan düzenleyici mekanizmaların anlaşılması, TB araştırmalarının güncel odağıdır. Bu uyarlanabilirlikteki merkezi eleman, belirli ortamlardan gelen dış sinyalleri tanıma ve yorumlama ve bu sinyallerin transkripsiyonel aktivasyon veya engellemeye dönüştürülmesi yeteneğidir.

2.1. Sinyal İletimi

Sinyal iletimi, tüm canlı hücrelerin temel bir aktivitesidir. Genel olarak tanımlanmış olan sinyal iletimi, bir sinyalin veya girişin algılanması ve bunun hücre fizyolojisini değiştiren bir çıktıya veya tepkiye dönüşmesidir. Sensör, sinyali algılayan bir bölge yada moleküldür (tipik bir protein). Bölge, dönüştürücü sinyali bir tepkiye dönüştüren alandır. En yaygın olarak, sinyal iletimi, sitoplazmik membran ve hücre içi bir cevaba dönüşerek iletilen bir hücre dışı sinyalin algılanması anlamına gelir. Çevresel sinyallerin hücreye iletimi ve hücrede gen ifadesi/aktivasyonunda değişikliklere sebep olmasıyla sonuçlanan sinyal iletimi, hücre adaptasyonu için kritiktir.

Organizmalar, sinyal iletimini düzenleyerek hayatta kalmalarını sağlamak için çevresel sinyalleri algılama ve bunlara yanıt verme kabiliyetine sahiptir. Değişen çevre koşullarına uyum sağlama, etkili izleme ve hızlı cevap gerektirir. Sinyal iletim mekanizması hücrelere yardımcı olur, onlar tarafından ortaya çıkan ve hücre işleme dönüştürülen ekstra hücre sinyalleri tespit eder. *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) dahil bakteriyel patojenler söz konusu olduğunda bu tepkiler, patojenlerin insan konakçısında enfeksiyon sırasında ve seyrinde patojen tarafından karşılaşılan ortamlarda büyümeye ve/veya hayatta kalmaya izin verir. Bakterilerdeki en yaygın olarak dağılmış ve yoğun olarak çalışılan hücre içi sinyalizasyon sistemleri iki bileşenli sistemlerdir

(West ve Stock 2001). *Mtb* bakterisinde transmembran sinyalleşmesinin diğer ana mekanizması, Serin/Treonin protein kinazlardır (STPK'lar). Neredeyse tüm bakteri filamentlerinde ana sinyalleşme mekanizması olan iki bileşenli sistemlerin aksine, STPK'lar farklı bakteri grupları arasında daha az yaygındır. Hem iki bileşenli sistemler hem de STPK lar bu organizmanın sinyal iletim mekanizmasında önemlidir. Sinyal iletiminin genel mekanizması Şekil 2.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. İki bileşenli sistemlerde ve Serin/Threonin Protein Kinazlarda sinyal iletimi (Bharati ve ark. 2013) Sol Taraf: İki Bileşenli Sistemler. Sensör kinaz bölge sinyali algılar ve Histidinde otofosforillenme gerçekleşir. Fosfat, sinyal alıcı bölgedeki aspartat kalıntısına transfer olur. Çıkış bölgesinin aktive olmasıyla gelen sinyal hücresel cevap olarak iletilmiş olur. Sağ Taraf: Serin/threonin kinaz: Proteinin C-ucundaki sinyali alan bölge kinazın aktivasyon/konformasyonel değişikliğine neden olur. N ucundaki kinaz bölge, ATP ye bağlanır ve γ -fosfat substratın Ser yada Thr kalıntısına transfer edilerek cevap iletilir.

Hücre sinyali, çevresel sinyallerin hücelere aktarıldığı, sonuç olarak gen ifadesi ve aktivitesinde değişikliklere yol açan bir süreçtir. Bunun gerçekleştiği başlıca mekanizmalardan biri, hücrel proteinlerin geri dönüşümlü fosforilasyonudur. Prokaryotlarda protein fosforilasyonu, kemotaksis, bakteriyofaj enfeksiyonu, besin alımı ve gen transkripsiyonu gibi çeşitli olaylarda düzenleyici bir rol oynar. Sinyal sistemleri genellikle hastalığın ilerlemesi sırasında bakterinin hastalık yapıcı (patogenik) virülans faktörünün aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar.

Önceleri iki bileşenli sistemler bakterinin çevresel algılaması için bilinen tek araç iken (Stock ve ark. 2000), (Foussard ve ark. 2001), ökaryotlarda sinyal vermek, temel olarak, bir dizi Serin/Treonin/Tirozin kinazın ve bunlarla ilişkili fosfatazların koordineli eylemini gerektiren protein fosforilasyon basamakları ile gerçekleştirilir. Bu protein kinazlar, ATP veya GTP'den bir fosfat grubunu, bir protein substratının spesifik Serin, Treonin ve Tirozin aminoasitlerine transfer eder. Fosforilasyon işlevsel olarak substratı aktive eder ya da spesifik bir aktivite ya da hücrel lokalizasyonu gerçekleştirir. Buna ek olarak fosfat grubunu bir sinyal-cevap şeklinde devam eden basamaklı reaksiyonların bir basamağını başlatan aşağı bölgesindeki efektöre aktarır. Defosforilasyon ise aktivatörleri ve efektörleri, bir sonraki sinyal için sistemi hazırlayan başlangıç fazlarına geri getirir. Böylece kinazlar ve fosfatazlar spesifik sinyal iletim yollarını modüle ederek ON/OFF anahtarları olarak işlev görür (Huse ve Kuriyan 2002).

Prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda sinyal iletim mekanizmasının farklı mekanizmalara aracılık ettiği varsayılmaktadır. Bakteriyel patojenlerde ökaryotik benzeri sinyal sistemlerinin keşfedilmesi, fonksiyonlarını anlamada önemli rol oynamıştır. Çok sayıda Ser/Tre Protein Kinaz (STPK) inhibitörü, insanlarda kullanım için FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (Cheng ve Force 2010) ve yaklaşık 150 kinaz inhibitörü de klinik deney sürecindedir (Sachsenmaier 2001). STPK'lar da terapötik stratejilerdeki potansiyel araçlar araştırılmaktadır (McConnell ve Wadzinski 2009), (Lu ve ark. 2009), (Pham ve ark. 2012). Bu nedenle, insan patojenlerinde ökaryotik STPK'lar üzerine yapılan çalışmalar, gelecekteki anti-infektif tedavilerde bu bileşenleri kullanma olasılığı nedeniyle önem kazanmıştır. STPK'ların bakteriyel üreme ve patojenezine olan katkısı, diğer sinyal sistemlerinde gözlemlendiği gibi çok yönlüdür. Bakterinin, enfeksiyonun farklı aşamalarında gizli bir enfeksiyon ve nihayet uykuda kalma durumundan resüsitasyon oluşturma yolunda ifade

edilen birçok virülans faktörü vardır. Genom sekans analizleri *Mtb* için dördünün (PknH, PknI, PknK ve PknG) hücre içi virulansa dahil olduğunu ortaya çıkarmıştır. PknH, PknI, PknK ve PknG STPK'ların genetik mutantları ile yapılan çalışmalar, enfeksiyon oluşturmadaki rollerini ortaya koymuştur.

Reseptör protein kinazlar, hücre dışı etkilere cevap olarak hücre fizyolojisini düzenlemede rol oynar. Ökaryotik benzeri STPK'lar bakteri içindeki sinyallerde reaktivasyon, büyüme, varlığını sürdürme virulans gibi çok önemli roller alırlar. Bu Ser/Tre/Tyr kinazlar moleküler açma kapama düğmeleridir. Birçok yapısal olayda STPK'lar aktif durumda "ON", inaktif durumda "OFF" konumdadır. Genel olarak Ser/Tre/Tro protein kinazlar OFF konumda bulunur. Sinyaller otoinhibisyonu hafifletir. Aktif yapıların tersine engellenen (inhibe edilen) durumlar çeşitlilik gösterir. Birkaç yapısal element ATP bağlanmasını, protein-substrat bağlanmasını ve katalitik grupların hizalanmasını kontrol etmek için aktif bölgede birleşir. Kapalı durumda, aktivasyon döngüsü (loop) genellikle aktif bölgeyi bloke eder veya esnek kalır. Buna karşılık, fosforlanmış aktivasyon döngüsü farklı bir konformasyon benimser. Aktif konformasyonu stabilize eden bir Tre bağlama bölgesini birleştirir. Bu konformasyonel düzenleme ATP erişimine izin verir, katalitik makinenin dağılmış elemanlarını bir araya getirir ve protein-substrat bağlama bölgesinin bir parçasını oluşturur (Banavali ve Roux 2009).

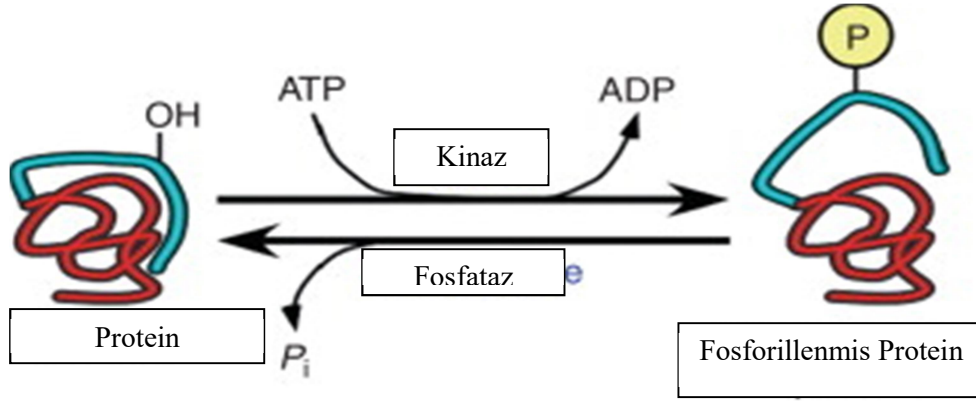
2.2. Protein Fosforilasyonu

Protein fosforilasyonunun temel mekanizması dışarıdan gelen sinyallerin hücre içi cevaplara çevrilmesi işlemidir. Fosforilasyon, spesifik protein kinazlarla yapılırken tersi mekanizma olan defosforilasyon protein fosfatazlar ile yürütülür. Bakterilerde bu işlem histidin kinaz sensörleri ve bu sensörlerle ilgili cevapsal düzenleyicileri içeren iki bileşenli sistemler tarafından yapılır. Ökaryotlarda ise protein fosforilasyonu serin, treonin ve tirozin kalıntıları ile fosforillenmesiyle sonuçlanır. Ökaryotik protein kinazlar ve fosfatazlar sinyal iletiminin temel taşıdır. Daha önceleri Ser, Tre ve Tro'lerin ve onların fosfatazlarının sadece ökaryotlarda bulunduğuna inanılmasına rağmen artık biliniyor ki prokaryotlar da protein kinazları ve fosfatazları içerirler.

Tersine çevrilebilir fosforilasyon, bir proteinin "açık" veya "kapalı" durumundaki aktivitesini düzenleyen bir ikili anahtar olarak işlev görebilir.

Fosforilasyon, substrata ve fosforilasyon bölgesine bağı olarak aktifleştirici veya inhibe edici bir sinyal olarak işlev görebilir. Birçok protein, protein fosforilasyonu yoluyla ortak bir substrattan çoklu sinyal yollarının integrasyonunu mümkün kılan farklı protein kinazlar ile düzenlenen çoklu fosforilasyon bölgelerine sahiptir. Fosforilasyon, aktivite, üçüncül yapı ve hücre altı (subcellular) dağılımı dahil olmak üzere protein fonksiyonunun birçok yönünü etkiler. Fosforilasyon, proteinlerin son derece yaygın bir post-translasyonel modifikasyonu olup çoğu sinyal yolu boyunca bir veya daha fazla proteinin aktivitesini düzenler. Diğer biyolojik olayların yanı sıra, fosforilasyon ve defosforilasyon, metabolik enzimleri, hücre hareketliliğini, membran kanallarını, çekirdeğin düzenlenmesini ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eder. Fosforilasyon bazı işlemleri başlatırken bazılarını durdurur. Her iki durumda da, hem bir protein kinaz tarafından bir fosfat eklenmesi hem de bir protein fosfataz tarafından uzaklaştırılması, düzenlenme için gereklidir. Tarihsel ve pratik nedenlerden ötürü, protein kinazları protein fosfatazlara göre incelemek daha kolay olmuştur. Ökaryotlarda, protein fosforilasyonunun % 99'undan fazlası Serin ve Treonin amino asitlerinde meydana gelir.

Protein kinazlar, hedef proteinlere kovalent fosfat ilavesini kataliz eder ve bu olay, hücrel ve enzimatik fonksiyonun düzenlenmesi için merkezi bir mekanizmayı başlatır (Şekil 2.1). Ökaryotik organizmalar, fosfatı Serin ve Treonin aminoasitlerine aktaranlar ve fosfatı Tirozin aminoasidine aktaranlar olarak iki genel protein kinaz sınıfına sahiptir. Yirmi amino asitten sadece Serin, Treonin ve Tirozin fosforilasyon için uygun fonksiyonel grubu (OH) içerir. Protein kinazlarla fosforilasyon, proliferasyon, gen ekspresyonu, metabolizma, hareketlilik, membran taşınması ve apoptoz da dahil olmak üzere hemen hemen her ökaryotik hücre aktivitesinin düzenlendiği kritik bir mekanizma olarak kabul edilir. Fosforilasyon (1) metabolik hızı değiştirmek ve (2) sinyal çoğaltmak (örneğin, tek bir kinaz molekülünün aktivasyonu birçok proteinin fosforilasyonuna neden olabilir) için gerekli ve önemli iken, (3) hem tersinir hem de yüksek düzeyde koordine olan karmaşık fizyolojik süreçleri yönetmek için de oldukça önemli göreve sahiptir. Bu özellikler, enzimatik ve hücrel fonksiyonun fosforilasyonla düzenlenmesinin ve hücre içi sinyallere uygun şekilde yanıt vermenin bir yoludur.



Şekil 2.2. Proteinlere fosfat ilavesini katalize eden protein kinaz aktiviteleri ve proteinlerden fosfat çıkaran fosfataz aktiviteleri ile protein fosforilasyonunun düzenlenmesi. (Weber 2010)

2.3. Serin Threonin Protein Kinazlar (STPK)

On binden fazla üyesiyle bu protein ailesi bilinenlerin en büyüğüdür (Cheek ve ark. 2005) ve Mikobakteriel büyümenin anahtar düzenleyicileridir. Serin treonin protein kinazlar (STPK) yaklaşık 20 yıl önce keşfedilmiştir. STPK'lar, mikobakteriel büyüme uyumunu dikte eden kritik metabolik ve fizyolojik değişikliklerin yapılmasından sorumludur.

Mtb. bakterisinde ökaryotik benzeri STPK'ların keşfi, bakteriyel patojenlerin, sadece konakçı-patojen etkileşimlerini etkileyen değil, aynı zamanda bakteriler içinde metabolik ve fizyolojik adaptasyonları mümkün kılan sinyal iletim mekanizmalarıyla donatıldığı inancını da doğrulamıştır. (Cole ve ark. 1998, Kumar ve ark. 2009, Malhotra ve ark. 2010, Walburger ve ark. 2004). *Mtb* STPK'ları ilk olarak ökaryotik STPK'lara olan sekans benzerliklerine dayanarak “ökaryotik benzeri” protein kinazlar olarak tanımlanmıştır (Gay ve Everett 2000). *Mtb* genomunun sekans analizinde 11 ökaryotik benzeri Serine/Treonine protein kinaz, iki Tirozin protein fosfataz ve bir Serine/Treonine protein fosfataz bulunur. Bu kinazların dokuzu biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Bunlar PknA, PknB, PknD, PknE, PknF, PknG, PknH, PknI, ve PknL olarak tanımlanmıştır. *Mtb* bakteri genomunda bulunan 11 STPK'nın 9 tanesi mikobakteriyel hücre içinde bulunan kinaz bölgeye yerleşmiş transmembran reseptörlerini ifade eder (PknA-PknL) (Gay ve Everett 2000).

