T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ayhan ÜNLÜ

TİFO TOKSİNİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE KURAMSAL VE DENEYSEL METOTLARLA İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Kevser KELLE

EDİRNE – 2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ayhan ÜNLÜ

TİFO TOKSİNİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE KURAMSAL VE DENEYSEL METOTLARLA İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Kevser KELLE

EDİRNE – 2022

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Ayhan ÜNLÜ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Kevser KELLE tarafından tez başlığı "Tifo toksininin moleküler düzeyde kuramsal ve deneysel metotlarla incelenmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı / /2022 yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza

JÜRİ BAŞKANI

İmza | İmza

ÜYE | ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Necdet SÜT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin belirlenmesinden bitimine kadar rehberliğini ve desteğini benden esirgemeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Ayhan Ünlü'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ…..……1

GENEL BİLGİLER…...……..3

TİFO…….3

ADP-RİBOZİLLENME……...…….……5

NİKOTİNAMİD ADENİN DİNÜKLEOTİT (NAD^+)……8

ADP-RİBOZİLLEYEN TOKSİNLER……...……10

SALMONELLA'NIN ADP-RİBOZİLLEYEN TOKSİNLERİ……...10

PROTEİN SENTEZİ ……..……13

PROTEİN SENTEZİNİ ENGELLEYEN FAKTÖRLER……....16

AKTİN POLİMERİZASYONU ……...……..18

GEREÇ VE YÖNTEMLER……..……...….....21

BULGULAR..……...…….24

TARTIŞMA……...……...……..34

SONUÇLAR……...……...…….36

ÖZET……..37

SUMMARY……...…….38

KAYNAKLAR……...……39

ŞEKİLLER LİSTESİ…...…….42

ÖZGEÇMİŞ……...……45

SİMGE VE KISALTMALAR

ADP : Adenozin Difosfat

ADPRT : ADP-Ribozilleyen Toksinler

Arg : Arjinin

ATP : Adenozin Trifosfat

ATRs : Mono-ADP Riboziltransferazlar

bARTTs : Bakteriyel ADP-Ribozilleyen Toksinler

CHARMM : Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics

CPU : Merkezi İşlem Ünitesi (Central Processing Unit)

CT : Kolera toksini

Cys : Sistein

DT : Difteri toksini

eIF : Ökaryotik İnisiasyon Faktörleri

FASTA : Nükleotidlerin veya Amino Asitlerin Tek Harfli Kodlar Kullanılarak Temsili Formatı

F-AKTİN	**:**	Filamentöz Aktin
FFT	**:**	Hızlı Fourier Dönüşümü (Fast Fourier Transform
G-AKTİN	**:**	Globüler Aktin
GDP	**:**	Guanozin Difosfat
GPU	**:**	Grafik İşleme Ünitesi (Graphics Processing Unit)
GTP	**:**	Guanozin Trifosfat
H	**:**	Hidrojen
K	**:**	Kelvin
kDa	**:**	Kilodalton
MD	**:**	Moleküler Dinamik
mRNA	**:**	Mesajcı Ribonükleik Asit (Messenger RNA)
NAD	**:**	Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NADH	**:**	Nikotinamit Adenin Dinükleotid Hidrit
NAMD	**:**	Moleküler Dinamik Programı (Not Another Molecular Dynamics Programme)
NMR	**:**	Nükleer Manyetik Rezonans
PARP	**:**	Poli-ADP Riboz Polimerazlar
PDB	**:**	Protein Veri Bankası (Protein Data Bank)
PT	**:**	Pertussis Toksin
RF	:	Ayırma faktörleri (Release Faktors)
RMSD	**:**	Etkin Değer Sapması (Root Mean Square Deviation)
SDU	**:**	Yarı Kesin programlamaya dayalı Eksik Tahmin (Semi-Definite programming based Underestimation)
SPI	**:**	Salmonella patojenite adası
tRNA	**:**	Taşıyıcı Ribonükleik Asit (Transfer RNA)

TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

T3SS : Tip 3 Salgılama Sistemi (Type Three Secretion System)

2GWL : SpvB toksini

3HBT : G-Aktin

GİRİŞ VE AMAÇ

Salmonella bakterisi, sistemik virülans ve hücre içi büyüme için SpvB proteininin ADP-riboziltransferaz aktivitesine gereksinim duyar. SpvB, aktini değiştirerek hücre iskeletinin bozulmasına ve apoptoza neden olur. ADP ribozilleyen toksinler (ADPRT), *Bordetella pertusis, Clostridium botulinum, Cornynebacterium diphtheriae, Vibrio Chlorea* ve diğerleri, bir dizi bakteriyel patojenin hastalığa sebep olmasında önemli bir rol oynar. Bakteriyel ADP-ribozilleyen toksinler (bARTTs), çok çeşitli konak proteinlerini hedef alır ki bu da hücre iskeletinin modülasyonundan hücre ölümüne kadar birçok sitotoksik etkiye neden olur. Bu toksinler iki ana grupta toplanır: (i) Difteri toksini (DT) benzeri grup: tek bir zincirde bulunan aktif (A) ve bağlayıcı (B) birimden oluşan toksinler (AB); (ii) Kolera toksini (CT) benzeri grup: tek bir A alt birimi ve ona kovalent olmayan bir şekilde bağlı beş tane pentamerik B alt biriminden oluşan toksinler (AB5). Yapılan birçok çalışmada SpvB'nin, geniş bir toksin ailesi olan mono-ADP riboziltransferazlar (ATRs) ile aktif bölge benzerliklerinin olduğu gösterilmiştir. SpvB de ATR'lerde olduğu gibi, nikotinamid adenin dinükleotitten (NAD) konakçı proteinlerine ADP-ribozu transfer eder (1). SpvB'nin, merkezi hücre iskeleti olan aktini ADP ribozillediği ve böylece polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (2). ADPRT'ler, NAD'ın nikotinamid ve ADP-riboz'a parçalanmasına sebep olan enzimleri katalize eder ve NAD'tan ayrılan ADP-riboz'un hedef proteine transferini sağlar. ADPRT'lerin

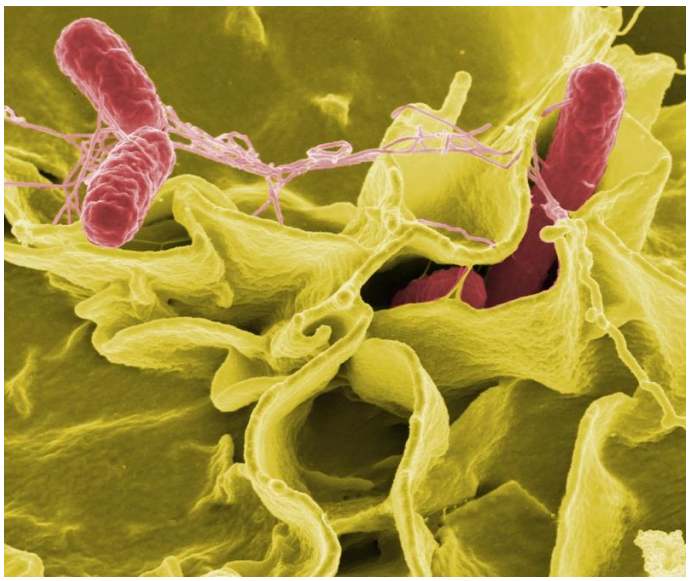
NAD molekülünü tanıdıkları ve böylece etkileşime girdikleri bilinse de bu iki motifin yapısal benzerlikleri, NAD etkileşimine katkı sağlayan etkenlerin ne olduğu ve farklı NAD yapılarını tanıyıp tanımadıkları noktasında araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmada, SpvB'nin katalitik bölgesinin kristal yapısını aktini ADP ribozillediğini, bunun da aktinin ATPaz aktivitesini durdurduğunu deneysel yöntemlerle elde edilen verileri kullanarak kuramsal yöntemlerle araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

TİFO

Tifo, halen birçok ülkede önemli oranda ölüm nedeni olan ve gelişmekte olan ülkelerde hala önemini koruyan endemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Salmonella enfeksiyonu ikinci en sık rapor edilen gıda kaynaklı hastalıktır. *Salmonella typhi* bakterisinin neden olduğu bu sistemik enfeksiyon hastalığı sadece insanlara özgüdür ve gastroenteritden tifo ateşine kadar çeşitli hastalıklara neden olur. Hastalık genellikle kontamine yiyeceklerden ve içme suyundan bulaşır ve el yıkamanın az olduğu yerlerde daha sık görülür. Başlıca belirtileri yüksek ateş ve sindirim sistemi problemleridir. Bazı insanlar herhangi bir belirti olmaksızın sadece bakteriyi taşır ve hastalığı başkalarına bulaştırabilir. Erken dönem tanılama ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Bakteri insanların bağırsaklarında ve kan dolaşım sisteminde konaklar ve yaşar. Enfekte olmuş kişinin dışkısına maruziyet ile insanlar arasında yayılır. Bakteri ağızdan girer ve bağırsakta 1ile 3 hafta bekler. Bu süreden sonra bağırsak yolu ile kan dolaşımına doğru ilerler. Bu yolla diğer doku ve organlara yayılır.

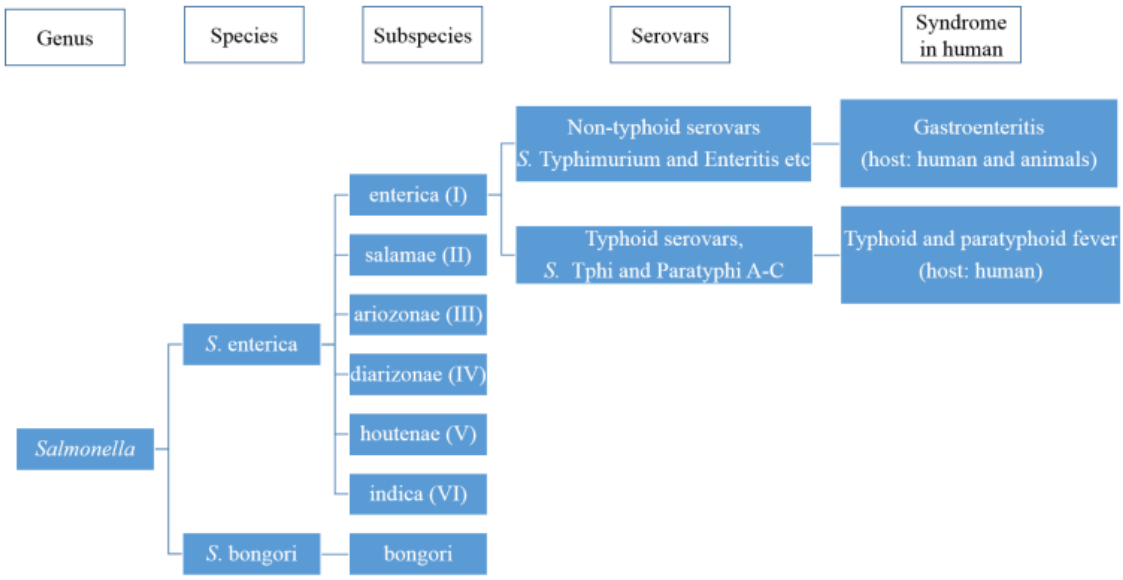
Her yıl yaklaşık 11-20 milyon insan tifo nedeniyle hastalanmakta ve dünya çapında 128.000 ile 161.000 arasında insan ölmektedir (3). Yoksul toplumlar ve çocuklar da dahil olmak üzere savunmasız gruplar en yüksek risk grubundadır.



Şekil 1. Salmonella (4)

Salmonella gram-negatif bir bakteri cinsidir ve türleri hücre içi patojenlerdir. Bu bakteri enfeksiyonu için genellikle antibiyotik tedavisi kullanılır. Fakat bakteri, bu tedaviye karşı hayatta kalmak için farklı stratejiler geliştirmektedir. Bu direnç, bakteriyel enfeksiyon tedavisini zorlaştırmaktadır. Sonuç olarak, bu patojenik hastalıkların tedavisi için daha çok araştırmaya gerek duyulmaktadır.

Salmonella en çeşitli patojenlerden biridir. *Enterica* ve *bongoria* olmak üzere yalnızca iki türü olmasına rağmen 2659 adet seroveri vardır. *Enterica* türü içinde toplam 6 alt tür yer almaktadır: (I) *enterica*, (II) *salamae*, (III) *arizonae*, (III) *diarizonae*, (IV) *houtenae* ve (VI) *indica* (Şekil 2). Hayvan ve insan klinik vakalarının çoğu *Samonella enterica* enfeksiyonundan kaynaklandığı için araştırma çalışmaları *S. Enterica* karakterizasyonu üzerine yoğunlaştırılmıştır.



Şekil 2. Salmonella türlerinin ve alt türlerinin sınıflandırılması (5)

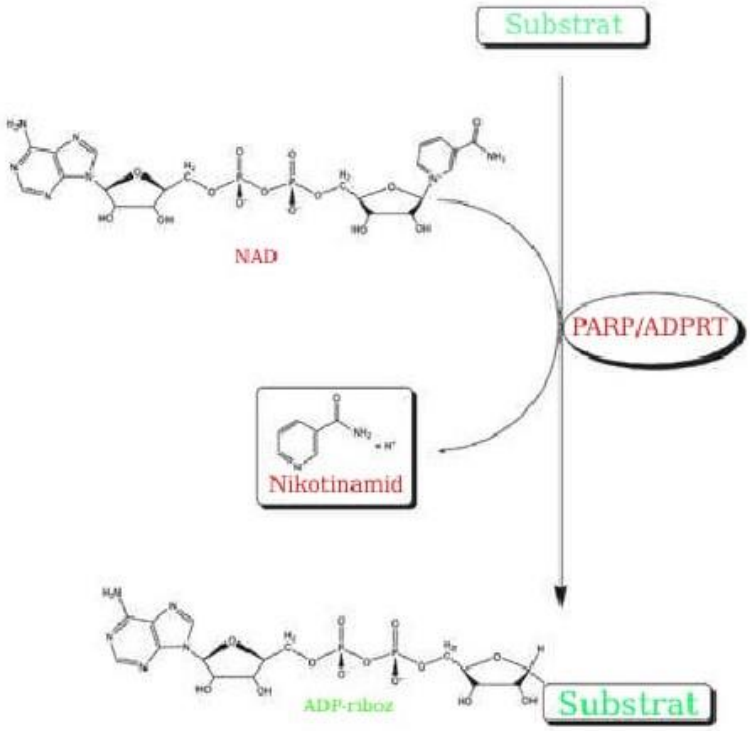
ADP -RİBOZİLLENME

1963 yılında Dr. Paul Mendel tarafından poli-ADP ribozun hücre çekirdeğinde bulunduğunun tespit edilmesinin ardından ADP ribozillenme mekanizması tanımlanmıştır. ADP-ribozillenme bakterilerde, hayvanlarda ve bitkilerde görülen bir reaksiyondur. ADP-ribozilleyen proteinler hücrelerin çekirdek ve mitokondri gibi önemli bölümlerinde bulunur, böylece bu mekanizma ile düzenlenen biyolojik işlevlerin çeşitliliği ortaya çıkmaktadır. ADP-ribozillenme reaksiyonlarının ökaryotik hücrelerde başlıca dört farklı fizyolojik olayla bağlantısı vardır (6):

1. Transdüser nitelikli bazı proteinlerin işleyişlerinde,
2. Protein biyosentezinde,
3. Hücre farklılaşmasının bazı aşamalarında,
4. DNA onarımının düzenlenmesinde.

ADP-ribozillenme, NAD'ın ADP riboz grubunun alıcı proteine aktarılmasını ve sonrasında riboz ve bir aminoasit arasında N- veya O- glikozit bağlarından birinin oluşması sürecini kapsar. Bu mekanizma, vücudumuz tarafından üretilen bir enzim olan poli ADP-riboz polimerazlar (PARP) ve ölümcül bir toksin ailesi olan ADP ribozilleyen toksinler tarafından (ADPRT) kullanılır. ADPRT'ler ve PARP'lar, nikotinamid adenin dinükleotit'i (NAD)

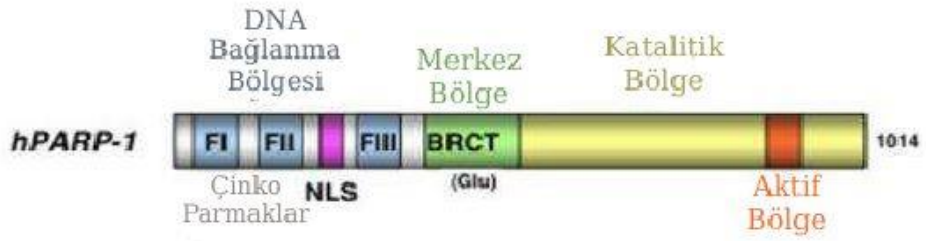
katalizleyen iki önemli gruptur. Bu moleküller aracılığıyla NAD nikotinamid ve ADP-riboz'a ayrılır ve ADP-riboz hedef proteine transfer edilir (7) (Şekil 3).