Mtb STPK'larından üç kinaz yapısı (PknB, PknE ve PknG) çözülmüştür. Bu yapılar *Mtb* STPK'larının aktif hale getirildiği ve düzenlendiği mekanizmalar hakkında

önemli bilgiler sağlamıştır. Genetik ve biyokimyasal çalışmalar, bu kinazların hücre şekli ve morfolojisi, glikoz ve glutamin transportu, fagome-lizozom füzyonu ve transkripsiyon faktörlerinin ifadesi ve / veya aktivitesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenlediğini göstermektedir (Chabave ark.2002, Gay ve ark. 1999, Peirs ve ark. 2000, Molle ve ark. 2003, Koul ve ark. 2001, Gopaldaswamy ve ark. 2004, Narayanan ve ark. 2004, Lakshminarayan ve ark. 2008).

STPK ların prokaryotlarda patojenite, strese cevap ve büyümenin düzenlenmesi gibi üç farklı işleme dahil olduğu görülmüştür. Daha önce varsayımsal bir STPK kodlayıcı gen olarak açıklanmış olan ilave bir PknM geni, tanınabilir herhangi bir kinaz imzasına sahip değildir. PknI dışındaki tüm kinazlar aktif bölgede bir lisine sahiptir ki bu STPK'lerin özelliğidir. PknI, bu pozisyonda bir STPK için alışılmadık olan bir asparajine sahiptir; bununla birlikte, bölgedeki diğer korunan kalıntılar, PknI'nın bir Ser/Tre kinaz olduğunu gösterir.

Mtb STPK'larının ikisi dışındakilerinin hepsinde, hücre dışı bir sensör alanı ve hücre içi kinaz alanı (KD) olan tek bir transmembran alanı vardır. Bu yüzden, bu dokuz transmembran proteini, hücre dışı sensör bölgesinin ekstrasitoplazmik sinyalleri algıladığı, bu bilgiyi hücre içi KD'ye ilettiği ve substrat proteinlerinde kinazın aktivasyonuna ve Ser veya Tre kalıntılarının fosforilasyonuna yol açan reseptör tipi kinazlar olarak sınıflandırılabilir. Bu fosforilasyon, protein fonksiyonunu doğrudan değiştirebilir veya spesifik protein çiftleri arasındaki veya multiprotein kompleksleri arasındaki etkileşimlerde görev alabilir. Ser/Tre fosforilasyonunun çıktısı nadiren transkripsiyonun doğrudan düzenlenmesidir. *Mtb* STPK'ları tarafından algılanan sinyallerin ve hedeflenen proteinlerin bir kısmı bilinmektedir. Yine de, STPK'larının *Mtb* fizyolojisini düzenlemedeki mekanizmaları ve işlevleri hakkında öğrenilecek çok şey bulunmaktadır.

2.3.1. PknA, PknB ve PknD

Tüm türlerde PknA, PknB, PknG ve PknL'nin varlığı, bu kinazların, mikobakteriyel fizyolojinin ana yönlerini düzenlemede önemli rol oynadığını, ancak sadece PknA ve PknB'nin *Mtb*'de gerekli olduğunu göstermektedir (Sasseti ve ark. 2003)

Hem PknA hem de PknB, diğer bakterilerde peptidoglikan uzaması ve septum oluşumu arasındaki anahtarı kontrol eden bir operon içinde bulunur. Varsayılan bir Ser/Thr fosfataz geni, Rv0018c, bu işlemin fosforilasyon/defosforilasyon basamakları şeklinde düzenlenmesini öneren aynı operon tarafından kodlanır. Hücre uzamasının düzenlenmesinin bu şekli, daha önce başka bakterilerde tarif edilmemesine karşın *M. leprae*'deki hem PknA hem de PknB homologlarının aynı zamanda bir penisilin bağlayıcı protein genine bitişik olduğu ve bu organizmada benzer bir düzenleme modunu önerdiği görülmüştür.

PknB, KD için tarif edilen ilk bakteri kinaz yapısıdır ve iki grup tarafından 2003 yılında bağımsız olarak yayınlanmıştır (Ortiz-Lombardia ve ark. 2003, Young ve ark. 2003). *Mtb* PknB proteini ayrıca bir başka penisilin bağlayıcı protein olan PonA'ya (Rv0050) karboksi-terminal homolojisi de gösterir. Deneysel kanıtlar, PknB'nin serin kalıntısı üzerinden otofosforile olduğunu açıkça göstermiştir. PknB *Mtb.* bakterisinin normal büyümesi için önemlidir.

Mtb STPK ailesinin üçüncü üyesi PknD nin, fosfat taşınmasının düzenlenmesinde görev aldığı önerilmiştir. Bir serin kalıntısı üzerinde otofosforilasyona uğradığı ve yapay substratları fosforilediği görülmüştür.

PknD *Mtb*'de transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynar (Greenstein ve ark. 2007) ve virülens faktör transporter ın düzenlenmesi ile virülense dahil olur (Pérezve ark. 2006).

2.3.2. PknE, PknF ve PknH

PknE nitrik oksit stresini algılar ve konağın sinyal yollarına müdahale ederek apoptosizi engeller (Jayakumar ve ark. 2008).

PknF, *M. Tuberculosis*'teki hücre büyümesi ve septum oluşumu ve glukoz taşınmasının düzenlenmesinde doğrudan/dolaylı bir rol oynar ve pknF'nin yanında bulunan ATP bağlayıcı bir kaset taşıyıcısı fosforile eder (Molle ve ark. 2004, Deol ve ark. 2005).

PknH, *M. tuberculosis* hücre duvarı bileşenlerinin sentezi ve üretimine katkıda bulunur (Gómez ve ark. 2013). Ayrıca patojenin stres koşullarına adaptasyonuna yardım eder (Sharma ve ark. 2004).

2.3.3. PknI, PknJ ve PknL

PknI konağın çevresini algılar ve makrofajda bakteri büyümesini düzenler (Gopaldaswamy ve ark. 2009). Ayrıca oksidatif stres sırasında redoks homeotaksisin korunmasını içeren sinyal mekanizmalarına da katılır (Venkatesan ve ark. 2016).

PknJ, mycobacteria da glikolik çemberi kontrol eden önemli enzimlerden biri olan pirüvat kinaz A'nın düzenlenmesinde görev alır (Singh ve ark. 2014).

PknL hücre duvarı sentezi ve hücre bölünmesini sinyal iletim basamaklarının düzenlenmesi ile ilgilidir (Canova ve ark. 2008).

2.3.4. PknG and PknK

Ailenin son iki üyesi PknG ve PknK, belirgin bir transmembran bölgeye sahip değildir ve bu nedenle çözümlü proteinler olduğu tahmin edilmektedir. Bu gözlem, dokuz reseptör tipi kinazı kodlayan genlerin, gen çoğalması yoluyla tek bir ortak atadan türetilmiş olabileceğini, oysa PknG ve PknK'nın ayrı ayrı elde edilebileceğini ortaya koymaktadır. Hücre içi KD'lerin aksine, dokuz transmembran STPK'nin hücre dışı alanları, farklı ekstrasitoplazmik moleküler sinyallere bağlandıklarını ve bunlara yanıt verdiklerini gösteren sekans benzerliği göstermezler. Her kinaz için tartışıldığı gibi, motifler, bazı hücre dışı alanların protein sekansında ve PknG ve PknK için KD dışı bölgelerde bulunur. Hücre dışı alanların bir kısmı için aday ligandlar tanımlanmıştır.

PknG, TPR (tetratrikopeptid) bölgesi vasıtasıyla dimerize olur her birinden iki monomer uzaklıkta bulunan kinaz bölge protein-protein etkileşimleri yapısal bir motif içerir (Scherr ve ark. 2007). PknG, kinaz bölgesinden önce gelen bir amino-terminal bölgeye sahip olan tek STPK'dir (Aslund ve Beckwith 1999). PknG, patojenisitedeki rolü ve makrofaj içinde hayatta kalması nedeniyle özel ilgi konusudur. PknG, araştırma grupları ve ilaç şirketleri tarafından inhibitör taraması için ana hedeflerden biridir. Bu hit bileşik sonradan optimizasyon için kullanılmış ve makrofajlar içinde mikobakteriyel büyümeyi bloke etmede etkili bir dizi bileşik ortaya çıkmıştır.

2.3.5. Protein kinase K (PknK)

Protein kinaz K (PknK) 1100 aminoasitlik büyük bir proteindir. Molekül ağırlığı 119.4 kDa olan PknK, *Mtb* bakterisindeki tahminen en büyük STPK'dir. PknG ile birlikte, bir transmembran alana sahip değildir ve bu sebeple basilin sitozolünde

lokalize olduğu tahmin edilmektedir. PknK'nın proteinleri fosforile etme kabiliyetinin, değişmeyen Lizin(Lys55) ve aktivasyon döngüsünde bulunan iki Treonin aminoasitlerine bağlı olduğu bilinmektedir. PknK hücre duvarı fraksiyonuna lokalizedir ve bu da kinazın hücre zarı bölgesine muhtemel bir şekilde bağlanmasını gösterir.

PknK'nın çeşitli in vitro stres ortamlarında ve farelerde kalıcı enfeksiyon sırasında *Mtb.*'nin büyümesini yavaşlatan düzenleyici yollara katıldığı Malhotra ve arkadaşlarının 2012 yılındaki çalışmasında belirtilmiştir. Çalışmada, PknK aracılı düzenlemelerin mekanizması üzerinde durulmuştur. Logaritmik ve durağan büyüme fazları sırasında doğal H37Rv ve bir PknK mutant türünün transkripsiyon profili vasıtasıyla, PknK'nın, tRNA genlerinin büyük bir alt kümesinin ekspresyonunu, hücrel enerji hali ve büyüme fazı ile senkronizasyonunu düzenlediği tespit edilmiştir (Malhotra ve ark. 2010).

Mycobacterium smegmatis'te yabancı tip *Mtb*, PknK (PknK *Mtb*) büyüme oranının önemli ölçüde gecikmesine ve koloni morfolojisinin değişmesine neden olur. PknK'nın translasyon kontrolündeki rolü araştırılmış ve in vitro transkripsiyon ve translasyon işlemlerinin inhibisyonunu fosforilasyon bağımlı bir şekilde yönlendirdiği belirlenmiştir. Artan ATP veya PknK konsantrasyonları, kooperatif etkiler sergiler ve PknK'nın inhibe edici fonksiyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, PknK'nın kesilmesi ve mutasyon analizi, PknK'nın C-terminal bölgesi ile intramoleküler etkileşimler yoluyla otoregülasyon yaptığını ortaya koymuştur. Belirgin bir şekilde, değişmeyen lizin 55, sadece tam uzunluktaki PknK proteininde aktivite için gerekli olduğu görülerek, PknK otoregülasyonu için bir model önerilmiş ve tartışılmıştır. (Malhotra ve ark. 2010).

Şimdiye kadar, kinazın kendisi biyokimyasal olarak karakterize edilememiş, bu nedenle PknK fonksiyonuyla ilgili tek sonuç genomik lokalizasyonundan ve bölgenin şeklinden alınabilmiştir.

PknK karboksi-terminal bölgesi içinde bir P-loop ,AAA + ATPazların bağlama motifi, bir PDZ alanı ve bir tek tetratrikopeptid(TPR) tekrar dizisi içerir. (Marchler-Bauer A ve ark. 2011). PknK, P lobunda ATP/GTP bağlanma bölgesi ve PDZ bölgesi 368-375 ile 465-533 aminoasitler arasındadır bulunur. PDZ alanları ve TPR alanları genellikle protein-protein etkileşimlerine katılırlar. TPR dizileri tipik olarak üç veya daha fazla

tekrarlı kümelerde meydana gelir ve protein-protein etkileşimlerine aracılık ederler (Blatch ve Lässle 1999). PDZ bölgesinin ve PknK'deki TPR motifinin işlev ve etkileşim ortakları bilinmemektedir.

Diğer birçok *Mtb* STPK'ları gibi, PknK aktivasyon döngüsünde TXT motifindeki iki treonin kalıntısı üzerinden otofosforile olur ve bu kinaz aktivitesi için gereklidir (Kumar ve ark. 2009) PknK, kinaz bölgesinin içinde bir ATP bağlayıcı cep ve ATP bağlayıcı motif içerir (Av-Gay and Everett, 2000). Bu özel AAA alanı, sinyal moleküllerinin alt-membranöz bölgelere hedeflenmesi için gerekli olduğu gösterilen bir PDZ alanı içerir (Ponting ve ark. 1997). PknK'nın N bölgesi 290 aminoasit ökaryotik benzeri Serin/Treonin kinaz bölgelere benzerdir. PknK, LuxR ailesinin transkripsiyonel düzenleyicilerinde bulunan düzenleyici bölgelere homoloji gösteren bir C bölgesi ile de karakterize edilir (Av-Gay and Everett, 2000). C bölgesi PknK'nın aktivitesi için çok önemlidir. PknK'nın karboksi bölgesi, Luxbs ailesinin, *Klebsiella pneumoniae* AcoK ve E gibi transkripsiyonel regülatörlerin düzenleyici bölgelerine homoloji gösterir ve *Escherichia kolinin* transkripsiyon düzenleyicisi MalT ile benzerlik gösteren moleküllerin karakteristiği bir ATP bağlayıcı motif (AAA) içerir.

Her ne kadar PknK, MalT veya AcoK'nın DNA-bağlayıcı bölgelerine homoloji göstermese de, PknK geni, *Mtb* H37Rv 'de potansiyel bir virülans geni olarak tanımlanan transkripsiyonel regülatör VirS (Rv3082c)'ye yakın bir yerde konumlanır (Gupta ve Tyagi 1993). PknK geni, LuxA flavin mononükleotit (FMN) bağımlı monooksijen ailesinin üyelerine homolog olan birkaç *Mtb* geninden birinin (Rv3079c) doğrudan yukarı bölgesinde bulunur. Diğer bakterilerde, bu enzimler, *Streptomyces* türlerinde antibiyotik linkomisin gibi ikincil metabolitlerin üretimi ile ilgilidir. Bu nedenle, PknK, *Mtb*'te ikincil bir metabolitlerin üretimini düzenleyebilirler.

Malhotra ve arkadaşları, bir PknK silme işleminin mutantın asidik pH, hipoksi, oksidatif ve sabit faz stresine karşı in vitro direnç artışı ve farelerde kalıcı enfeksiyon sırasında sağkalım artışı ile sonuçlandığını göstermiştir (Malhotra ve ark. 2010). Ayrıca, konakçı immün efektörleri üzerinde yapılan deneyler, farelerde akut enfeksiyon sırasında PknK'nin immünomodülatör bir fonksiyonunun olduğunu bildirmiştir (Alber 2009).

LuxA ailesinin üyelerine homolog (flavin monükleotit metabolizmasında bulunan) bir genin *pknK*'nin genomik lokalizasyonu, *PknK*'nin sekonder metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynayabileceği hipotezini desteklemektedir. Bununla birlikte, *PknK* ayrıca virülansa dahil olan transkripsiyonel regülatör ve mikobakteriyel monooksijenaz (*mymA*) operonunun ekspresyonunu düzenlediği bilinen *VirS* genine yakın bir şekilde yerleştirilmiştir (Av-Gay ve Everett, 2000, Narayan ve ark. 2007).