Şekil 3. ADP-riboz katalizleme mekanizması (8)

Çekirdeğe ait bir enzim olan Poli ADP-riboz polimeraz (PARP), ökaryot hücrelerde bol miktarda bulunur ve DNA hasarına cevap olarak aktifleşir. Aktifleşmiş PARP, ADP-riboz ünitelerini NAD^{+}'dan çekirdeğe ait bir proteine (histon, DNA polimeraz, DNA ligaz gibi) ya da kendisine transfer eder. Aşırı aktivasyon NAD^{+} ve ATP tüketimine, bu da hücrede fonksiyon bozukluklarına sebep olur. Bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucunda 18 tane PARP üyesi enzim tanımlanmıştır. PARP-1 enzimi bunlardan en bilineni ve en yaygın olanıdır. Çekirdekte lokalize olan PARP-1 üç ana bölgeden oluşur: DNA bağlanma bölgesi, merkez bölgesi ve katalitik bölge. DNA bağlanma bölgesi çinko-parmak motifleri içerir (Şekil 4). Çinko iyonlarına bağlanmış tekrar eden sistein ve histidin aminoasitlerinden oluşan bu bölgeler, ilmekli yapılar oluşturacak şekilde katlanarak DNA'ya bağlanırlar. Modifikasyondan sorumlu merkez bölgesi 16 kDa ağırlığındadır. Birçok ilaç geliştirme programı için hedef bölge olan

katalitik bölge ise 55 kDa ağırlığındadır ve karboksilik asit taşır (9). Ayrıca bu bölge NAD^+'dan ADP-riboz yapılarını protein akseptörlerine transfer eder. PARP-1 enziminin hücre içerisinde hayati birçok görevi vardır. DNA tamiri, apoptozis, hücre regülasyonu, hücre farklılaşması, transkripsiyonel regülasyon bunlardan bazılarıdır (10).



Şekil 4. PARP-1'i oluşturan ana bölgeler (11)

ADP-ribozillenme reaksiyonları, poli(ADP-ribozil)lenme ve mono(ADP-ribozil)lenme olmak üzere iki ayrı biçimde gerçekleşmektedir. Birinci tip reaksiyonlar çekirdeğe özgü iken ikincisi sitoplazmaya özgü reaksiyonlardır.

Poli(ADP-ribozil)lenme

Poli ADP riboz gelişmiş canlıların çekirdeklerinde bulunan bir polimerdir ve asidik gruplar üzerinden akseptör proteinlere bağlanır. Bu polimer yapı, poli ADP-riboz polimeraz adlı bir enzim tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu oluşur. DNA eşlenmesi, hücre farklılaşması, hücrelerde oluşan genetik değişiklikler ve DNA onarımı gibi mekanizmalarda bu reaksiyonun önemli bir katkısı olduğu bilinmektedir (12). Poli (ADP-ribozil)lenme tepkime mekanizması aşağıda gösterilmiştir:

$$\text{Akseptör} + n\ NAD + \rightarrow \text{Akseptör.(ADP-riboz)}\ n + n.\text{nikotinamid} + nH^+$$

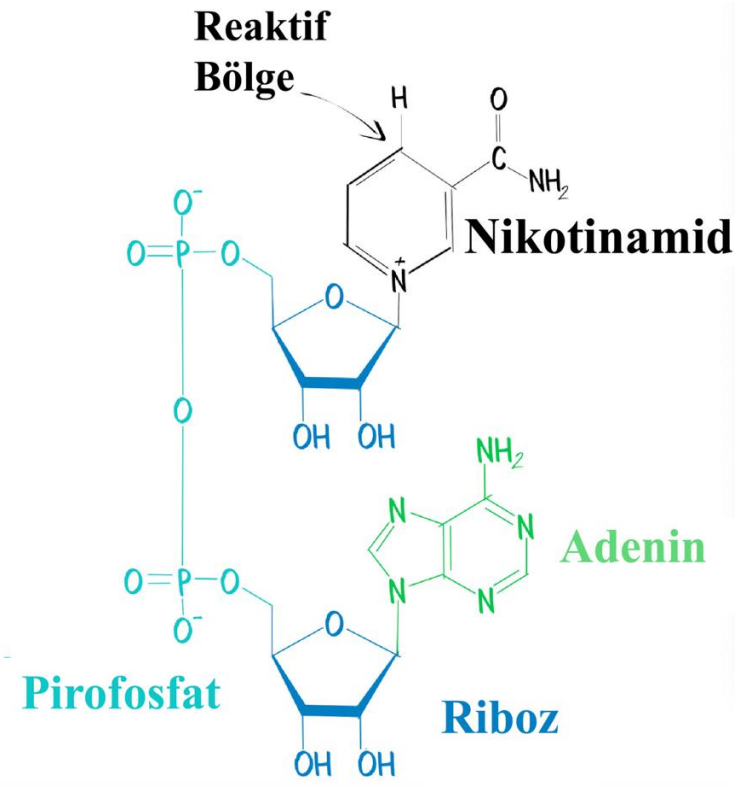
Mono (ADP-ribozil)lenme

Mono ADP-ribozillenme, NAD'ın ADP riboz grubunun bir akseptör protein veya aminoaside bağlanması reaksiyonudur. Mono ADP transferaz enzimi tarafından katalizlenen sentez sonrası bir modifikasyondur. Mono ADP transferaz enzimleri prokaryot ve ökaryot birçok organizmada bulunur. Bazı bakteri toksinleri, dokulardaki etkinliklerini hücresel proteinleri ADP ribozilleyerek göstermektedir. Mono ADP-ribozillenme tepkime mekanizması aşağıda gösterilmiştir:

$$\text{Akseptör} + \text{NAD} + \rightarrow \text{Akseptör.(ADP-riboz)} + \text{nikotinamid} + H^{+}$$

NİKOTİNAMİD ADENİN DİNÜKLEOTİT (NAD^{+})

Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^{+}), tüm canlı hücrelerde bulunan bir koenzimdir. Molekül formülü $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2^{+}$'dir. Molekül ağırlığı 664.4 g/mol'dür. Biri adenin bazlı diğeri nikotinamid bazlı iki nükleotidden oluşur. Elektron taşıyarak indirgenme potansiyelinin moleküller arasında aktarılmasında rol oynar. Hücreler NAD^{+}'yı niasin vitamininin bir türevi olan nikotinamidden sentezler. Nikotinamid, riboz ve ADP ile birleşip NAD^{+}'yı meydana getirir (Şekil 5).



Şekil 5. NAD^+ molekül yapısı (13)

Oksidasyon tepkimelerinde genellikle her elektron bir proton ile birlikte (bir hidrojen atomu halinde) yolculuk eder. Ancak bu hidrojen atomları doğrudan oksijene aktarılamazlar. Bu hidrojenler genellikle ilk olarak NAD^+' ya aktarılır. NAD^+ elektron taşıyıcısı olmaya çok uygundur; çünkü kolayca okside (NAD^+) ve redükte (NADH) hale dönüşebilir. Bir elektron akseptörü olan NAD^+, solunum sırasında oksitleyici ajan olarak işlev yapar. Bu süreçte NAD^+ bir elektron ve bir çift proton elde eder ve kendisi NADH'ye indirgenir ve bir proton da salınır.

$$MH_2 + NAD^+ \rightarrow NADH + H^+ + M: + \text{enerji} \quad (M: \text{Metabolit})$$

Okside formdaki NAD^+ pozitif yük taşıdığı halde, redükte formdaki NADH elektriksel olarak nötrdür. İki adet negatif yüklü elektrona karşılık sadece bir tane pozitif yüklü proton kazanan NAD^+ NADH'a redüklendiğinde, yükü nötralize olur. NAD^+ elektronları kabul ettiği için, bir elektron alıcısıdır. NAD^+ hücresel solunumdaki en temel elektron alıcısı olup, glukoz yıkımı sırasında birçok redoks basamağında görev alır.

Elektronlar glukozdan NAD^+'ya aktarıldıklarında, sahip oldukları potansiyel enerjinin çok azını kaybederler. Solunum sırasında oluşturulan her NADH molekülü, elektronların NADH'dan oksijene ulaşması tamamlandığında ATP üretmek üzere yakalanabilecek, depolanmış enerjiyi temsil eder. NADH'dan oksijene elektron aktarımı, -53 kcal/mol'lük serbest enerji değişimine sahip, ekzergonik bir tepkimedir. Bu enerji tek bir basamakta açığa çıkarılarak boşa harcanmaz. Elektronlar, son elektron alıcı olan ve elektronlara karşı çok büyük afinite gösteren oksijene ulaşana kadar, her basamakta az miktarda enerji kaybedecek şekilde, zincir boyunca bir molekülden diğerine akarlar. Zincirde bir altta bulunan taşıyıcı, kendisinden bir önceki komşusundan daha elektronegatif olduğundan okside etme kapasitesindedir. Zincirin en altında ise oksijen vardır. Dolayısıyla, NAD^+ tarafından glukozdan uzaklaştırılan elektronlar, elektron taşıma zincirindeki enerji gradiyentinin aşağısına doğru düşerek, elektronegatif oksijen atomu içindeki çok daha kararlı olan yerlerine ulaşırlar. Yani oksijen, elektronları enerji açığa çıkacak şekilde aşağı doğru çeker. Ekzergonik elektron düşüşü sırasında açığa çıkan bu enerji ise hücre tarafından, ATP üretmek üzere kullanılır.