VirS'nin *PknK*'nin en önemli substratı olduğu 2009 tarihli çalışmada gösterilmiştir (Kumar ve ark. 2009). Ayrıca *MymA* operonu tarafından kodlanan 4 protein de *PknK*'nin substratıdır. Sonuçlar, *VirS*'nin in-vivo olarak *PknK*'nin iyi bir substratı olduğunu ve *VirS*'nin *PknK* aracılı fosforilasyonunun, *mym* promoter DNA'sı için afinitesini arttırdığını göstermektedir. *VirS*'nin *PknK* aracılı fosforilasyonu *MymA* operonunun afinitesini 2.5 kat arttırmıştır. Bu çalışmalar göstermiştir ki *VirS* nin *PknK* aracılı fosforilasyonu *mymA* operon genlerini ifade etmektedir (Kumar ve ark. 2009)

2.4. Hesaplamalı Kimya

Hesaplamalı kimya, molekül ve malzemelerin yapılarını ve özelliklerini incelemek için bilgisayar modelleme ve simülasyonun kuantum kimyasına dayalı *ab initio* yaklaşımlar ve ampirik yaklaşımlar dahil kullanımını açıklayan bir bilim dalıdır. Hesaplamalı kimya, molekül ve malzemelerin yapısını ve özelliklerini anlama amaçlı hesaplamalı teknikleri tanımlamak için de kullanılır.

Kimyacıların yüzyıllardır hesaplamalar yapıyor olmasına rağmen bugün “hesaplamalı kimya” olarak bildiğimiz alan, dijital çağın bir ürünü olarak ortaya çıkmış Martin Karplus, Michael Levitt ve Arieh Warshel isimli üç bilim insanının 1970'lerde yaptıkları çalışma ile günümüzün klasik (Newton) fiziği ve kuantum fiziğinin prensiplerini birleştiren bilgisayar modellerinin temellerinin incelenmesiyle dikkat çekmiştir. Bu çalışmayla bu üç bilim insanı 2013'te Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır. Bu alana olan ilgi, 1995 yılında, üç hesaplamalı kimyacı, Paul Crutzen, Mario Molina ve F. Sherwood Rowland, ozonun atmosferde nasıl oluştuğunu ve ayrıştığını açıklamak için termodinamik ve kimyasal yasaları kullanan matematiksel modelleri kullanması ve Kimya Nobel ödülünü kazanmasıyla doruğa ulaşmıştır. Bununla birlikte, hesaplamalı kimya, Walter Kohn ve John Pople'ın sırasıyla “yoğunluk fonksiyonel teorisini

geliştirdiği” ve “kuantum kimyasında hesaplama yöntemlerini geliştirdiği” çalışmalarıyla Nobel Kimya Ödülleri kazandığı zamana kadar genel olarak çalışma alanı olarak düşünülüyordu.

2.4.1. Moleküler Modelleme

Moleküler modelleme, moleküllerin davranışını modellemek veya taklit etmek için teorik yöntemleri ve hesaplama tekniklerini ifade eden ortak bir terimdir. Teknikler, mikro kimyasal sistemlerden makro biyolojik moleküllere ve malzeme düzeneklerine kadar çeşitli moleküler sistemleri incelemek için hesaplamalı kimya, hesaplamalı biyoloji ve malzeme bilimi alanlarında kullanılmaktadır. En basit hesaplamalar elle yapılabilir, ancak kaçınılmaz olarak, herhangi bir makul büyüklükteki sistemin moleküler modellemesi için bilgisayarlar gereklidir. Moleküler sistemlerin atomistik seviyede açıklanması; moleküler modelleme tekniklerindeki ortak özelliktir. En düşük bilgi seviyesi ayrı atomlardır (veya küçük bir atom grubu). Bu, elektronların açıkça değerlendirildiği kuantum kimyasının (elektronik yapı hesaplamaları olarak da bilinir) tersini gösterir. Moleküler modellemenin faydası, sistemin karmaşıklığını azalttığı ve simülasyonlar sırasında daha fazla atomun göz önüne alınmasına izin vermesidir.

2.4.2. Moleküler Dinamik Simülasyonu

Moleküler dinamik simülasyonlarında, sistemin force field değeri ile ölçülen davranışı zamanla Newtonun hareket yasalarına dayanan kurallar kullanılarak izlenir. Molekül için elde edilen hesaplanan yörünge, proteinlerin zaman içindeki değişimleri ve konformasyonel değişimleri hakkında ayrıntılı bilgi verir. Moleküler dinamik simülasyonlar, 1950lerin sonlarında sert kürelerin etkileşimini incelemek için kullanılmaya başladığından beri biyolojik makromoleküllerin araştırılmasında yaygın bir araç olmuştur (Alder ve ark. 1957, Alder ve Wainwright 1959). Yıllar boyunca, gittikçe daha fazla moleküler simülasyon programı paketi geliştirilmiştir. Bir proteinin ilk moleküler dinamik simülasyonu, katlanmış sığır pankreas tripsin inhibitörünün (BPTI) dinamiklerinin simülasyonu ile 1977 yılında yapılmıştır (J.A. McCammon ve ark. 1977). Membrana gömülü bir peptidin ilk moleküler dinamik simülasyonunu 1994 (Woolf ve Roux 1994) ve ilk integral membran proteinini 1995 yıllarında olmak üzere gerçekleştirmek için kaynakların mevcut olması 15 yıldan uzun sürmüştür (Edholm ve

ark. 1995) O zamandan bu yana, yapıların dinamiklerini araştırmak için moleküler dinamik simülasyonu kullanan birçok farklı çalışma yapılmıştır. Moleküler dinamikler simülasyon gerçekleştirilmeden önce, simülasyon sistemindeki atomlar (protein, lipidler, su, iyon), konumları, sıcaklık, basınç ve simülasyonun gerçekleşeceği hücre hazırlanarak tanımlanmalıdır. Tüm bu parametreler simülasyon sırasında da değişebilir. Sistemi kurduktan sonra, force field ve moleküler simülasyon algoritması seçilmelidir. Force field seçimi önemlidir, çünkü test edilecek sistemi, simülasyonun ve zaman çizelgesinin amacını ve sağlayabileceğiniz hesaplama kaynaklarını içeren bir dizi faktöre bağlıdır. Simülasyon, sistemin başlangıç sıcaklığına ve basıncına bağlı olarak kuvvetin dağılımının tüm atomlara eklenmesiyle başlatılır (Scheraga ve ark. 2007). Moleküler dinamiklerin çoğunun simülasyonunda, daha uzun bir zaman ölçeğinde dengeye geldiği görülen bir sistemin kararlı olduğu düşünülür. Bununla birlikte, simüle edilecek zaman çizelgesi, modellerin gözlemlemek istediği etkilere ve mevcut bilgisayar gücüne bağlıdır (Shaw ve ark. 2009). En hızlı bilgisayarların kullanılması durumunda bile, yalnızca çok hızlı moleküler işlemler, atomik bir seviyede simüle edilebilir. Modellemenin herhangi bir yönü ile öngörülen dinamiklerin doğruluğu, modelin altında yatan varsayımların geçerliliğine bağlı olacaktır. Bu durumda, model esasen kullanılan kuvvet alanı tarafından tanımlanır.

MD simülasyonlarının sonucunu yöneten faktörler:

1. serbestlik derecelerinin seçimi
2. kuvvet alanı parametreleri
3. bağlanmamış etkileşimlerin davranışı
- 4 çözme etkileri
5. sınır şartları
6. sıcaklık ve basınç davranışı
7. entegrasyon zaman adımı
8. konfigürasyonun başlaması

Modellemenin tüm yönlerinde olduğu gibi, öngörülen dinamiklerin doğruluğu modelin altında yatan varsayımların geçerliliğine bağlıdır. Bu durumda, kullanılan

moleküller arası etkileşimler (veya potansiyel enerji), model tarafından tanımlanmaktadır. Bu model, tüm atomların konumsal düzenlemesinde potansiyel enerjinin değerine nasıl bağlı olduğunu açıklayan, matematiksel bir fonksiyondur (kuvvet alanı=force field) (Werner ve ark. 2012).

2.4.3. Homoloji Modelleme

Homoloji modelleme kısaca daha önce bilinmeyen bir protein yapısını o proteinin sekansı ve bilinen bir yapıyı (template) kullanarak modelleme prosedürüdür. Yapıların deneysel olarak çözülmediği proteinlerin 3 boyutlu yapılarının modellenmesinde en yaygın kullanılan yaklaşımdır. PDB'deki her benzersiz protein için ortalama 20 başka homolog protein yapılabileceği tahmin edilmektedir. Genel olarak, sekans homolojisinin, homoloji modellemesi için başarıyla kullanılması için % 25 veya daha yüksek olması gerekir. Homoloji modellemesi, evrimsel olarak ilişkili proteinlerin (yani, amino asit dizilimi açısından birbirleriyle ilişkili proteinlerin) benzer yapılar sahip olma eğiliminde olduğu gözlemine dayanmaktadır. Bir proteinin çözülmemiş yapısı (hedef) ilgili bir proteinin çözülmüş yapısı (şablon) kullanılarak modellenebilir. Hedef ve şablon sırası evrimsel olarak ilişkili olmasa bile yapılar oluşturmak için farklı yöntemler kullanılabilir. Bunun nedeni, belirgin bir sekans ilişkisi olmasa bile, proteinlerin aynı katlamayı benimsemeleridir, çünkü yapı sekanstan daha fazla korunur. Homoloji modellemesi için en yaygın kullanılan yazılımlardan bazıları MODELER (Sali ve Blundell 1993) ve SWISS MODEL'dir (Waterhouse ve ark. 2007).

PknK'nın fosforlanması ve bunun VirS ile ilişkisi deneysel olarak belirtilmesine rağmen bu detaylı mekanizma ile ilgili bilgi sınırlıdır. Protein fosforilasyonunun fosforlanan proteinde anlamlı konformasyonel değişiklikler yaptığı bilinmektedir. Biz de bu çalışmada PknK'nın Thr179, Thr181 ve Ser 187 nolu artıklarda fosforilasyonu sonucu konformasyonel değişimi ve hangi artışın fosforlanması ile VirS'ye bağlayacağını öngörmek için bu artıkların fosforlanmasını ve bunların Moleküler Dinamik hesaplamasında oluşabilecek konformasyon değişikliklerinin VirS'nin tanınmasına olan etkisini araştırılmasını hedefledik.



3. MATERYAL ve METOT

Christina Elizabeth Baer tarafından 2010 yılında yazılmış *Mechanisms of Mycobacterium tuberculosis Serine/Threonine Protein Kinase Activation* University of California, Berkeley teze göre Prorein Kinaz K'nın kristalize yapısı aydınlatılmaya çalışılmış ancak Protein Data Bank'ta bulunamamıştır.

Uniprot serveri (<https://www.uniprot.org>) PknK'nın dizi analizi bulundu. Bu aramada P9WI65 *Mycobacterium tuberculosis* (strain ATCC 25618/H37Rv) strain kullanılarak protein için homoloji model yaklaşımı ile 3D yapısı LOMETS (Wu ve Zhang 2007) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS/>) server aracılığı ile yapıldı. Bu yapıya literatür verilerine dayanarak magnezyum iyonu ASP167 ve ASN154 ile etkileşebilecek şekilde proteine yerleştirildi. Benzer işlemler virS için de yapıldı. SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) kullanarak VirS için 3D yapısı hazırlandı. VirS modeli için homoloji modelleme sonucu 25 ile 334 arasında bir yapı önerildi.

Protein Data Bank'ta 3 boyutlu bir yapısı bulunamayan Protein Kinaz K Homoloji modelleme yapılarak elde edildi. Sonra benzerlerinde görüldüğü üzere Mg iyonu ilave edildi ve manuel olarak yerleştirildi.

Uniprot'tan P9WI65 kodlu PknK ve P9WMJ3 kodlu VirS yapıları kullanıldı.

Moleküler dinamik (MD) hesaplamaların tümünde Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER v.18) (Case ve ark. 2018) paket programı kullanılmıştır. Proteinlerin hesaplamaları için ff99SB kuvvet alan kütüphanesinden faydalanıldı (Hornak ve ark. 2006) AMBER içinde bulunan Xleap programı kullanılarak, sistemlerin MD hesaplamalar için gerekli topoloji/parametre ve koordinat dosyaları hazırlandı. Nötrleştirme ve sisteme periyodik çözücü modelinin eklenmesi için yine aynı programdan yararlanıldı. Çözücü modeli kutu boyutu oktahedral 10.0 Å olacak şekilde TIP3PBOX (Jorgensen ve ark. 1983) seçildi. Sistem protein kısmı sabit tutularak sırayla protein kısmına 10 kcal mol⁻¹ Å⁻² lik bir kuvvet uygulanarak 1000 adımda minimize edilip sonrasında uygulanan kuvvet kaldırılarak 2500 adımda bütün sistem minimize edildi. Sistem 200 ps süreyle protein kısmına kcal mol⁻¹ Å⁻² lik bir kuvvet uygulanarak 0 K'den 300 °K'e ısıtıldıktan sonra uygulanan kuvvet kaldırılarak

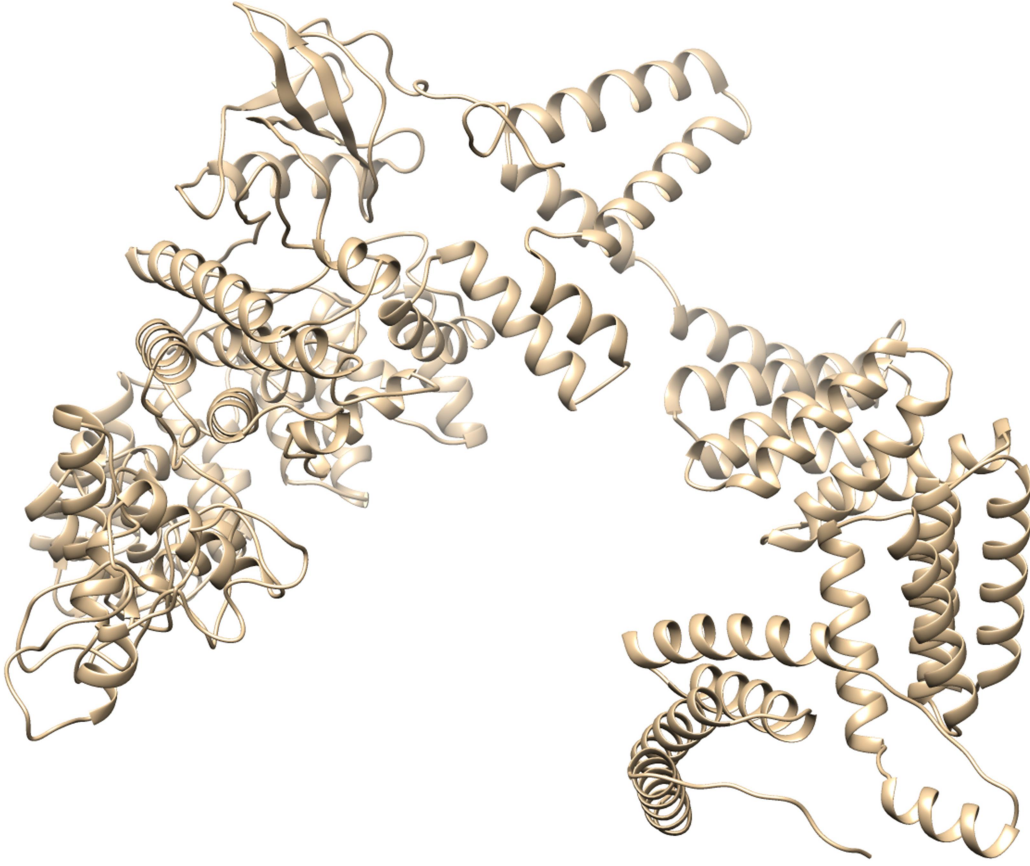
sistem 300 °K ve 1 atm'de PknK ve VirS için 25 ns ve 25 ns süre ile canonical ensemble modunda MD hesaplamalara tabii tutuldu. Sıcaklık ve basıncı dengelemek için Langevin termostatı ve barostatı kullanıldı. Hidrojen atomları içeren bütün bağları sınırlamak için *SHAKE* algoritması uygulandı (Cornell ve ark.1995). Periyodik kutu içinde yapılan hesaplamalarda bağ yapmayan durdurma mesafesi (cutoff) değeri 10 Å olarak seçildi ve uzun-mesafe elektrostatik etkileşimler yaklaşık 0.1 nm mesafeli bir hızlı Fourier tranform gridli Particle Mesh Ewald (PME) (Darden ve ark. 1993) metododu kullanılarak muamele yapıldı. Yolakların anlık görüntüleri her 0.2 ps'de bir alınıp analiz edildi.

MD hesaplamalardan elde edilen yolakların kümeleme analizlerinden elde edilen en kalabalık kümeyi temsil eden yapı seçildi ve bu proteinler için ilgili Thr/Ser artıkları Xleap kullanılarak fosforlandı. Fosforlanmış treonin ve serin artıklarında literatürdeki kuvvet alan kütüphanelerine başvuruldu (Homeyerve ark. 2006). PknK için Thr 181, Thr 179, Ser 187 ayrı ayrı ve üç kalıntının aynı zamanda fosforlanırken, virS için Ser 252, Ser 311, Thr 248, Thr327 ve artıkları fosforlandı. Bütün kümeleme ve görüntüleme işlemleri CHIMERA (Pettersen ve ark. 2004) aracılığıyla yapıldı. Fosforlanan yapılar yukarıda belirtilen şekilde periyodik kutu içinde 25 ns (PknK için) ve 25 ns (VirS için) süre ile simüle edildi.

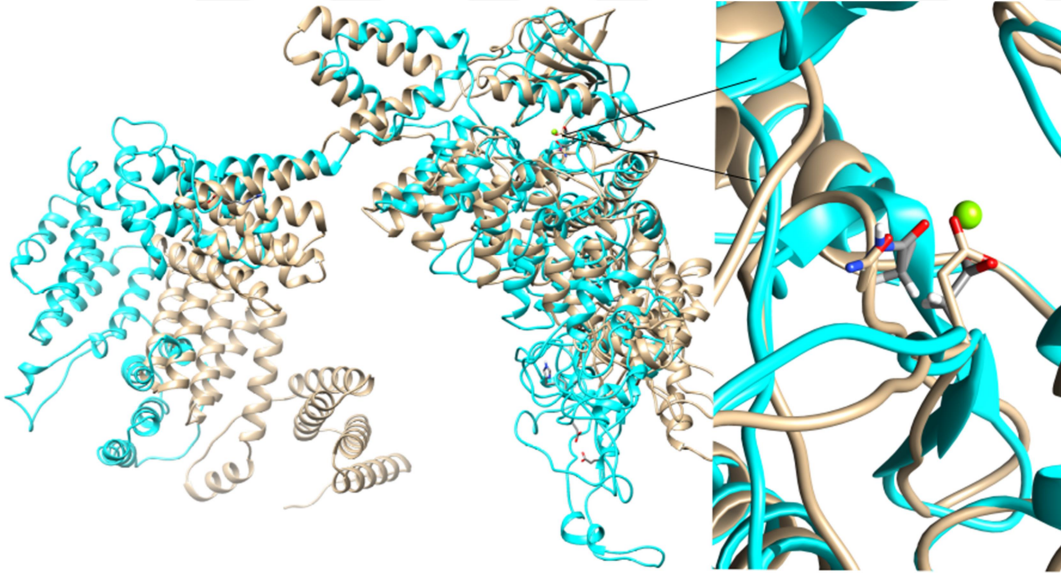
Moleküler dinamik hesaplamalar sonucu elde edilen moleküler dinamik koordinatlar kullanılarak CPPTRAJ (Roe ve Cheatham) ile sistemlerin Kök Ortalama Kare Sapma (RMSD)'ları hesaplandı. Graph Prism 4 programı kullanılarak, RMSD ve MD hesaplamalar boyunca zamana karşı enerji değişimleri yapıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

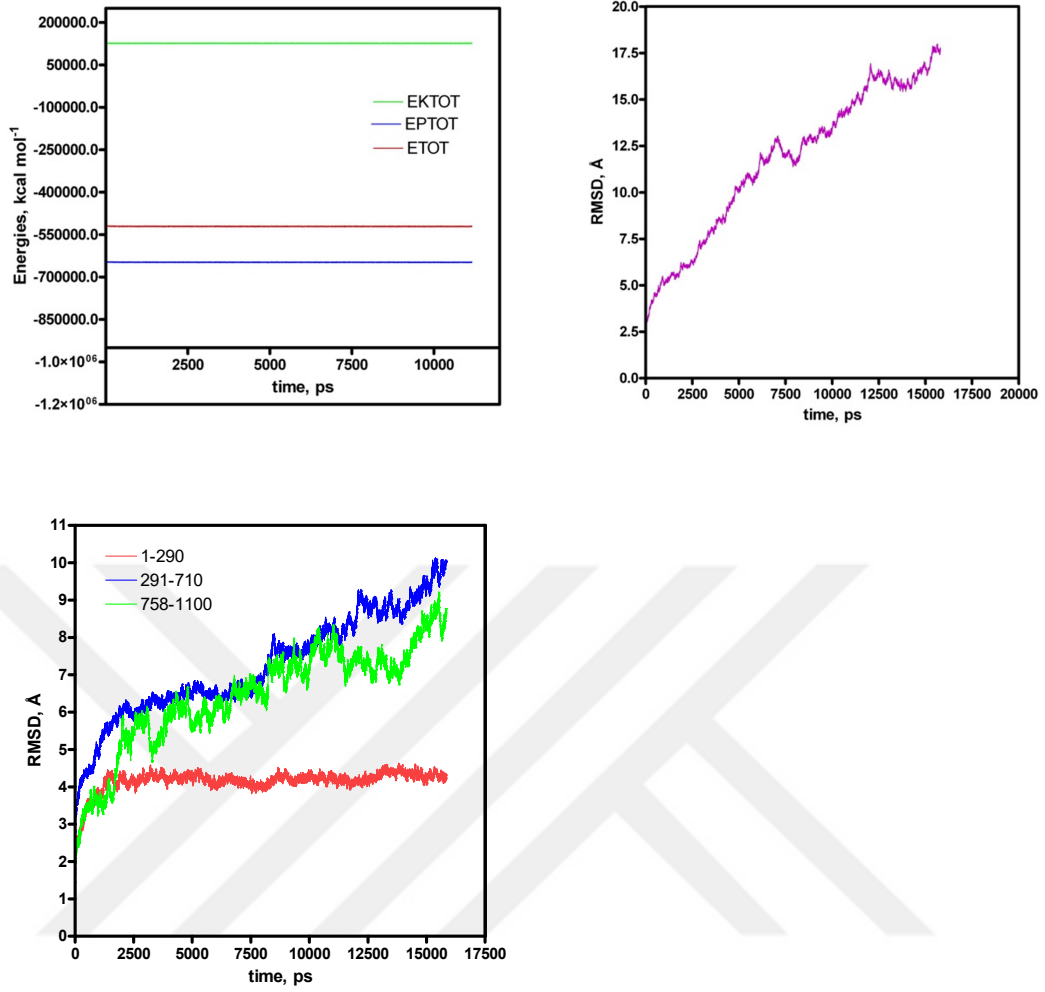
PknK için LOMETS (Wu ve Zhang 2007) ile yapılan homoloji modelleme sonucu elde edilen yapı Şekil 4.1.'de görüntülenmektedir. Bu yapı için kalıplar sırasıyla 3f69B, 5ijoJ ve 5o09C yapılarına benzerlik gösterdiği bulundu. Bu yapıya magnezyum ilave edildikten sonra 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamaları sonucu elde edilen en kalabalık kümeye ait yapı Şekil 4.2.'de verilmiştir. Burada görüldüğü gibi hem katalitik bölgede hem de N- bölgesinde anlamlı şekilde konformasyonel değişiklikler olduğu fakat Mg içeren aktif bölgede anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Bu hesaplamalara ilişkin RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır. Yine Şekil 4.3'te bütün proteine ait rmsd grafiğine bakıldığında rmsd'nin giderek yükselerek seyretmesi bölgeler arası loplardaki büyük değişikliklere ait olabilir. Her bir bölgeye ait rmsd'nin zamana bağlı değişimini 1-290 aa'ler arası, 291-710 aa'ler arası ve 758-1100 aa'ler arası olarak bölgelere ayrılmış şekilde bakıldığında ise bütün bölgelerin kararlı bir şekilde seyrettiği görülüyor.



Şekil 4.1. PknK'nin LOMETS modeli

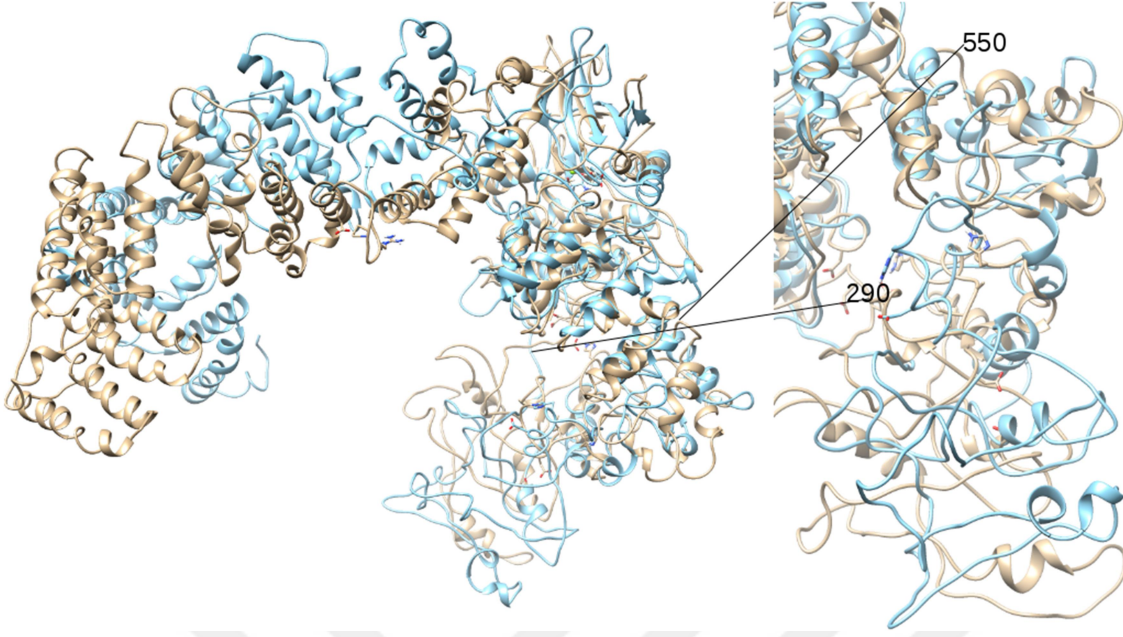


Şekil 4.2. Mg içeren PknK'nin 25 ns süre ile 300 K de moleküler dinamik hesaplamalar sonucu elde edilen en kalabalık kümenin (mavi) homoloji model (açık kahverengi) ile üst üste çakıştırılmış görüntüsü.

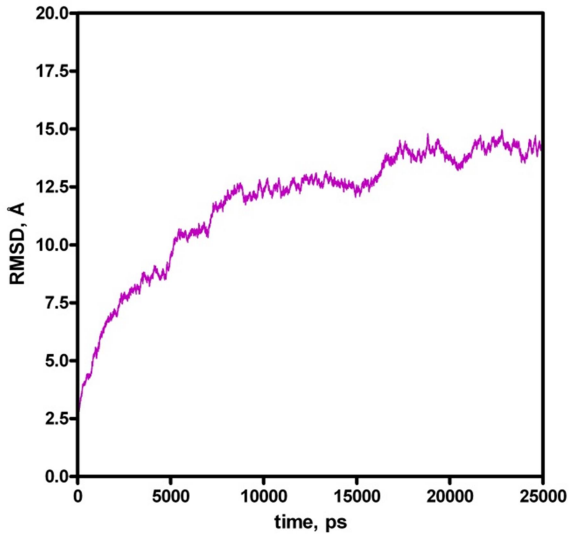


Şekil 4.3. PknK-Mg'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı RMSD (sağ) ve enerji (sol) değişimleri.

Mg iyonunun konformasyon üzerindeki etkisini gözlemlemek için protein Mg olmadan da 25 ns süre ile moleküler dinamik simülasyona tabi tutuldu. Bu hesaplamalar sonucu en kalabalık küme Mg içeren yapı ile üst üste karşılaştırıldı (Şekil 4.4). Burada görüldüğü gibi 290-550 artıkları arasındaki bölgede anlamlı bir şekilde konformasyon değişikliği görülmektedir. Yine Mg içeren bölgede anlamlı konformasyonel değişiklik olmadığı görülmektedir. Bu hesaplamalara ilişkin RMSD değişimleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistem kararlı bir dengeye ulaşmıştır.

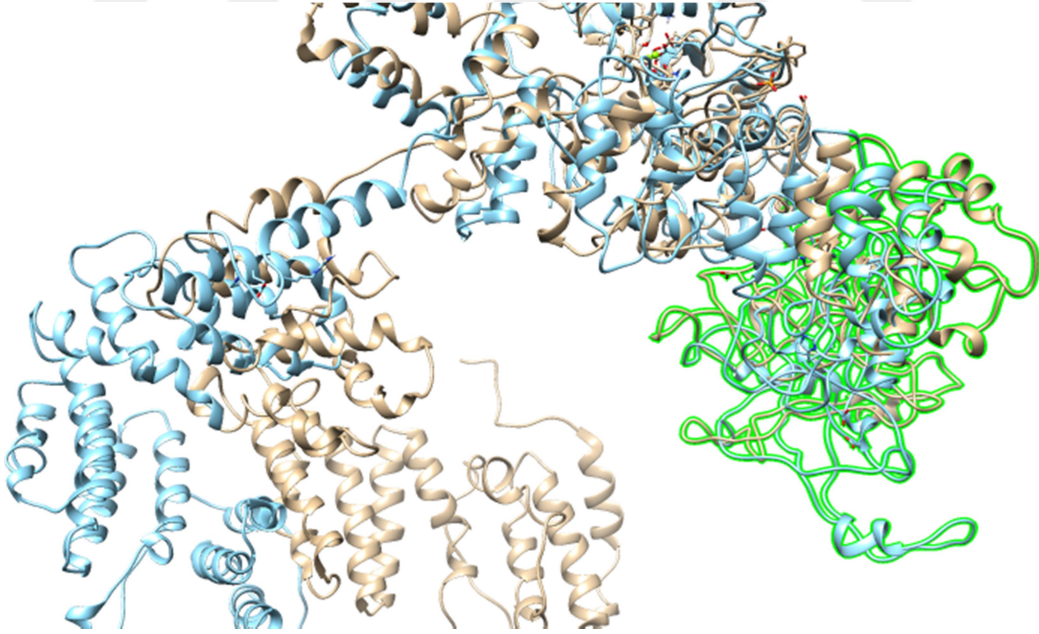


Şekil 4.4. Mg içermeyen PknK'nın 25 ns süre ile MD hesaplamaları sonucu en kalabalık kümeye ait yapının (açık mavi) PknK-Mg'un 25 ns süreyle 300 K'de MD hesaplamalardan elde edilen en kalabalık kümeye ait yapıyla (açık kahve) karşılaştırılması (1.288 Å sapma ile) sonucu oluşan görüntü.