ADP-RİBOZİLLEYEN TOKSİNLER

ADP ribozilleyen toksinler (ADPRT'ler), insan hedef proteinlerini işlevsiz hale getiren ve bakteriler tarafından salgılanan tehlikeli, büyük ve oldukça ölümcül bir toksin ailesidir. ADPRT ailesi, NAD'ın difteri toksinine (DT) ve kolera toksinine (CT) bağlanmasına göre iki gruba ayrılmıştır (14,15). DT toksinleri, ökaryotik elongasyon faktör 2'ye etki eder ve hücrenin protein sentezini bozar. DT, ekzotoksin A (ETA) ve koliks toksinleri bu grubun içinde yer alır. Ailenin diğer üyesi olan CT toksin grubu ise hücredeki çeşitli temel proteinleri hedef alır. Örneğin, kolera toksini G proteini üzerindeki Arg'yi hedefleyerek kontrolsüz adenilat siklaz stimülasyonuna neden olur; boğmaca toksini Gi üzerindeki Cys'yi hedefler ve aktin ayrışmasına neden olur; VIP2 ve iota toksinleri aktin üzerindeki Arg177'yi hedefler ve aktin polimerizasyonunu önler (16,17). Bu nedenle, ADPRT'ler ölümcül bakterilerin enfeksiyon tedavilerinde ilaç hedefi görevi görür (18,19).

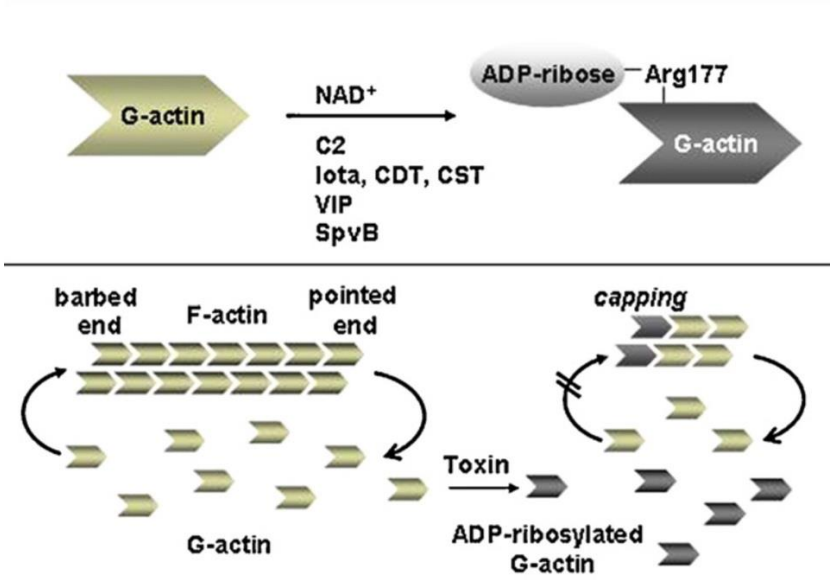
SALMONELLA'NIN ADP-RİBOZİLLEYEN TOKSİNLERİ

Salmonella enfeksiyonu geleneksel olarak toksin aracılı bir enfeksiyon olarak kabul edilmese de, bazı Salmonella suşları, konakçılarında patogenezi teşvik için bakteriyel ADP-ribozilleyen toksinleri (bARTT'ler) kullanır (Tablo 1). Salmonella tarafından kodlanan bu toksinlerin en iyi bilineni olan SpvB, aktin monomerlerini ADP riboziller ve polimerleşmesini

engeller (20). Üç yeni bARTT'lerden olan tifo toksini, ArtAB ve Sbo/SeoC yakın zamanda keşfedilmiştir. İlginç bir şekilde, *Salmonella Typhi* tarafından üretilen tifo toksininin, bir fare modelinde tifo ateşinin birçok klinik belirtisini gösterdiği bildirilmiştir (21). Bununla birlikte nontifoidal ve paratifoidal seroverlerinin büyük bir kısmının genomik karakterizasyonları, bu toksinin çoğu insanda tifo benzeri hastalığa neden olmayan birçok farklı serovarda varlığını ortaya çıkardı, bu da tifo toksininin muhtemelen virülansa katkıda bulunduğu fakat tifo ateşinin tek sebebi olmadığını düşündürmüştür.

Salmonella türleri, efektörleri konak hücrelere salgılamak için Salmonella patojenite adası (SPI) 1 içinde kodlanmış bir T3SS (Type Three Secretion System- Tip 3 Salgılam Sistemi) kullanır, bu da zarın büzüşmesine ve Salmonella'nın hücre içine alınmasına neden olur (22). T3SS bir protein eklentisidir ve patojenik bakterilerde iğne benzeri bu yapı ökaryotik organizmaların varlığını tespit etmek ve bakterilerin onları enfekte etmesine yardımcı olan proteinleri salgılamak için duyusal bir sonda olarak kullanılır. Bakteri bir konakçı hücreye girdikten sonra, SPI-2 genlerinin aktivasyonu, Salmonella'nın hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlar. SPI-2 daha sonra sistemik enfeksiyona dahil olur ve bakterilerin konakçı hücrelerinde replikatif bir niş (Salmonella içeren vakuol veya SCV) oluşturmasına ve bağırsağın ötesindeki dokulara kolonize olmasına izin verir.

SpvB, 591 aminoasit uzunluğunda bir proteindir. SpvB'nin C-terminal bölgesi, bir aktin ADP-ribozile edici toksin olan *Bacillus cerues* VIP2'ye yaklaşık %19 dizi özdeşliği gösterir SpvB'nin bir ADP-riboziltransferaz olarak işlev gördüğü ve substratının aktin olduğu tanımlanmıştır (Şekil 6)(2).



Şekil 6. SpvB aracılı aktin hücre iskeleti dinamikleri (23)

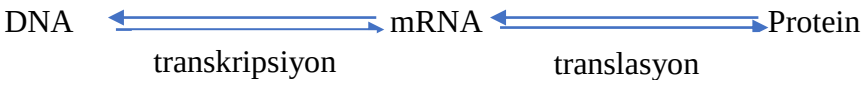
Tablo 1. Salmonella türlerinde bakteriyel ADP-ribozile edici toksinlerin (bARTT'ler) mevcut anlayışı (24)

bARTT	Konak Hücre Hedefleri	Bilinen Homolog Yapılar	Patogeneze Bilinen Katkısı
ArtAB	Gαi2 ve Gαi3	PtxA (*B. pertussis*) PltA (*S. enterica*)	– İnsülinemi – Yeni doğan farelerde ölüm
PltA (tifo toksini)	Bilinmiyor	PtxA (*B. pertussis*) ArtA (*Salmonella spp.*)	Bilinmiyor
SboC/SeoC	Src kinaz rezidü Glu310, Csk kinaz rezidü Glu236	EspJ (*E. coli* ve *C. rodentium*)	Bilinmiyor
SpvB	Aktin monomer rezidü Arg177	–	– Bağırsak bağ dokusunda (lamina propia) kolonizasyon – Kolit geliştirme

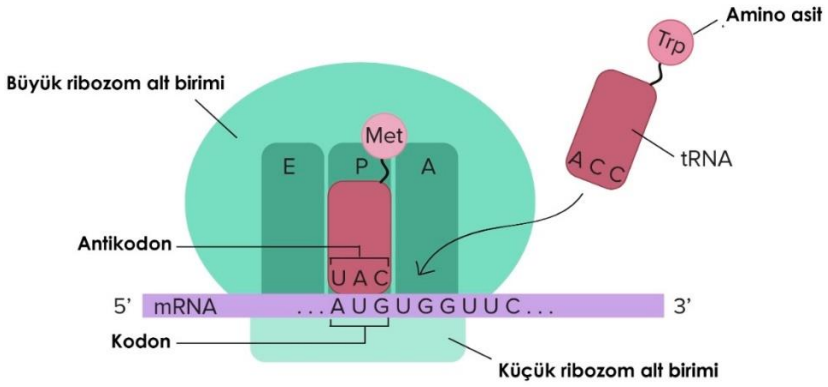
PROTEİN SENTEZİ

Proteinler, aminoasitlerin peptid bağı adı verilen kovalent bağlarla birbirine zincir şeklinde bağlanması ile oluşan polimerlerdir. Polimerler, çok sayıda küçük yapı taşı molekülün birbirine bağlanması ile oluşur. Bir makro molekül ailesi olan proteinler, tek bir hücrenin birbirinden farklı fonksiyonlarını yerine getirmesi için özelleşmiş yapılardır. İnsan vücudunun %15'i proteinlerden meydana gelir. Proteinlerin önemli işlevlerinden bazıları şunlardır: katalizör olarak, taşıyıcı olarak, hareket elemanı olarak, yapı elemanı olarak, bağışıklık maddeleri olarak, reseptör olarak, büyüme faktörü olarak. Bu özelliklerinden dolayı protein kelimesinin eski Yunancada köken aldığı proteios "birincil sırada olan" kelimesiyle de oldukça uyumlu görünmektedir. Proteinlerin tamamı 20 farklı aminoasitten oluşur. Bu moleküller, sahip oldukları spesifik kimyasal gruplar nedeniyle, yer aldıkları proteinlerin yapılarında ve fonksiyonlarında farklı roller üstlenirler (25).