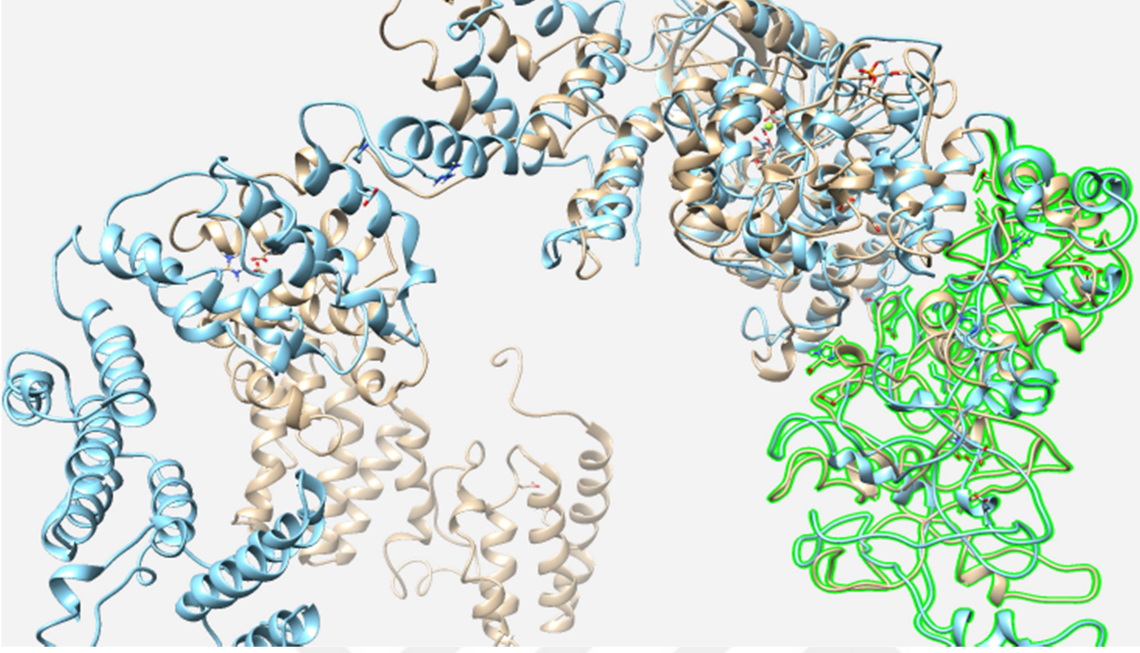


Şekil 4.5. PknK'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri

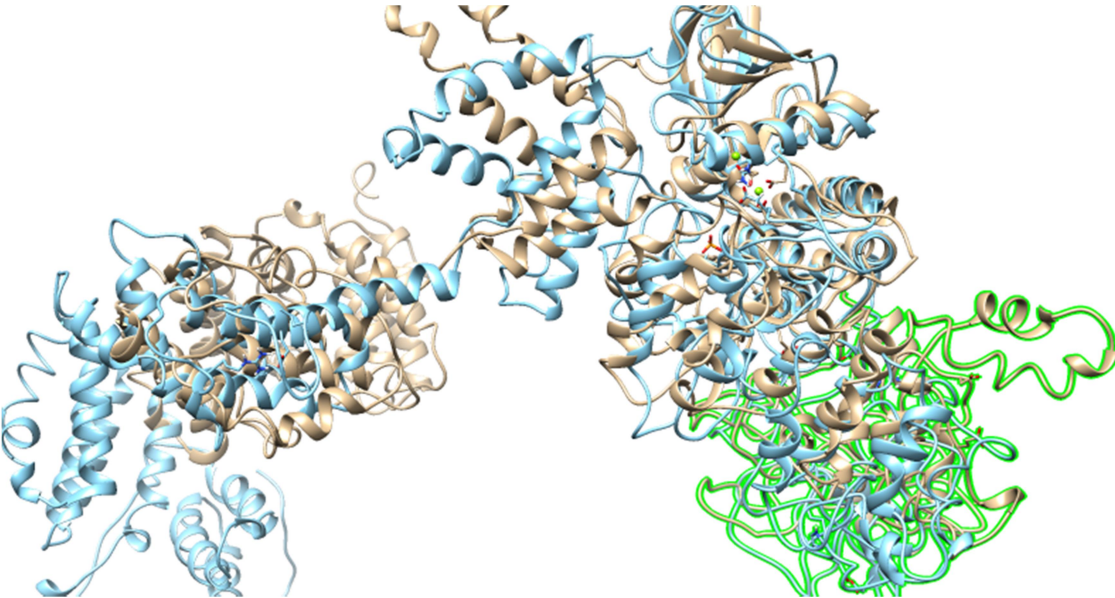
FosforlanmışPknK (THR179,THR181 ve SER187) yapıların periyodik kutu içinde 25 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik yollardan yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen yapıların fosforlanmamış yapıyla üst-üste çakıştırılmış görüntüleri Şekil 4.6-4.8’de verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış yapılar özellikle 290-550 artıkları arasındaki bölgede ciddi konformasyonel değişikliğe uğradığı görülürken Mg ve LYS55’in bulunduğu bölgede anlamlı bir konformasyon değişikliği görülmemektedir. Bu konformasyon değişikliğinin ilgili substratı tanıma ve fosforlamada önemli olabileceği kanısına varıldı. Bu fosforlanmış yapıların MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.9-4.11’de verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır. Buna karşın ilgili üç artığın (179, 181,187)fosforlandığı yapının 20 ns boyunca MD hesaplamalarından elde edilen en kalabalık kümeyle ait fosforlanmamış yapı ile üst üste çakıştırıldığı görüntü (Şekil 4.12.). Bu yapının tek artığının fosforlandığı yapıyla kıyasla 290-550 arasındaki bölgede değil 290-700 arasındaki bölgede ciddi konformasyonel değişikliğe yol açtığı görülmektedir.



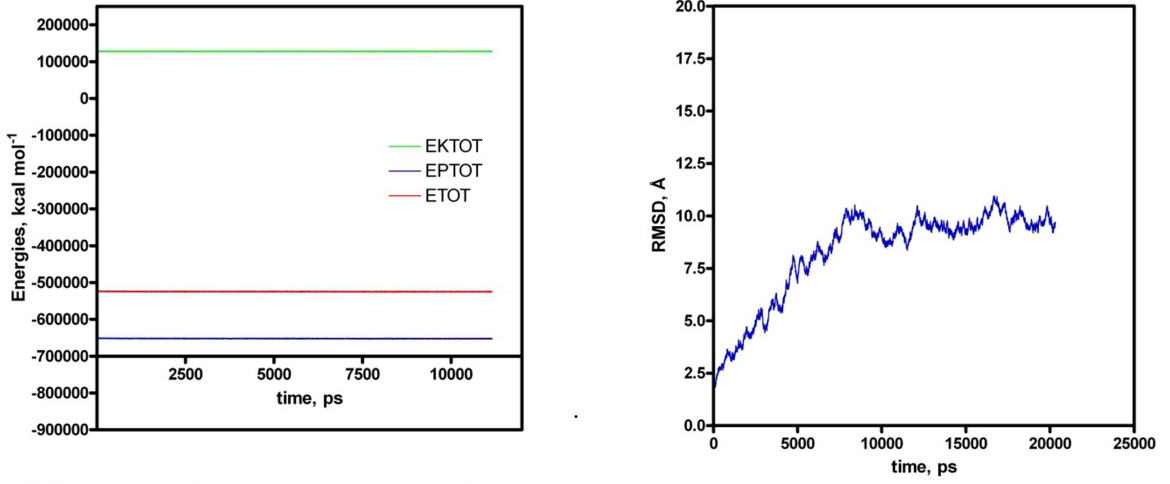
Şekil 4.6. T179P-PknK’nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi)’nin çakıştırılması (1.323 Å⁰ sapma ile) sonucu oluşan görüntü.



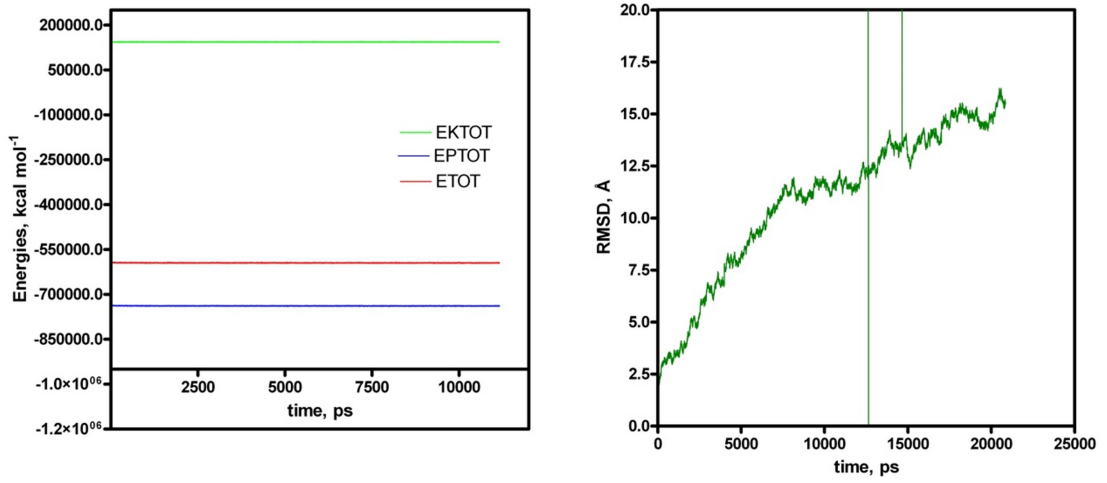
Şekil 4.7. T181P-PknK'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi)'nin karşılaştırılması(1.272 Å sapma ile) sonucu oluşan görüntü.



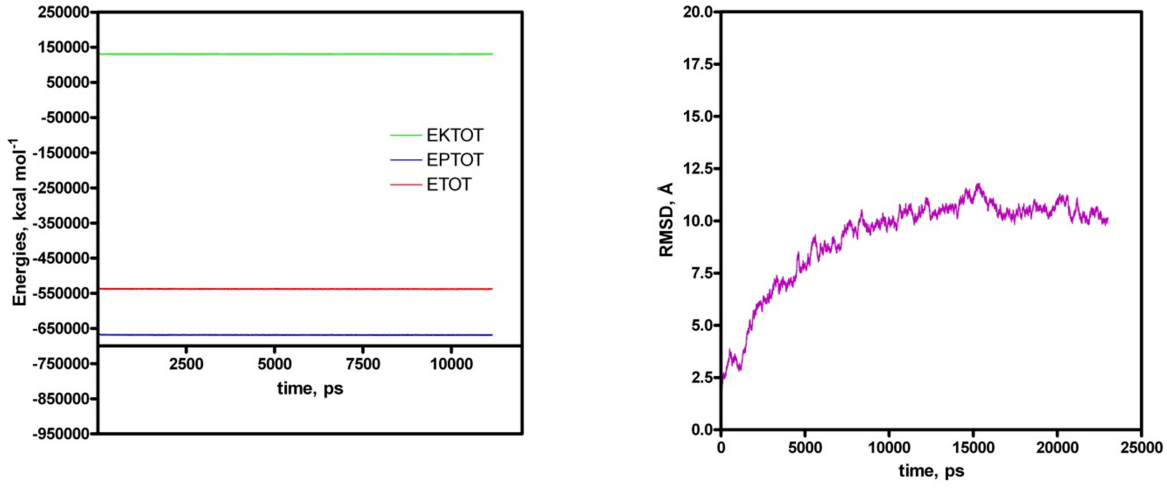
Şekil 4.8. S187P-PknK'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi)'nin karşılaştırılması(1.262 Å sapma ile) sonucu oluşan görüntü



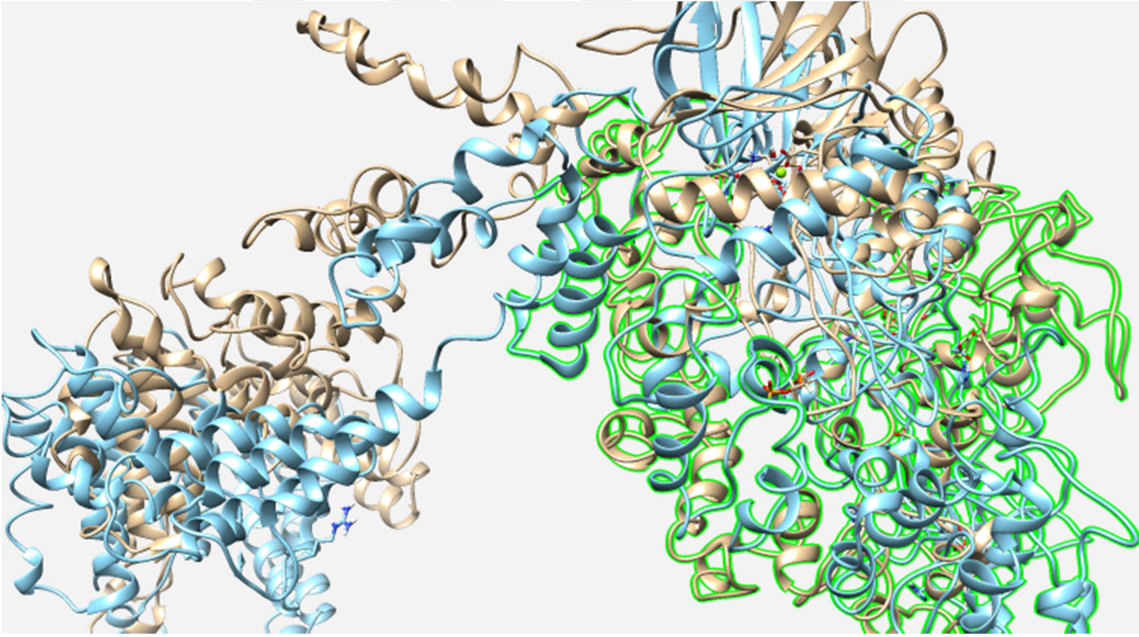
Şekil 4.9. THR179P-PknK'nın 20 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).



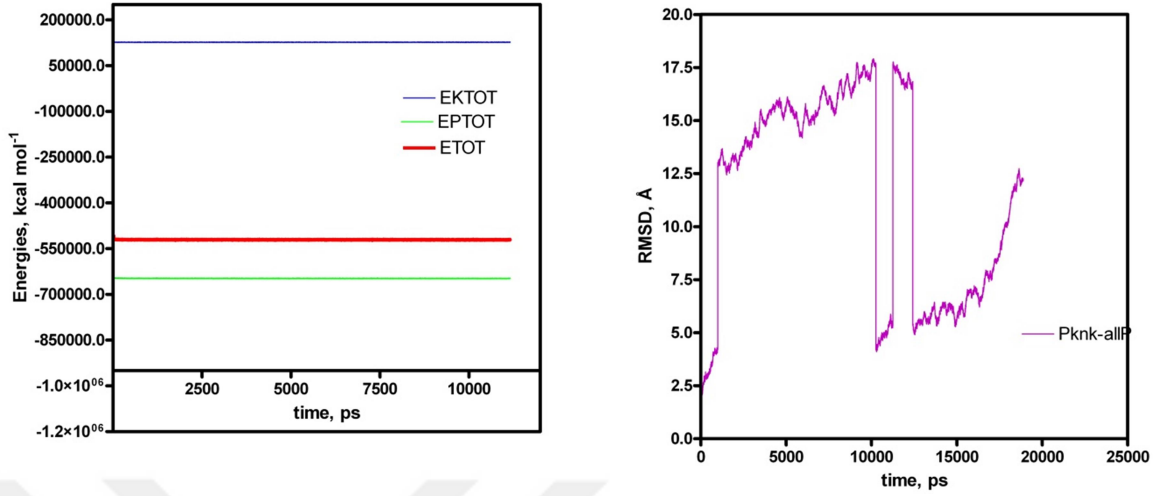
Şekil 4.10. THR181P-PknK'nin 23 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).



Şekil 4.11. SER187P-PknK'nın 24 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).