Gen, DNA üzerinde kalıtsal bilginin korunduğu birimdir. Bu birimleri nükleotit dizileri oluşturur. Özgül proteinlerin yapımı için gerekli bilgileri sağlayan genlerdir. Fakat bir gen doğrudan bir proteini yapmaz. RNA, DNA ve protein sentezi arasındaki köprüdür. Bilginin DNA'dan proteine aktarılması **transkripsiyon** ve **translasyon** evreleri ile gerçekleşir. (Santral dogma).



Transkripsiyon, DNA kalıbından RNA sentezidir ve hücre içi bilgi akışının ilk basamağıdır. Oluşan RNA molekülü, genetik bilgiyi DNA'dan hücrenin protein sentez makinesi olan ribozomlara taşır. Bu nedenle de messenger RNA (mRNA) olarak adlandırılır. Yani mRNA, proteindeki aminoasit sırasını belirleyen genetik şifreyi içerir. Translasyon, mRNA'daki bilgilerin okunarak proteindeki aminoasit bilgisine dönüştürülmesi sürecidir. Hücrenin protein sentezinden sorumlu bir makromolekül olan ribozomlar, aminoasitleri sırasıyla birbirine bağlar ve böylece aminoasitler polipeptid zincirleri haline gelir. Translasyona uğrayacak tüm mRNA molekülleri 5'→ 3' yönünde okunur ve polipeptit zincirleri amino terminalden karboksi terminaline doğru sentezlenir (Şekil 7).



Şekil 7. Translasyon esnasında ribozom kompleksinin hareket yönü (26)

mRNA'yı oluşturan nükleotid dizisinde her üç bazlık dizi kodon olarak adlandırılır. Her amino asit için en az bir tane kodon vardır. Bazı kodonlar aynı amino asiti kodlar (Örneğin: GGU, GGC, GGA, GGG – Glisin) .Translasyon esnasında 20 aminoasidin her biri mRNA üzerindeki bu kodonlara göre sıraya dizilir ve her aminoasit için de adaptör görevi yapan bir tRNA molekülü vardır. Translasyon genel olarak başlama, uzama ve sonlanma şeklinde üç bölüme ayrılır:

Translasyonun Başlaması

Translasyonun başlama evresi, ilk olarak mRNA ve zincirin ilk aminoasitini taşyan tRNA' yı bir araya getirir. Daha sonra ribozomun iki alt birimi bir araya gelir. Ökaryotlarda translasyon, mRNA'nın 5' uç bölgesinden başlar. Bazı bakteriler istisna olmakla birlikte prokaryot ve ökaryot hücrelerin her ikisinde de translasyon genellikle AUG kodonu ile kodlanan metiyonin aminoasiti ile başlar. Yalnız bakteri mitokondri ve kloroplastlarında başlama kodonu olarak kullanılan metiyonin, modifiye olmuş N-formil metiyonin şeklindedir. Aminoasitler, mRNA molekülü üzerinde bulunan kodonları tanıyamazlar ve kodonları ancak tRNA molekülleri tanır. Bir RNA türü olan taşıyıcı tRNA, amino asitler için adaptör görevi yapar. Her amino asit için en az bir tane tRNA vardır ve üzerinde antikodon denilen, mRNA'daki kodonları tamamlayan üç bazlık nükleotit dizileri bulunur. Bu nedenle, aminoasitlerin öncelikle tRNA'ya bağlanması ve daha sonra birlikte ribozomlara taşınması gerekir. tRNA moleküllerine amino asitleri tanıma özelliğini aminoaçil tRNA sentetaz enzimleri sağlar. Bu enzimler, her bir aminoasit taşıyan tRNA molekülü için özeldir. Doğada

bulunan 20 çeşit aminoasit için 20 çeşit de aminoaçil tRNA sentetaz enzimi vardır (27). Ökaryotlarda translasyon işleminin başlaması prokaryotlara nazaran daha karmaşıktır ve her biri çok sayıda polipeptit zinciri içeren en az 9 tane protein gerektirir. Bu proteinlere başlama faktörleri adı verilir. mRNA, başlatıcı tRNA ve ribozom küçük alt biriminin birleşmesi; bu oluşuma büyük ribozomal alt birimin bağlanmasıyla translasyon başlama kompleksinin oluşması, başlama faktörleri sayesinde gerçekleşir. Bu esnada hücre, başlama kompleksini oluşturmak için GTP molekülünün hidrolizinden enerji sağlar.

Translasyonun Uzaması

Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerdeki elongasyon mekanizması birbirine çok benzemektedir. Başlama olayı tamamlandığında ribozomun büyük alt ünitesinde bulunan P (Peptit) bölgesine metiyonin taşıyan tRNA molekülü yerleşir ve mRNA üzerindeki ilk kodon olan AUG ile eşleşmiş durumdadır. Bu esnada ribozomun boş olan A (Aminoasit bağlanma bölgesi) bölgesi bir sonraki amino açil tRNA'nın bağlanması için hazırdır. İkinci kodona karşılık gelecek glisin taşıyan aminoaçil-tRNA, elongasyon faktörü EF-Tu ve GTP kompleksine bağlanır. Glisin taşıyan uygun aminoaçil-tRNA, ribozomun A bölgesinde kodonla kompleks yapınca GTP, GDP'ye hidroliz olur ve GDP'ya bağlı elongasyon faktörü serbest bırakılır. Böylece bu basamakta yüksek enerjili GTP'nin harcanması protein sentezinin devamını sağlar. Elongasyonun (uzama) devam etmesi için ribozomdan ayrılmış olan EF-T bağlı GDP'nin tekrar GTP haline dönmesi gerekmektedir. Translokasyon esnasında ribozom, aminoasitleri polipeptit zincirine ekler ve mRNA üzerinde bir kodon ilerler. Bu hareket esnasında ribozomun A bölgesinde bulunan peptidil tRNA P bölgesinden E bölgesine geçer. Bu durumda ribozomun A bölgesi diğer aminoaçil-tRNA'nın bağlanması için hazır hale gelmiş olur. Yeni bir aminoasit tRNA'nın A bölgesine bağlanması yüksüz tRNA'nın E bölgesinden ayrılmasını tetikler. Bu yüksüz tRNA polipeptit zincirine ilave etmek üzere diğer bir amino asidi bağlamaya hazır hale gelir.

Translasyonun Sonlanması

Polipeptit zincir uzaması stop kodonuna kadar devam eder ve ribozomun A bölgesinde kesilir. Hücreler bu terminasyon sinyallerine komplementer antikodon taşıyan tRNA'lar içermezler, bunun yerine sinyalleri tanıyan ve protein sentezini sona erdiren ayırma faktörlerine (Release Faktors=RF) sahiptirler. Prokaryotik hücreler iki ayırma faktörüne sahiptir. Ökaryotik hücreler her üç sonlandırıcı kodonu tanıyan tek bir ayırıcı faktöre (eRF) sahiptirler. Ayırıcı

faktörler A bölgesinde sonlandırıcı kodona bağlanırlar ve P bölgesindeki tRNA ile polipeptit zinciri arasındaki bağın hidrolizini stimüle ederek polipeptit zincirinin ribozomdan tamamen ayrılmasını sağlarlar. Daha sonra tRNA serbest bırakılır ve ribozomal alt üniteler ve mRNA kalıbı birbirinden ayrılır. Bu ayrılma sonucunda protein sentezi sonlandırılır.

PROTEİN SENTEZİNİ ENGELLEYEN FAKTÖRLER

Protein biyosentezi, hücrelerin işlevlerini sürdürebilmeleri ve çeşitli biyolojik faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri için hayati öneme sahip proteinlerin sentezlenmesi için gereken biyokimyasal bir süreçtir. Proteinler, hücrelerin büyümesi, bölünmesi, doku gelişimi, hücre farklılaşması ve çeşitli biyolojik süreçlerdeki yanıtları düzenlemede kilit rol oynar. Ayrıca, biyokimyasal reaksiyonları düzenleyen enzimler, hücre iskeletini oluşturan yapı elemanları (aktin gibi), hücresel iletişim ve sinyalleşmeyi sağlayan yapılar proteinlerden oluşur.