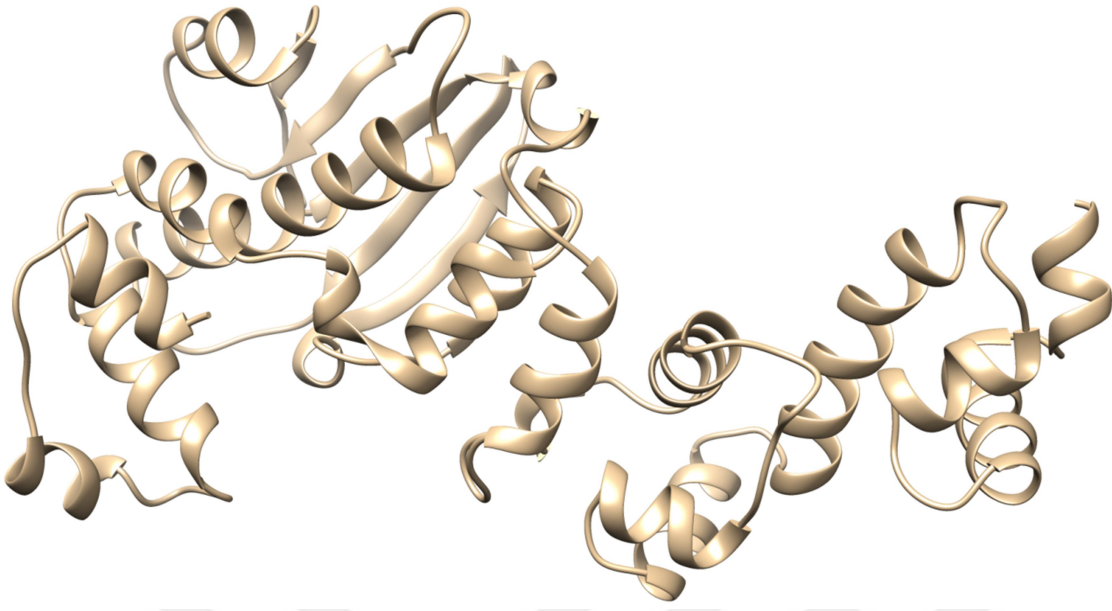


Şekil 4.12. SER187-THR181-THR179P PknK'nın 20 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık kahve) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PknK (açık mavi)'nin çakıştırılması(1.476 Å⁰ sapma ile) sonucu oluşan görüntü.

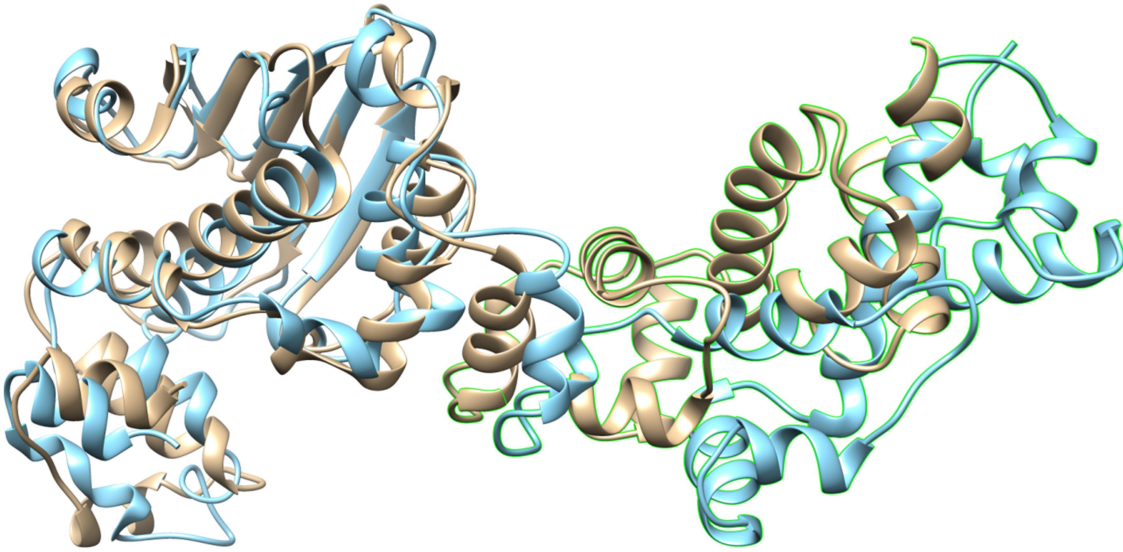


Şekil 4.13. SER187-THR181-THR179P PknK'nın 20 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).

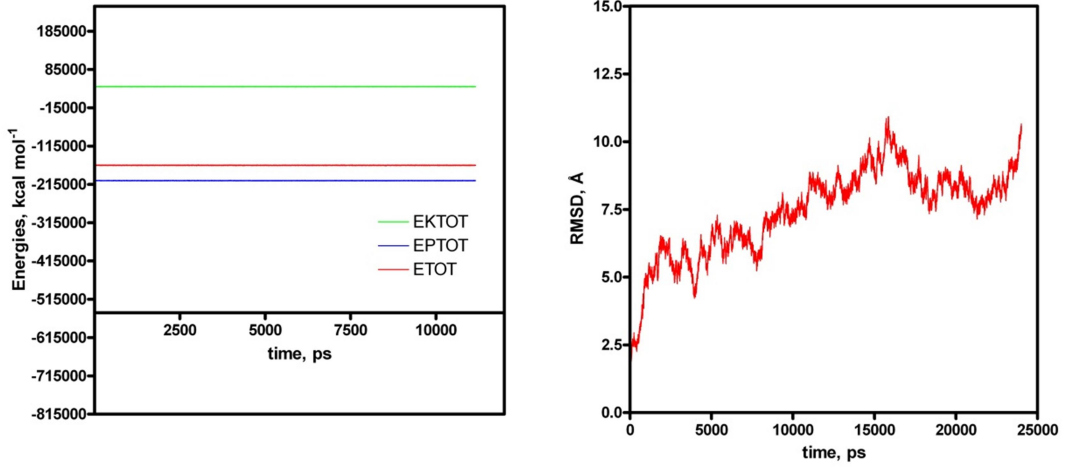
VirS'nin SWISS-MODEL Homology Modelling Report'a göre ProMod3 Version 1.2.0. ile homoloji modelleme yapılması sonucunda AraCfamilytranscriptionalregülatör5chh.1.Akalıp ile %21.04 benzerlik görülmüştür. Sekans benzerliği 0.29 dur. Model için GMQE (Global Model Quality Estimate) 0.59, QMEAN -3.37'dir. Bu proteine ait üç boyutlu yapı Şekil 4.14'te verilmiştir. Bu yapının periyodik kutu içinde 24ns süre ile MD hesaplamalardan elde edilen en kalabalık kümeye ait yapı Şekil 4.15'te verilmiştir. Burada görüldüğü gibi MD hesaplamalar sonucu protein 222. artıktan sonraki kısımda anlamlı konformasyonel değişikliklere uğradığı görülmüştür. Bu yapının periyodik kutu içinde MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır.



Şekil 4.14. Homoloji model hesaplamalar ile elde edilen VirS'nin 3 boyutlu yapısı.

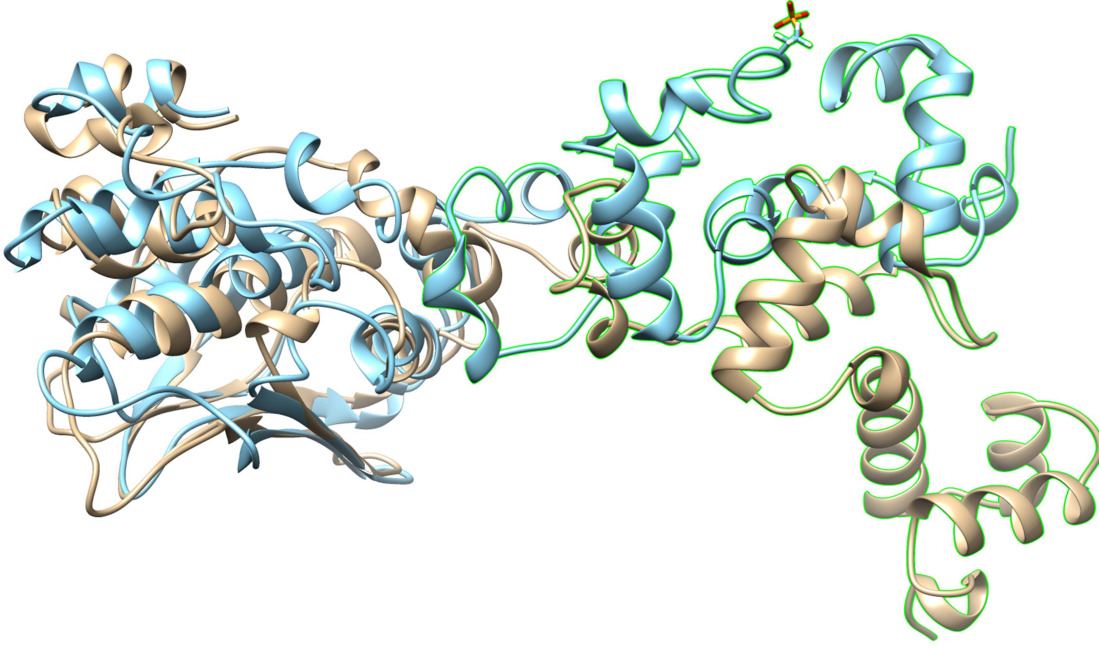


Şekil 4.15. VirS'nin 24 ns süre ile 300 K' de moleküler dinamik hesaplamalar sonucu elde edilen en kalabalık kümenin (mavi) homoloji model (açık kahverengi) ile karşılaştırılmasıyla oluşan görüntü

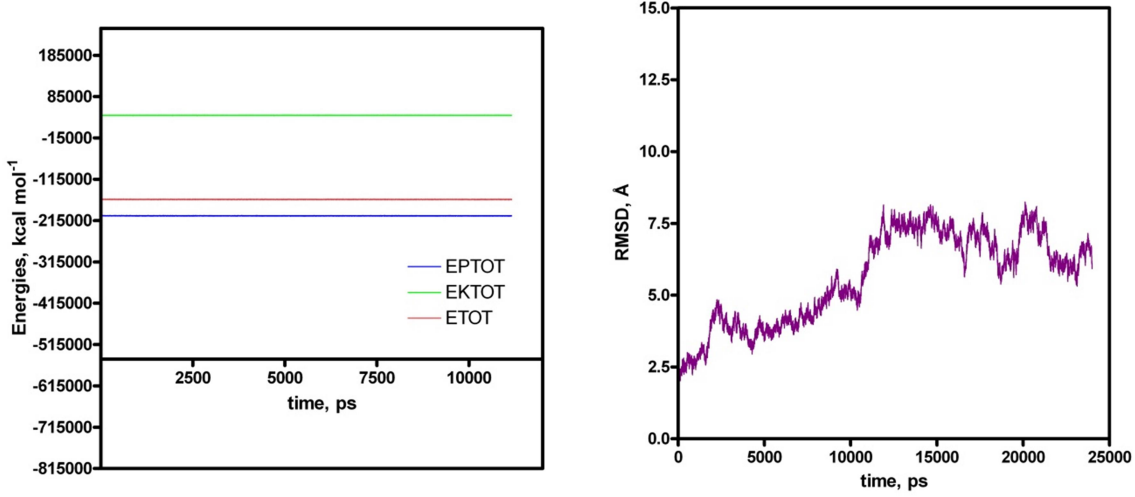


Şekil 4.16. VirS'nin 24 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).

THR248'de fosforlanmış VirS'nin (VirS-T248-P) periyodik kutu içinde sırasıyla 25ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeye ait yapısının fosforlanmamış yapıyla üst-üste çakıştırılmış görüntüsü Şekil 4.17'de verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış THR248 yapının proteinin 218.artıktan sonraki bölgede anlamlı bir şekilde konformasyonel değişikliğe sebebiyet verdiği görülmektedir (Şekil 4.17). Bu yapının periyodik kutu içinde MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.18'de sunulmuştur. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır.

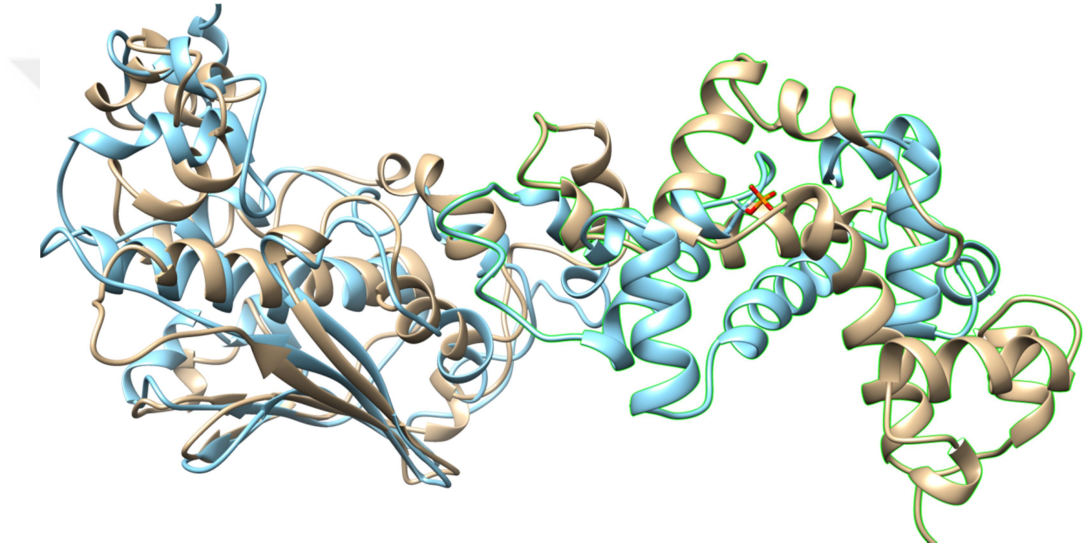


Şekil 4.17. VirS-T248-P'nın 25ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış VirS (açık kahve) ile karşılaştırılmasıyla (1.068 \AA sapma ile) sonucu oluşan görüntü.

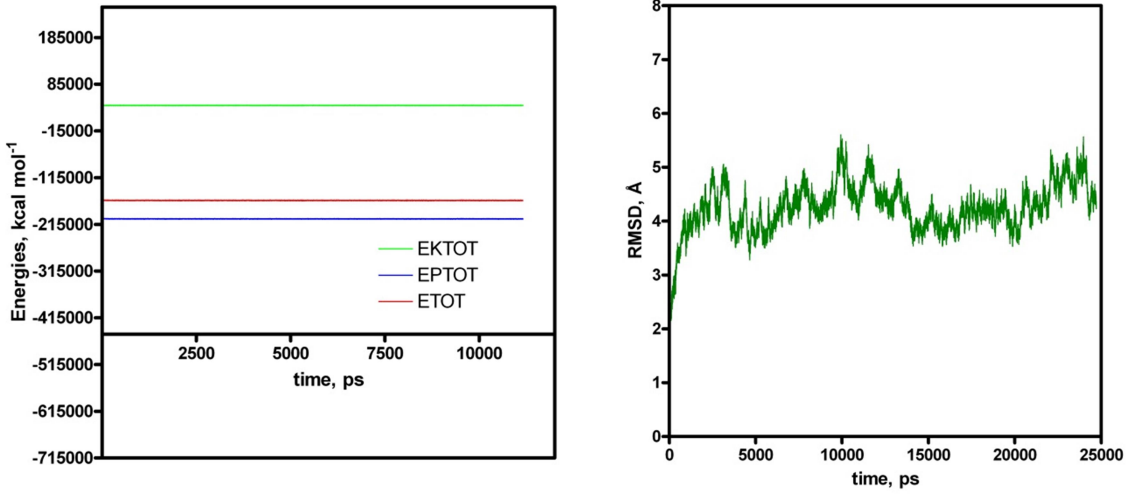


Şekil 4.18. VirS-T248-P'nın 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).

SER252’de fosforlanmışVirS’nın (VirS-S252-P) periyodik kutu içinde sırasıyla 25 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeye ait yapısının fosforlanmamış yapıyla üst-üste çakıştırılmış görüntüsü Şekil 4.19’de verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış SER252 yapının proteinin 223. artıktan sonraki bölgede önemli derecede konformasyonel değişikliğe sebep olduğu görülmektedir (Şekil 4.19). Bu yapının periyodik kutu içinde MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.20’de sunulmuştur. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır.