Protein sentezinin engellenmesi (inhibe edilmesi), sentezlenen proteinin türüne ve hücre döngüsünün aşamasına (transkripsiyon veya translasyon) bağlı olarak, hücrelerde önemli etkileri olan bir durumdur. Bu etkilerden bazıları şunlardır:

1. Protein Eksikliği: Hücrelerin ihtiyaç duyduğu proteinlerin üretimi azalır veya tamamen durur. Bu durum, hücrelerin normal işlevlerini yerine getirmesini engelleyebilir. Özellikle enzim eksikliği nedeniyle metabolik reaksiyonlar yavaşlar veya gerçekleşmez, yapısal proteinlerin eksikliği nedeniyle hücrelerin yapısı bozulur.
2. Hücresel Yanıt Değişiklikleri: Protein sentezinin engellenmesi, hücrelerin çevresel koşullara ve uyarılara yanıt verme kapasitesini azaltır. Hücrelerin stres, enfeksiyon veya doku hasarı gibi uyarılara verdiği tepkiler kısıtlanır. Bu durum, hücrelerin normal fonksiyonlarını yerine getirememesine ve homeostazın bozulmasına yol açabilir.
3. Hücre ölümü: Hücrelerde apoptozis olarak adlandırılan programlanmış hücre ölümü mekanizmaları tetiklenebilir. Bunun sonucunda, hücreler normal yaşam döngüsünü takip edemez ve hücre ölümü gerçekleşir. Apoptozis, hücrelerin zararlı veya gereksiz olduğu durumlarda programlı olarak ölmesini sağlayarak dokunun sağlığını ve homeostazını korur.
4. Büyüme ve Gelişme Sorunları: Protein sentezi hücre büyümesi ve gelişmesi için kritik öneme sahiptir. Protein sentezinin engellenmesi, hücre büyümesi ve bölünmesinin

bozulmasına ve doku gelişimi süreçlerinde sorunlara yol açabilir. Bu durum, hücrelerin normal olarak büyüyüp farklılaşamamasına ve yapısal düzensizliklere neden olur.

5. Hastalık Durumları: Genetik mutasyonlar veya protein sentezini inhibe eden faktörler, kalıtsal hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Ayrıca, kanser hücrelerinde protein sentezi düzensizliği, hücre proliferasyonunu kontrol eden mekanizmaların bozulmasına ve kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Bunun yanında, protein sentezinin inhibe edilmesi, kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemek için bir hedef olabilir. Protein sentezini hedef alan bazı kemoterapi ilaçları, ribozomlarda veya translasyon faktörlerinde etkili olabilir ve kanser hücrelerinin büyümesini baskılayabilir (28).

Protein sentezini engelleyen faktörler, hücredeki gen ifadesini ve translasyon sürecini etkileyerek protein sentezini azaltan veya durduran etmenlerdir. Bu faktörler genellikle karmaşık bir düzenleyici ağa bağlıdır. Protein sentezini inhibe eden bazı faktörler şunlardır:

1. Transkripsiyonel Kontrol: Gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır. Hücreler, belirli genlerin aktif olarak transkribe edilmesini veya baskılanmasını sağlamak için transkripsiyonel kontrol mekanizmalarını kullanır. Transkripsiyon faktörleri, DNA üzerinde belirli hedef bölgelere bağlanarak gen ifadesini düzenler. Aktivatörler ve repressörler olarak adlandırılan iki ana tip transkripsiyon faktörü vardır. Aktivatörler, transkripsiyonu artırarak gen ifadesini teşvik ederken, repressörler transkripsiyonu inhibe ederek gen ifadesini baskılar. Bu faktörler, hücre içi veya dışındaki sinyallere yanıt olarak etkinleşebilir ve spesifik genlerin transkripsiyonunu etkileyebilir. Transkripsiyonel kontrol, genin promotor bölgesinde gerçekleşir. Bir genin transkripsiyonunu başlatmak için RNA polimeraz enziminin bağlandığı DNA dizisine promotor denir. Ayrıca epigenetik değişiklikler gen ifadesini düzenler ve protein sentezini etkileyebilir. Metilasyon, DNA'nın baz dizilimine metil gruplarının eklenmesidir. Gen promotor bölgelerindeki metilasyon, gen ifadesini baskılayabilir. Bu metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engeller ve böylece protein sentezi inhibe edilir.
2. Translasyonel Kontrol: Bu mekanizma, transkripsiyon sonrası bir süreç olan translasyon aşamasında gerçekleşir. Translasyonel kontrol, transkripsiyonda elde edilen mRNA moleküllerinin ribozomlar tarafından ne zaman ve ne miktarda translasyona uğrayacağını belirleyen düzenlemeleri içerir. Bu düzenlemeler, translasyon faktörleri,

transfer RNA (tRNA) konsantrasyonu, ribozom bağlama ve hücresel enerji kaynakları gibi faktörler aracılığıyla gerçekleştirilir (29).

3. Post-Translasyonel Kontrol: Protein sentezinden sonra, proteinlerin işlevi ve stabilitesi post-translasyonel düzenlemelere tabi tutulur. Fosforilasyon, glikolizasyon, proteoliz gibi post translasyonel modifikasyonlar, proteinlerin işlevini, hücresel etkileşimleri değiştirir.
4. mRNA Parçalanması: mRNA moleküllerinin kararlılığı, protein sentezinin sürekliliği için önemlidir. mRNA parçalanması, protein sentezini engelleyen bir translasyonel kontrol mekanizmasıdır. Bu moleküller, ribozomlar tarafından hızla sentezlendikten sonra hücre içerisinde çeşitli enzimatik aktivitelerle parçalanabilir. Böylece mRNA parçalanması protein sentezini inhibe edebilir.
5. Hücresel Sinyal Yolları: Protein sentezini etkileyen bir diğer faktör de hücresel sinyal yollarıdır. Hücre içerisindeki çeşitli sinyal molekülleri, hücre içine giren veya hücre yüzeyine bağlanan reseptörlere bağlanarak protein sentezini düzenler. Örneğin, büyüme faktörleri veya stres yanıtları, hücre içerisinde belirli proteinlerin sentezini uyarabilir veya engelleyebilir.

AKTİN POLİMERİZASYONU

Ökaryotik hücrelerin hareketlerini yönlendirip koordine etmeleri, değişik şekillere uyum sağlamaları protein yapıdaki filamentlerden oluşan ağ yapısı sayesinde gerçekleşir. Bu ağ yapısına hücre iskeleti (Cytoskeleton) denir. Bakterilerde bu yapı bulunmaz. Oldukça dinamik olan bu yapı, hücrenin şekil değişikliklerine, bölünmesine ve çevreden gelen uyaranlara cevap vermesine yardımcı olur. Hücre iskeletini 3 tip filament yapı meydana getirir:

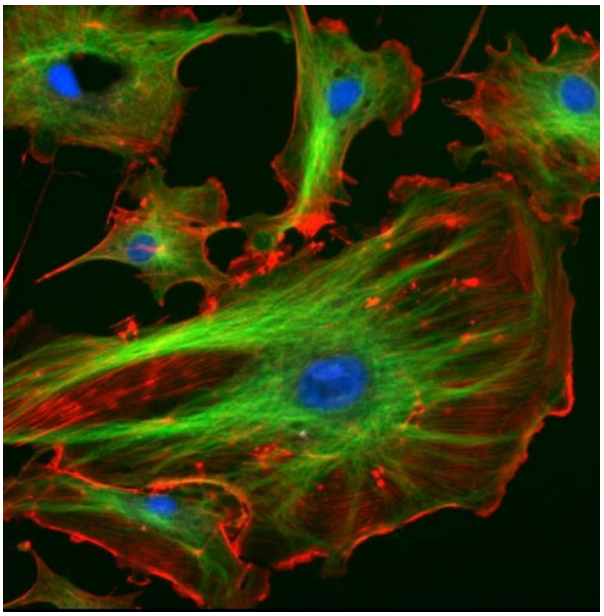
-Mikrotübüller

-İntermediate filamentler

-Mikrofilamentler (Aktin filamentler)

Bütün ökaryotik canlı türleri aktin içerir. Mikrotübüllerin sıkıştırılmaya karşı dayanıklıyken, mikroflamentlerin yapısal rolü gerilmeye (çekme güçlerine) dayanmaktır. Yapısal bir protein olan aktin yuvarlak şekillidir ve toplam hücre proteinlerinin yaklaşık %5‘lik

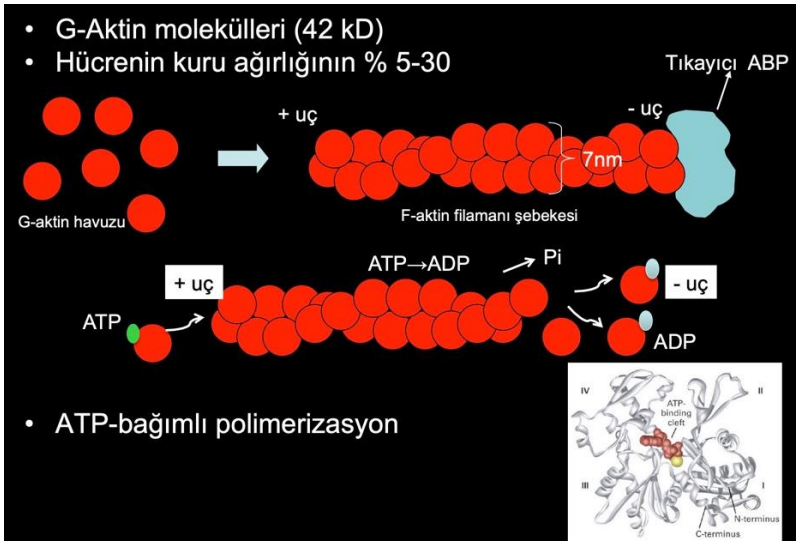
kısmını oluşturur. Hücreyi boydan boya sararak mekanik destek sağlar. Aynı zamanda hücrenin şeklini belirler ve hareket etmesine olanak sağlar. 375 amino asit uzunluğunda bir polipeptit olan her bir aktin genellikle ATP'ye bağlı olarak bulunur. Aktin proteini polimerleşerek aktin flamentlerini oluşturur. Bu yapılar 7 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğunda ince esnek liflerdir. Hücre içerisinde bu flamentler diğer proteinlerle birlikte üç boyutlu ağ yapısı oluşturacak biçimde düzenlenmiştir. Bu yapılanma sayesinde aktin flamentleri, hücre şeklinin belirlenmesinde, hücre yüzey hareketlerinin gerçekleşmesinde, partikül alınması ve bölünmesinde önemli rol oynar. Aynı zamanda bu ağsı yapı sitoplazmanın dış tabakasına (korteks) jöle gibi yarı katı bir kıvam kazandırır.



Şekil 8. DAPI yöntemiyle boyanmış aktin iskeleti (30)

Aktin ilk olarak 1942 yılında kas hücrelerinden izole edilmiştir. Başlangıçta yalnızca kas hücrelerinde kas kasılması ile ilgili olduğu düşünülse de günümüzde, tüm ökaryotik hücrelerde olduğu tespit edilmiştir. Her aktin monomerinin (globüler [G] aktin), iki monomer arasındaki baş kuyruk etkileşimlerini düzenleyen sıkı bağlantı bölgeleri vardır. Böylece aktin monomerleri ATP varlığında F-aktin'e (filamentöz [F] aktin) polimerize olur. F-Aktin 6,7 nm kalınlığında fibril bir yapıdır. Aktin monomerlerinin birleşerek F-aktinleri oluşturması basamaklı bir olaydır. Üç aktin monomerinin birleşerek oligamer (nucleus) oluşturması aktin

polimerleşmesinin ilk basamağıdır. Bu basamak nükleasyon olarak isimlendirilir. Bu basamaktan sonra üçlü yapılara her iki uçtan G-aktin hızlıca bağlanır. Monomerlerin her iki uçtan ters olarak eklenmesiyle aktin filamanları büyür ancak artı uç eksi uca göre daha hızlı uzar (5-10 kat), yani uzama pozitif uçtan gerçekleşir. Uçların farklı hızda uzamasının sebebi, filamentin yapısal kutuplara sahip olmasıdır. Bu kutuplaşma sayesinde filamentin iki ucu farklı polimerleşme eyilimi gösterir. Aktin monomerleri ATP'ye bağlanır ve ATP-filamen yapılanmasını takiben ADP'ye hidrolize olur (Şekil 9). Bu polimerleşme geri dönüşümlüdür; yani filamanlar aktin alt birimlerinin ayrılması ile depolimerize olur. Böylece gerektiğinde aktin flamanlarının yıkımı sağlanır. Bu da aktin monomerleri ve filamanları arasındaki dengeyi korur (31).



Şekil 9. Aktin polimerizasyonu (32)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Tez çalışması öncelikle Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmalar için kullanılacak tifo hastalığının motif dosyaları (PDB dosyaları) araştırmacılarının kullanımına açık olan Protein Data Bank in Europe, Protein Data Bank Japan ve Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank protein veri bankalarından elde edilmiştir. SpvB toksini PDB formatında protein veri bankasından indirilmiş, bu tez için kullanılmıştır. Kuramsal çalışmalar Anabilim Dalımızda bulunan 16 çekirdekli iş istasyonun yanı sıra TÜBİTAK bünyesinde mevcut bulunan ulusal bilgi ağı TR-DATA grid süper bilgisayarları (HP-Z820 Workstation) kullanılarak yapılmıştır. Çalışma için NADH'ın motif dosyası PubChem veri tabanından alınarak üç boyutlu yapısal motifler kullanılmıştır. Çalışmamızda moleküler demirleme (docking) işlemi Autodock programı kullanılarak yapılmış, gerekli görüntü analizleri ve hizalamalar VMD (Visual Molecular Dynamic) ve enerji minimasyon hesaplamaları NAMD kullanılarak yapılmıştır.

KULLANILAN PROGRAMLAR

Visual Studio 2017 (Microsoft)

Linux (Pardus Dağıtımı)

Visual Studio Code 1.41 for Ubuntu (Microsoft)

Pymol for evaluation (Schrodinger)

Jmol

Autodock Vina 4.2.6

Pyhton for Linux 3.x

Python for Windows

Visual Molecular Dynamic 1.9.3 (Illinois University)

NAMD 2.13 (Illinois University)

Discovery Studio 4.0 (BIOVIA)

Chimera 1.14 (California University)

PIPER Docking (Boston University)

FlexX

YÖNTEMLER

Kuramsal Çalışmalar

Çalışmamızda kullandığımız, ADPRT grubundan olan SpvB toksininin motif dosyası protein veri bankalarından bulundu. Toksinin X-ışını kristalografisi ve NMR deneysel veri sonuçlarına ulaşıldı. Daha önceden modellenmiş bulunan 2GWL'nin veri dosyası doğrulamak amacı ile ilgili veri dosyası MODELLER algoritması kullanılarak kuramsal yollarla elde edilerek karşılaştırıldı. Katlanma yüzey yapıları PyMol programı kullanılarak görüntülendi. Ortak bölgelerin araştırılması işlemi, en düşük RMSD (root mean square deviation) kullanılarak yapıldı. Aktin ile NADH arasındaki bağlayıcı etkileşimlerin tespitinde moleküler dinamik (MD) simülasyonları kullanıldı. Gerekli motiflerin analizi için 300 K ortalama sıcaklık ve pH 7 altında CHARMM ve NAMD programları ile gerçekleştirildi. Hesaplama işlemlerinin bir kısmı, ulusal bilgi ağı üzerinde TR-GRID sunucusuna yüklenilen algoritma tarafından hesaplandı. Protein demirleme (protein docking) çalışmaları Autodock ve FlexX gibi programlar kullanılarak yapıldı. Bunun dışında Boston Üniversitesi'nin Yapısal Biyoinformatik Laboratuarlarında protein-protein demirleme (docking) sisteminde yüklü

bulunan ClusPro 2.0'da simülasyon ağında daha önceden motifleri belirlenen proteinler ya da peptitler etkileşime sokuldu. ClusPro, Fast Fourier Transform (FFT) korelasyon yaklaşımı temelli sabit bir protein demirleme (docking) programıdır ve çift mantıklı etkileşim potansiyellerini kullanacak şekilde genişletilmiştir. Bu programda olası etkileşimlerde kullanılmak üzere en iyi 1000 enerji konformasyonu kümelenmiştir. İlk olarak, etkileşim bölgelerini keşfetmek için basitleştirilmiş enerji modeli ile kısıtlı esneklik kuramı kullanılır, enerji sahası geniş çapta araştırılır. Tespit edilen alanlara odaklanmak için ayrıntılı skorlama (scoring) ve örnekleme (sampling) kullanılır. Alınan yapıların, uzaklık ölçümü için çift mantıklı RMSD kullanılarak kümelenmesi algoritmanın ikinci basamağıdır. Bu işlemin biyofiziksel anlamı, enerji sahasının yüklü enerji havzalarını izole etmektir. Bu programda sırasıyla aşağıdaki teknikler kullanılmıştır:

-PIPER'a uygulanan çift mantıklı potansiyelleriyle demirleme metodu olan Fast Fourier Transform (FFT),

-Moleküler tanıma potansiyelleri için referans durumları üretmek için DARS (Decoys as the Reference State),

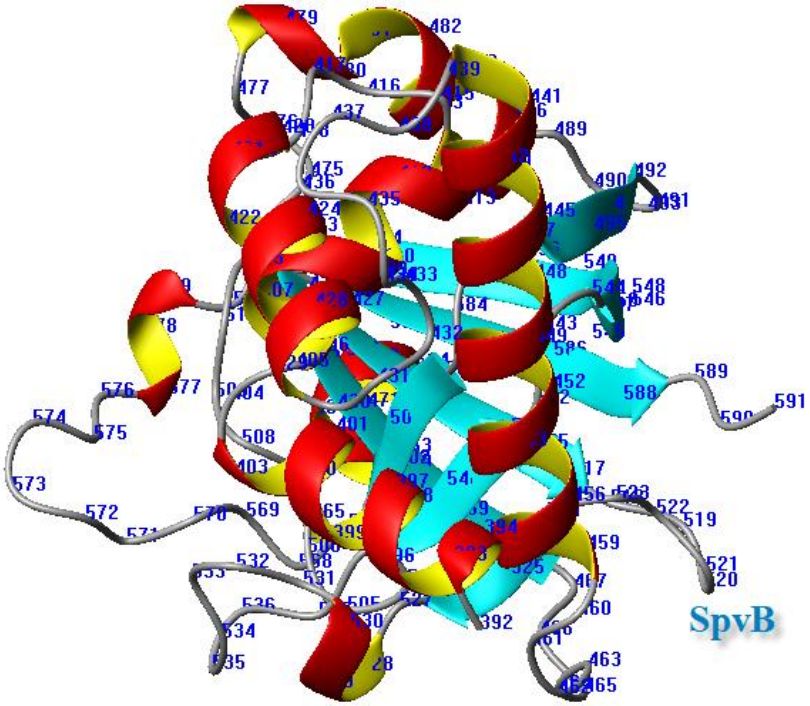
-Olası konformasyonların keşfi için bir kümeleme tekniği olan Semi-Definite programming based Underestimation (SDU), serbest enerji stabilitesini analiz ederek yerel olmayan kümeleri ortadan kaldırmak ve enerji optimazyonunu sağlamak için kullanıldı.