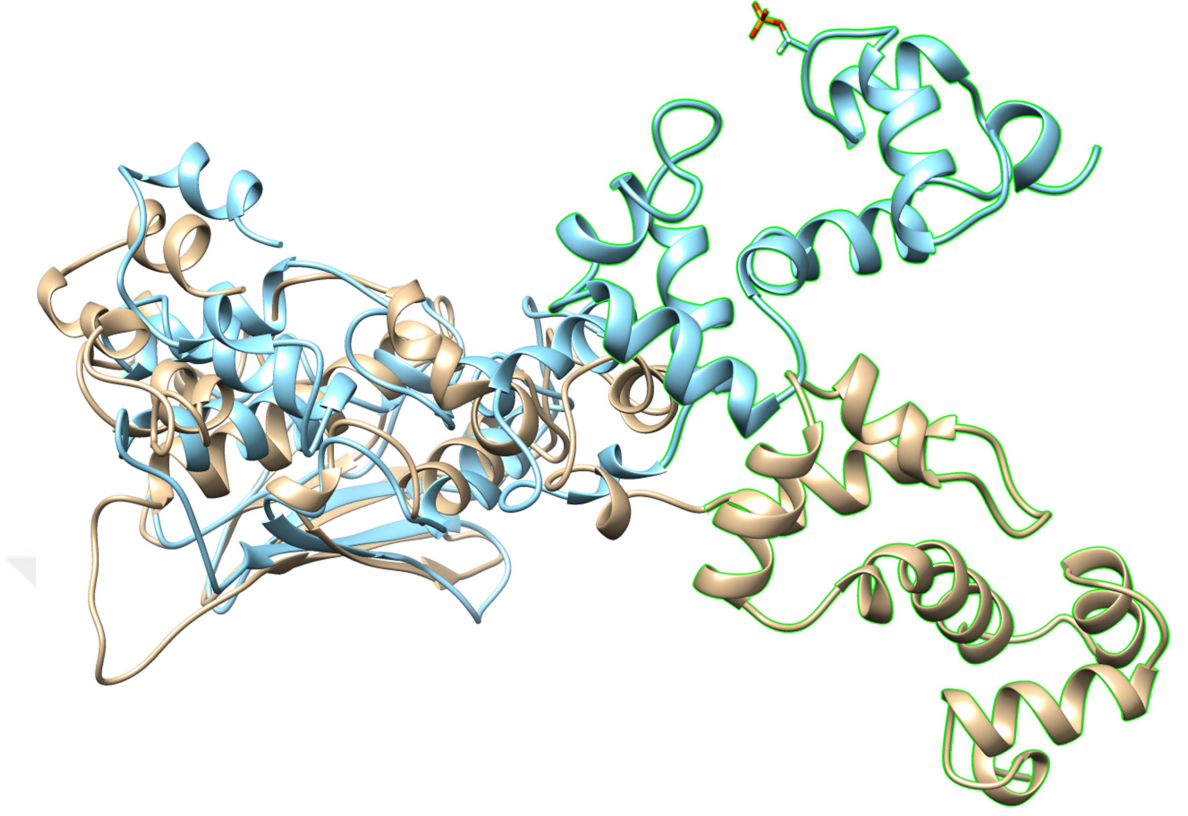


Şekil 4.19. VirS-S252-P’nın 25 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış VirS (açık kahve) ile çakıştırılmasıyla (1.372 \AA sapma ile) sonucu oluşan görüntü.

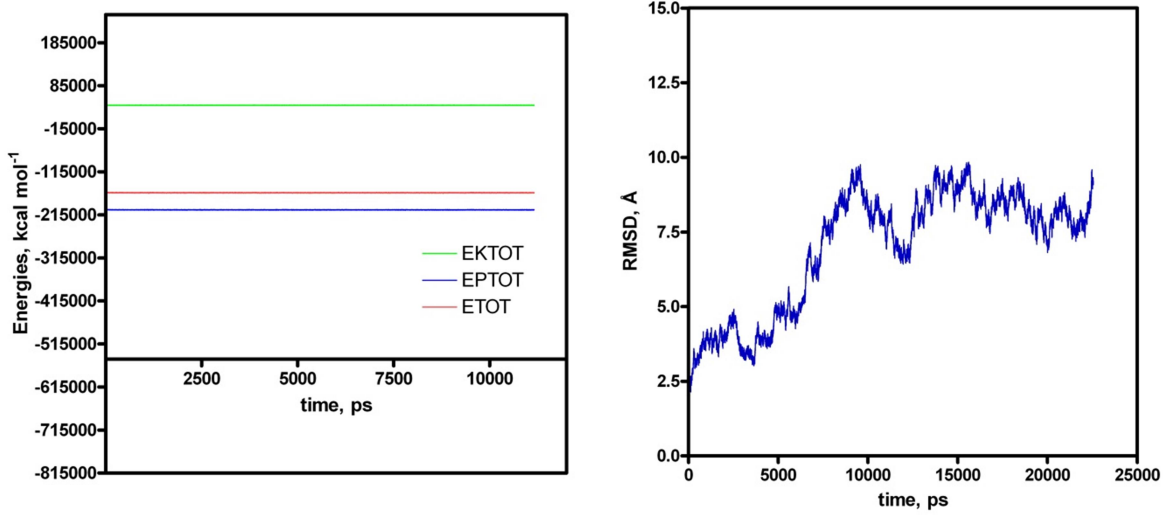


Şekil 4.20. VirS-252-P'nin 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).

SER311'de fosforlanmış VirS'nin (VirS-S311-P) periyodik kutu içinde sırasıyla 24 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeye ait yapısının fosforlanmamış yapıyla üst-üste çakıştırılmış görüntüsü Şekil 4.21'de verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış SER311 yapının proteinin 233. artıktan sonra ve özellikle fosforlamanın yapıldığı loopun bulunduğu kısımda anlamlı konformasyonel değişikliğe rastlanmıştır. (Şekil 4.21). Bu yapının periyodik kutu içinde MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.22'de sunulmuştur. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır.

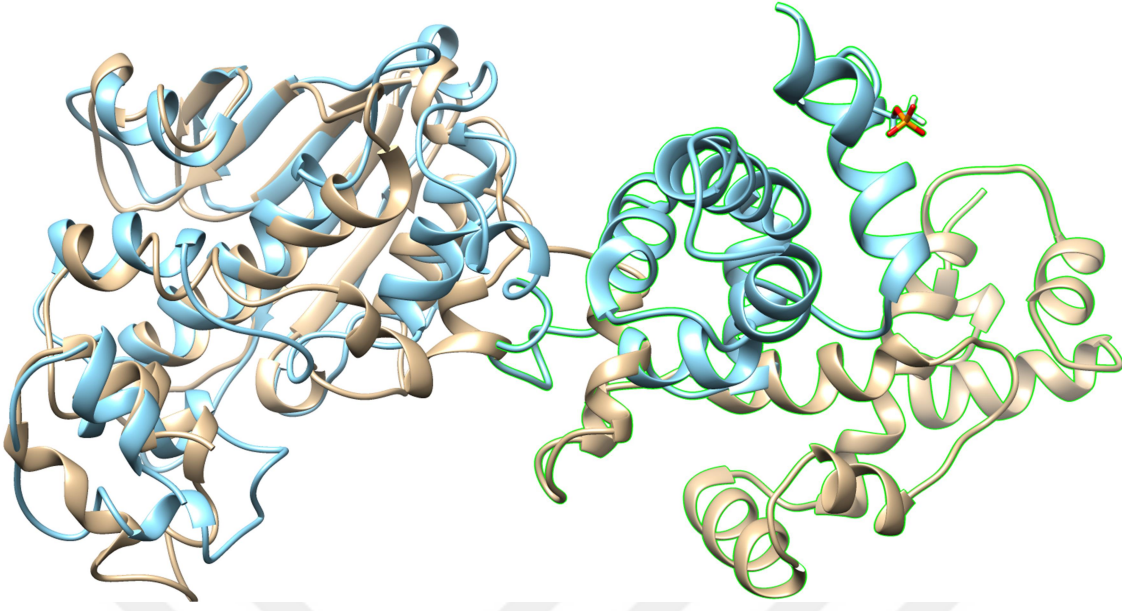


Şekil 4.21. VirS-S311-P'nın 24 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış VirS (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması (1.341\AA sapma ile) sonucu elde edilen görüntü.

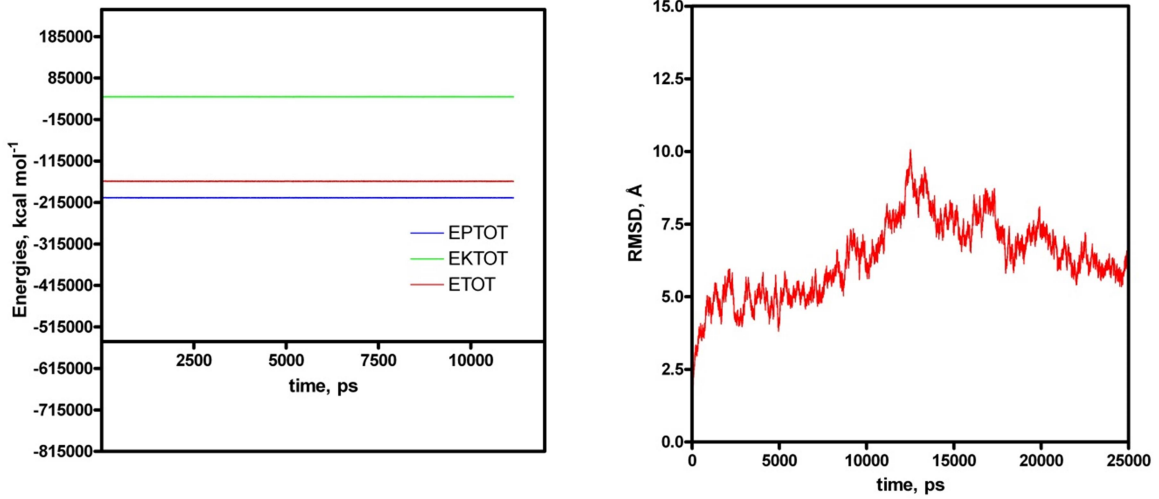


Şekil 4.22. VirS-311-P'nin 24 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).

THR327'de fosforlanmış VirS'nin (VirS-T327-P) periyodik kutu içinde sırasıyla 25 nssüreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeye ait yapısının fosforlanmamış yapıyla üst-üste karşılaştırılmış görüntüsü Şekil 4.23'te verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış THR327 yapının proteinin 320. artıktan sonraki bölgede daha ziyade fosforlanmanın olduğu loopta anlamlı konformasyonel değişiklikler gözlenmiştir(Şekil 4.23). Bu yapının periyodik kutu içinde MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.24'te verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır.



Şekil 4.23. VirS-T327-P'nın 25 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış VirS (açık kahve) ile karşılaştırılmasıyla (1.288 \AA sapma ile) sonucu oluşan görüntü.



Şekil 4.24. VirS-T327-P'nın 25 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (sağ) ve elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (sol).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak homoloji modelleme yaklaşımı ile Mtb Ser/Thr Protein Kinaz K ve onun substratı olarak düşünülen VirS proteinleri için üç boyutlu yapılar tasarlandı ve bu proteinlerin moleküler dinamik hesaplamalarla yapısal özellikleri araştırıldı. Bu tasarlanan yapıların sinyal iletimindeki rollerinin araştırılması amacı ile ilgili artıklardaki fosforilasyonun bunların konformasyonlarına olan etkileri incelendi.

Sonuçlar fosforilasyonun her iki proteinin konformasyonlarında anlamlı değişikliklere yol açtığını gösterdi. MD simülasyon sonucu PknK'nın Tre181, Tre179 ve Ser187 ve VirS'nin Sep252, Tre327, Tre248 ve Sep311 nolu artıklarında fosforilasyon sonucu değişikliğe uğradı.

Gelecekte;

VirS'nin MymA operonundaki bağlanma bölgesini bularak DNA ile etkileşimini görebilmeyi ve eğer yapıyı aydınlatabilirsek, VirS'yi bloke ederek, fosforilasyonu engelleyerek, mymA operonunda engellemeye giderek ilaç önerisinde bulunmak hedefimiz olacaktır yeni ilaçların keşfine yönelik çabalara ışık tutabilecek bilgi sağlayabilir.



6. KAYNAKLAR

- Alber, T. 2009 Signaling mechanisms of the Mycobacterium tuberculosis receptor Ser/Thr protein kinases. *Current Opinion in Structural Biology* 19 (6): 650-657.
- Alder, B. J., Wainwright, T. E. 1957. Phase transition for a hard sphere system, *J. Chem.Phys.* 27: 1208–1209.
- Alder, B. J., Wainwright, T. E. 1959. Studies in molecular dynamics. I. General method, *J. Chem. Phys.* 31: 459–466.
- Andersen, P., Doherty, T. M. 2005. Learning from BCG: Designing a better tuberculosis vaccine. *Discov Med* 5(71): 383-387.
- Aslund, F., Beckwith, J. 1999. The thioredoxin superfamily:redundancy, specificity and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* 181: 1375–1379
- Blatch, G. L., Lässle, M. 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21: 932–939
- Bharati, B. Chatterji, D. 2013. Quorum sensing and pathogenesis: Role of small signalling molecules in bacterial persistence. *Current Science.* 105: 643-656.
- Bordoli, L, Kiefer, F., Arnold, K. 2009. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* 4: 1–13.
- Bateman, A., Martin, M. J., O'Donovan, C. 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 45: 158– 169.
- Blumberg, H. M., Burman, W. J., Chaisson, R. E., Daley, C. L., Etkind, S. C., Friedman, L. N., Fujiwara, P., Grzemska, M., Hopewell, P. C., Iseman, M. D., Jasmer, R. M., Koppaka, V., Menzies, R. I., O'Brien, R. J. Reves, R. R., Reichman, L. B., Simone, P. M., Starke, J. R., Vernon, A. A. 2003. Treatment of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167: 603–662.
- Blasi, P., Schoubben, A., Giovagnoli, S., Rossi, C., Ricci, M. 2009. Fighting tuberculosis:old

6. KAYNAKLAR

drugs, new formulations. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6: 977–993.

Burman, W. J., Gallicano, K., Peloquin, C. 2001. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin. Pharmacokinet.* 40: 327–341.

Belanger, A.E. 1997. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 11919–11924

Banavali, K., Roux, B. 2009. Flexibility and charge asymmetry in the activation loop of Src tyrosine kinases *Proteins.* 74(2): 378–389

Boitel, B., Ortiz-Lombardia, M., Duran, R., Pompeo, F., Cole, S. T., Cervenansky, C., Alzari, P. M. 2003. PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 49: 1493–1508.

Beste, D. J. 2007. Transcriptomic analysis identifies growth rate modulation as a component of the adaptation of mycobacteria to survival inside the macrophage. *J. Bacteriol.* 189: 3969–3976

Chaba, R., Raje, M., Chakraborti, P. K. 2002. Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *Eur. J. Biochem* 269(4): 1078 –1085

Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. 1995. A second generation force-field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J Am Chem Soc* 117: 5179–5197

Canova, M. J., Veyron-Churlet, R., Zanella-Cleon, I. 2008. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinase PknL phosphorylates Rv2175c: mass spectrometric profiling of the activation loop phosphorylation sites and their role in the recruitment of Rv2175c. *Proteomics* 8: 521–533.

Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E., Cruzeiro, V. W.