BULGULAR

KURAMSAL ÇALIŞMALAR

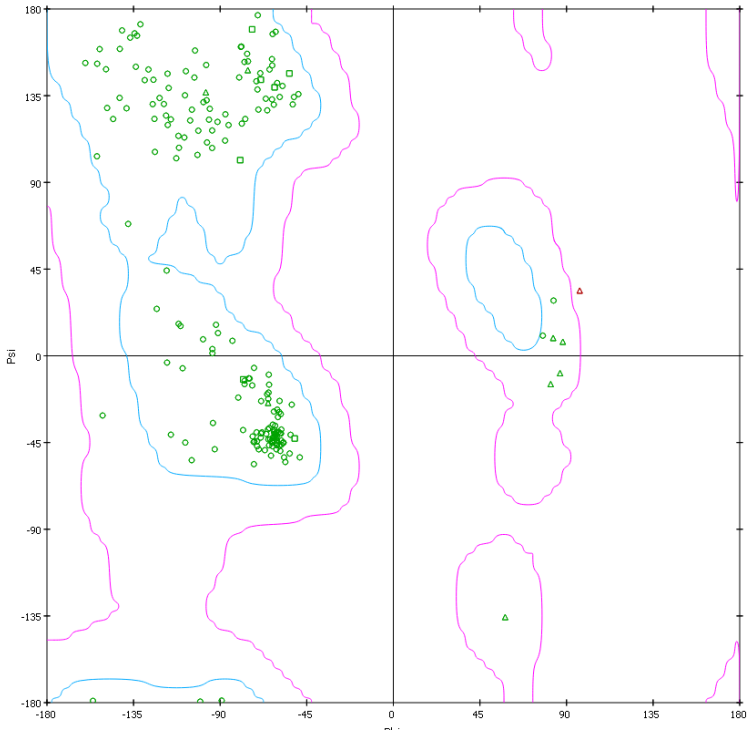
PDB Dosyalarının Eldesi

Çalışmamız kapsamında kullanılacak olan insan ve farklı türlere ait ADPRT'lere ait olan veri dosyaları (PDB dosyaları), RCSB Protein Data Bank (http://www.pdb.org) ve The European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk) veri bankları kullanılarak elde edildi. Bu dosyalara ait motiflerin en olası konformasyonlarını bulabilmek için motifler nano saniye düzeylerinde su atomları ile etkileşime sokuldu ve gerekli esneklik hesaplamaları yapıldı. TUBİTAK bünyesinde bulunan TR-Data Grid bilgisayar sistemleri bu etkileşimleri gözleyebileceğimiz simülasyon analizleri için kullanıldı. Veri bankasında mevcut bulan SpvB toksinine ait motifin sınanması amacı ile toksine ait amino asit dizisi NCBI veri bankasından (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) elde edildi ve Homoloji (Benzeşim) Modelleme yöntemi kullanılarak modellendi (Şekil 10).



Şekil 10. SpvB toksinin ikincil yapısı

Modelleme yapıldıktan sonra modeldeki katlanma haritasını gösteren Ramachadran grafiği çizildi. Ramachadran grafiği, protein yapısının dihedral açılarını görselleştirmek için kullanılan bir diyagramdır. Proteinlerin üç boyutlu yapısını anlamak için oldukça önemlidir. Grafikteki farklı bölgeler, proteinin farklı konformasyonlarına karşılık gelir. Alfa-helix, beta-sheets gibi yapısal özellikler, grafikte belirli bölgelere yerleştirilmiştir. SpvB toksininin Ramachandran grafiğinde, alfa-helix yapısının φ ve ψ açıları yaklaşık olarak -60° ve -45° arasındadır. Beta-sheet yapısının φ ve ψ açıları 120° ve 120° arasındadır. Yığılmalar daha çok alfa-helix yapılarındadır (Şekil 11).



Şekil 11. SpvB'nin Ramachadran grafiği

Ortak yapısal motifin araştırılması için elde edilen motifler üzerinde gerekli RMSD (Root-mean-square deviation) hesaplamaları yapıldı (Tablo 2). RMSD, iki yapı arasındaki benzerlik derecesini ölçmek için sıklıkla kullanılan bir matematiksel terimdir. Özellikle protein yapılarındaki RMSD, iki proteinin üç boyutlu yapılarının ne kadar benzer olduğunu anlamak için kullanılır.

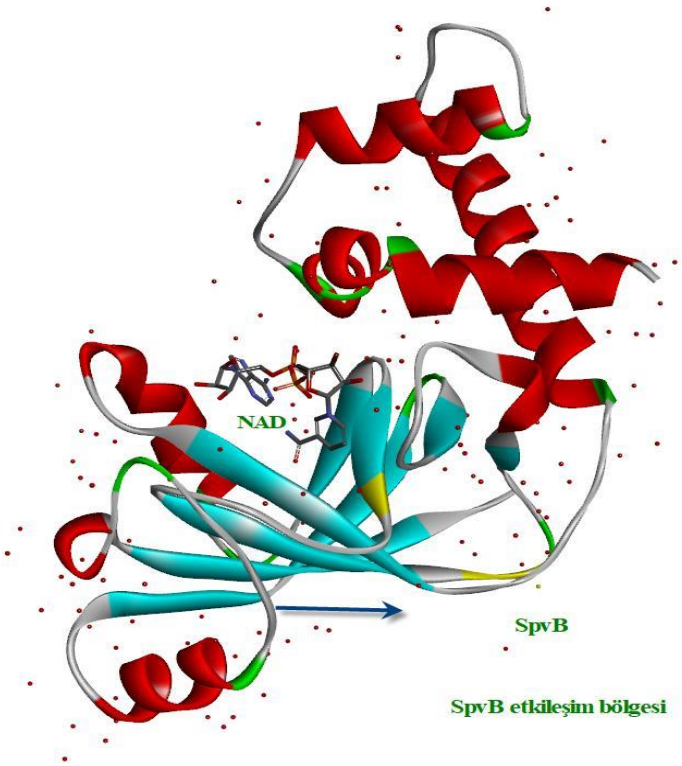
Tablo 2. Difteri toksini (1POX), kolera toksini (2A5F), VIP2 (1QS2) ve SpvB toksininin (2GWL) moleküler dinamik yöntemlerle incelenmesi

RMSD	Difteri Toksin	Kolera Toksin	VIP2	SpvB
Difteri Toksin	0	4.14	4.12	4.33
Kolera Toksin	4.14	0	5.45	5.02
VIP2	4.12	5.45	0	3.13
SpvB	4.33	5.02	3.13	0

Tablo 2'deki değerler incelendiğinde, SpvB toksini ile VIP2 toksini 3.13 Å RMSD değeriyle orta benzerlik göstermektedir. Kolera toksini ile VIP2 toksini 5.45 Å RMSD değeriyle düşük benzerlik göstermektedir ve bu iki yapı arasında önemli farklılıklar vardır.

SpvB Veri Dosyalarının Eldesi ve Dizilerinin Karşılaştırılması

ADPRT'ler NAD'ın nikotinamid ve ADP-riboz'a ayrılmasını katalizleyen enzimleri etkiler ve ADP-ribozu hedef proteine transfer eder. Bu reaksiyon sentez sonrası mono-ADP ribozil transferaz enzimi tarafından katalizlenir. SpvB üzerinde yapılan çalışmalar ve karşılaştırmalar sonucu diğer toksinlerle ortak sekiz amino asitlik bağlanma bölgesi (active site) ve bağlanma enerjileri diğer bölgelere göre yüksek olan bağlanma noktaları (hot spots) tespit edildi (Şekil 12).



Şekil 12. SpvB toksini etkileşim bölgesi

SpvB'nin Kuramsal Olarak Analiz Edilmesi

Çalışmamız kapsamında Salmonella bakterisi tarafından sentezlenen SpvB toksini üzerinde çalışıldı. SpvB, 591 aminoasitten oluşurken, toksik kısmı 200 amino asitten (65kDa) oluşan bir polipeptit zinciridir (Tablo 3). Tek zincirli bir A bölgesine sahip toksindir. Hücre içi Salmonella tarafından SPI-2 T3SS aracılığı ile direk konakçı sitoplazmasına salgılanır. Aktin monomerlerinin mono ADP-ribozillenme mekanizmasını katalizler. Monomer aktin moleküllerine saldırır ve polimerizasyonu engeller. Bu sebepten aktin molekülüne bağlandığı bölgeyi