D., Darden, T. A., Duke, R. E., Ghoreishi, D. M. K., Gilson, H., Gohlke, A. W., Goetz, D., Greene, R., Harris, N., Homeyer, S., Izadi, A., Kovalenko, T., Kurtzman, T. S., Lee, S., LeGrand, P., Li, C., Lin, J., Liu, T., Luchko, R., Luo, D. J., Mermelstein, K. M., Merz, Y., Miao, G., Monard, C., Nguyen, H., Nguyen, I., Omelyan, A., Onufriev, F., Pan, R., Qi, D. R., Roe, A., Roitberg, C., Sagui, S., Schott-Verdugo, J., Shen, C. L., Simmerling, J., Smith, R., Salomon-Ferrer, J., Swails, R. C., Walker, J., Wang, H., Wei, R. M., Wolf, X., Wu, L., Xiao, D. M., York P., Kollman, A., 2018. AMBER 2018, University of California, San Francisco

Chao, J., Wong, D., Zheng, X., Poirier, V., Bach, H., Hmama, Z., Av-Gay, Y. 2009. Protein kinase and phosphatase signaling in Mycobacterium tuberculosis physiology and pathogenesis *Biochim Biophys Acta* 1804(3): 620-627

Cheng, H., Force, T. 2010. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ Res* 106: 21-34

Cozier, G. E. 1995. The structure of the quinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter acetii* modeled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochem. J.* 308: 375–379.

Cheek, S., Ginalski, K., Zhang, H., Grishin, N. V. 2005. A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct Biol* 5(6): 1577-1780.

Cowley, V. 2004. The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*. *Mol. Microbiol.* 52: 1691–1702

Cole, S, T. 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537–544

Darden, T., York, D., Pedersen, L. 1993. Method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 98: 10089–10092

De Maio, J. 1996. A stationary-phase stress-response sigma factor from Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 2790–2794

Deol, P., Vohra, R., Saini, A. K. 2005. Role of Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr kinase

6. KAYNAKLAR

PknF: implications in glucose transport and cell division. *J Bacteriol* 187: 3415–3420.

Edholm, O., Berger, O., Jähnig, F. 1995. Structure and fluctuations of bacteriorhodopsin in the purple membrane: a molecular dynamics study. *J. Mol. Biol.* 250: 94–111.

Foussard, M., Cabantous, S., Pedelacq, J., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., Birck, C., Samama, J. 2001. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect* 3: 417-424.

Av-Gay, Y., Everett, M. 2000 The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 8: 238–244. [PubMed: 10785641].

Gillespie, S. H. 2002. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 267-274.

Av-Gay, Y., Jamil, S., Drews, S. J. 1999. Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. *Infect. Immun.* 67(11): 5676–5682

Gopalswamy, R., Narayanan, P. R., Narayanan, S. 2004. Cloning, overexpression, and characterization of a serine/threonine protein kinase *pknI* from *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. *Protein Expression Purif.* 36(1): 82–89

Gopalswamy, R., Narayanan, S., Chen, B. 2009. The serine/ threonine protein kinase PknI controls the growth of *Mycobacterium tuberculosis* upon infection. *FEMS Microbiol Lett* 295: 23–29.

Ginsberg, A. M., Spigelman, M. 2007. Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nat. Med.* 13: 290–294

Gupta, S., Tyagi, A.K. 1993. Sequence of a newly identified *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a protein with sequence homology to virulence-regulating proteins. *Gene* 126: 157–158

Greenstein, A. E., Echols, N., Lombana, T. N., King, D. S., Alber, T. 2007. Allosteric activation

by dimerization of the PknD receptor Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 282:11427–11435.

Gómez-Velasco, A., Bach, H., Rana, A. K. 2013. Disruption of the serine/threonine protein kinase H affects phthiocerol dimycocerosates synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Read Engl* 159: 726–736.

Greenstein, A. E., MacGurn, J. A., Baer, C. E. 2007. *M. tuberculosis* Ser/Thr protein kinase D phosphorylates an anti-anti-sigma factor homolog. *PLoS Pathog* 3: 49.

Gil, M., Graña, M., Schopfer, F. J., Wagner, T., Denicola, A., Freeman, B. A., Alzari, P. M., Batthyány, C., Duran, R., 2013. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe-S center. *Free Radic. Biol. Med.* 65: 150–161.

Huse, M., Kuriyan, J. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275-282

Hanks, S., Hunter, T., 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily:kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9: 576–596

Homeyer, N., Horn, A. H. C., Lanig, H., Sticht H. 2006. AMBER force field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine and phosphohistidine. *J. Mol. Model.* 12: 281-289.

Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbin, B., Roitberg, A., Simmerling, C. 2006. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* 65: 712–725

Harth, G. 2000. Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly- L - glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 418–423

Hett, E. C. Rubin, E. J. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective.

6. KAYNAKLAR

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72: 126-156.

Harth, G., Horwitz, M. A. 1999. An inhibitor of exported Mycobacterium tuberculosis glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. *J. Exp. Med.* 189: 1425–1435

Jayakumar, D., Jacobs, W. R., Narayanan, S. 2008. Protein kinase E of Mycobacterium tuberculosis has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection. *Cell Microbiol* 10: 365–374.

Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J., Klein, M. L. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79: 926-935

Kang, C. M., Abbott, D. W., Park, S. T., Dascher, C. C., Cantley, L. C., Husson, R. N. 2005. The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev* 19: 1692–1704.

Kaufmann, S. H. 2005. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med* 353: 2423-2426.

Koul, A., Choidas, A., Tyagi, A. K., Drlica, K., Singh, Y., Ullrich, A. 2001. Serine/threonine protein kinases PknF and PknG of Mycobacterium tuberculosis: characterization and localization. *Microbiology* 147(8): 2307–2314

Kumar, P. 2009. The Mycobacterium tuberculosis protein kinase K modulates activation of transcription from the promoter of mycobacterial monooxygenase operon through phosphorylation of the transcriptional regulator VirS. *J. Biol. Chem.* 284: 11090–11099

Koch, R. 1982. The etiology of tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1270-1274

Khan, S., Nagarajan, S. N., Parikh, A. 2010. Phosphorylation of enoyl-acyl carrier protein reductase InhA impacts mycobacterial growth and survival. *J Biol Chem* 285: 37860–37871.

Luirink, J. 1994. An alternative protein targeting pathway in Escherichia coli: studies on the role

of FtsY. *EMBO J.* 13: 2289–2296

Lu, J., Kovach, J. S., Johnson, F., Chiang, J., Hodes, R., Lonser, R., and Zhuang, Z. 2009. Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11697-117022.

Lakshminarayan, H., Narayanan, S., Bach, H., Sundaram, K. G., Av-Gay, Y. 2008. Molecular cloning and biochemical characterization of a serine threonine protein kinase, PknL, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression Purif.* 58(2), 309–317

Lombana, T. N., Echols, N., Good, M. C., Thomsen, N. D., Ng, H-L., Greenstein, A. E., Falick, A. M., King, D. S., Alber, T. 2010. Allosteric activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinase, PknB. *Structure* 18: 1667–1677.

Molle, V., Soulat, D., Jault, J-M. 2004. Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 234: 215–223.

Molle, V., Zanella-Cleon, I., Robin, J. P., Mallejac, S., Cozzone, A. J., Becchi, M. 2006. Characterization of the phosphorylation sites of *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases, PknA, PknD, PknE, and PknH by mass spectrometry. *Proteomics* 6: 3754–3766.

McCammon, J.A., Gelin, B. R., Karplus, M. 1977. Dynamics of folded proteins, *Nature* 267:585–590.

Molle, V., Girard-Blanc, C., Kremer, L., Doublet, P., Cozzone, A. J., and Prost, J. F. (2003) Protein PknE, a novel transmembrane eukaryotic-like serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308: 820 – 825

Molle, V., Kremer, L., Girard-Blanc, C., Besra, G. S., Cozzone, A. J., Prost, J. F. (2003) An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 42: 15300 –15309

Malhotra, V., Arteaga-Cortes, L. T., Clay, G., and Clark-Curtiss, J. E. 2010. *Mycobacterium*

6. KAYNAKLAR

tuberculosis protein kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications for immune modulation. *Microbiology* 156: 2829-2841.

McConnell, J. L., Wadzinski, B. E. 2009. Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. *Mol Pharmacol* 75: 1249-1261

Mieczkowski, C., Iavarone, A. T., Alber, T. 2008. Auto-activation mechanism of the Mycobacterium tuberculosis PknB receptor Ser/Thr kinase. *Embo J* 27: 3186–3197.

Malhotra, V., Arteaga-Cortes, L. T., Clay, G., Clark-Curtiss, J. E. 2010. Mycobacterium tuberculosis protein kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications for immune modulation. *Microbiology* 156: 2829–2869

Markiewicz, Z. 1982. Spherical E. coli due to elevated levels of D -alanine carboxypeptidase. *Nature* 297: 702–704

McConnell and Wadzinski (2009) Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development. *Mol Pharmacol* 75(6): 1249-1261

Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Omelchenko, M. V., Robertson, C. L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., Bryant, S. H. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39: 225–229.

Ortiz-Lombardia M, Pompeo F, Boitel B, Alzari PM. 2003. Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* 278:13094–13100.

O'Hare, H. M, Durán, R., Cerveñansky, C. 2008. Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol Microbiol* 70: 1408–1423.

O'Hare, H. M., Duran, R., Cervenansky, C., Bellinzoni, M., Wehenkel, A. M., Pritsch, O., Obal,

G., Baumgartner, J., Vialaret, J., Johnsson, K., Alzari, P. M..2008. Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol Microbiol* 70: 1408–1423.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferin, T. E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612

Pérez, J., Garcia, R., Bach, H. 2006. Mycobacterium tuberculosis transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 6–12.

Peirs, P., Parmentier, B., De Wit, L., Content, J. (2000) The Mycobacterium bovis homologous protein of the Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinase MbK (PknD) is truncated FEMS Microbiol. Lett. **188(2)** 135–139

Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B. H., Vreven, T., Weng, Z. 2014. ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. *Bioinformatics* 30(12): 1771-1773

Petri Jr., W. A. 2001. Antimicrobial agents: drugs used in the chemotherapy of tuberculosis, Mycobacterium avium complex disease, and leprosy, in: J.G. Hardman, L.E. Limbird (Eds.), Goodman, Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics sayfa 1273–1294. New York

Pham, T. H., Gao, X., Tsai, K., Olsen, R., Wan, F., Hardwidge, P. R. 2012. Functional differences and interactions between the Escherichia coli typeIII secretion system effectors NleH1 and NleH2. *Infect Immun* 80, 2133-2140.

Kumar, P., Kumar, D., Parikh, A., Rananaware, D., Gupta, M., Singh, Y., Nandicoori, V. K. 2009, The Mycobacterium tuberculosis Protein Kinase K Modulates Activation of Transcription from the Promoter of Mycobacterial Monooxygenase Operon through Phosphorylation of the Transcriptional Regulator VirS , *J. Biol. Chem* 284(17) 11090-11099

Ponting, C. P. 1997 PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 19: 469–479

Roe, D. R. Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of

6. KAYNAKLAR

molecular dynamics trajectory data. III. *Journal of chemical theory and computation* 9(7): 3084-3095)

Sachsenmaier, C. 2001 Targeting protein kinases for tumor therapy. Cohen, P. (1991) Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods Enzymol* 201: 389-398.

Sali, A., Blundell, T. L. 1993. "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints". *J. Mol. Biol.* 234(3): 779–815.

Sassetti, C. M., Boyd, D. H., Rubin, E. J. 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48: 77–84.

Saunders, B. M.; Britton, W. J. 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol. Cell Biol.* 85: 103-111.

Saxena, A. Mukherjee, U. Kumari, R. Singh, P. Lal, R. 2014. Synthetic Biology in Action: Developing a Drug Against MDR-TB. *Indian J Microbiol*, 54(4): 369–375

Schatz, A., Waksman. S. A. 1944. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57: 244–248.

Scherr, N., Honnappa, S., Kunz, G., Mueller, P., Jayachandran, R., Winkler, F., Pieters, J., Steinmetz, M. O. 2007. Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12151–12156.

Scheraga, H. A., Khalili, M., Liwo, 2007, A. Protein-folding dynamics: overview of molecular simulation techniques, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58: 57–83.

Sharma, K., Chandra, H., Gupta, P. K. 2004. PknH, a transmembrane Hank's type serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis* is differentially expressed under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* 233: 107–113.

Shaw, D. E., Dror, R. O., Salmon, J. K., Grossman, J. P., Mackenzie, K. M., Bank, J. A., Young, C., Deneroff, M. M., Batson, B., Bowers, K. J., Chow, E., Eastwood, M. P., Ierardi, D. J.,

Klepeis, J. L., Kuskin, J. S., Larson, R. H., Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Moraes, M. A., Piana, S., Shan, Y., Towles, B., Millisecond-scale molecular dynamics simulations on Anton, Proceedings of the Conference on High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis 2009. ACM, New York.

Sibley, L. D. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* 56: 1232–1236

Sikorski, R. 1990. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* 60: 307–317

Singh, D.K., Singh. P. K., Tiwari, S. 2014. Phosphorylation of pyruvate kinase A by protein kinase J leads to the altered growth and differential rate of intracellular survival of mycobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 10065–10076.

Springer, T. A. 1998. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor and extracellular matrix components. *J. Mol. Biol.* 283: 837–862.

Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183-215

Tiwari, D., Singh, R.K., Goswami, K., Verma, S. K., Prakash, B., Nandicoori, V. K. 2009. Key residues in Mycobacterium tuberculosis protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host. *Journal of Biological Chemistry* 284: 27467–27479.

Venkatesan, A., Palaniyandi, K., Sharma, D. 2016. Functional characterization of PknI-Rv2159c interaction in redox homeostasis of Mycobacterium tuberculosis. *Front Microbiol* 7: 1654.

Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G. 2004. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304:1800–1804.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. 2007. SWISS-MODEL:

6. KAYNAKLAR

homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46 (W1), W296-W303 (2018).

Weber, T. J. 2010. *Comprehensive Toxicology*, 2nd Edition Elsevier Science USA

Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Graña, M., Duran, R. 2008. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1784:193–202.

Werner, T., 2012. The basics of computational modelling methodologies and feature approaches to select lead compounds by employing in silico (virtual) drug screening and structure-based drug design (SBDD). *Advanced Drug Delivery Reviews* 64: 323–343

West, A. H., Stock, A. M. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26: 369–376.

Woolf, T. B., Roux, B. 1994. Molecular dynamics simulation of the gramicidin channel in a phospholipid bilayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11631–11635.

Wu, S. Zhang, Y. 2007. LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 35: 3375-3382.

Young, T. A., Delagoutte, B., Endrizzi, J. A., Falick, A. M., Alber, T. 2003. Structure of Mycobacterium tuberculosis PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat Struct Biol* 10: 168–174.

Youmans, G. P., Williston, E. H., 1946. Increase in resistance of tubercle bacilli to streptomycin; a preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 21: 126.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Alev ARSLANTÜRK BİNGÜL

Doğum Yeri: İzmit

Doğum Tarihi : 06.11.1977

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Kurumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İzmit Lisesi /İzmit 1994-1997

Lisans : Kocaeli Üniversitesi Fen/Ed Fakültesi Kimya Bölümü 2000-2005

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D 2017-2019



DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	ALEV ARSLANTÜRK BİNGÜL
ÖĞRENCİ NO	17803001
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	<input type="checkbox"/> Güz <input checked="" type="checkbox"/> Bahar
ANABİLİM DALI	KİMYA
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> PROTEİN KİNAZ K'nın SİNYAL İLETİMİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA ARAŞTIRILMASI
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	67
BENZERLİK ORANI	%5
RAPORLAMA TARİHİ	03/07/2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 03/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *TURNİTİN* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

- Kabul/Onay sayfaları hariç,
 Kaynakça hariç
 Alıntılar hariç/dâhil
 Diğer

Dicle Üniversitesi FEN BİLİMLERİ Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu Uygulama Esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Öğrencinin

Adı ve Soyadı: Alev ARSLANTÜRK BİNGÜL

Tarih: 04.07.2019

İmza:

Tez Danışmanı

Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇCIOĞLU

Tarih:

İmza:

04.07.2019

Anabilim Dalı Başkanı

Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Haluk AYDIN

Tarih:

İmza:

04.07.2019

Formdaki bilgiler, bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersizdir.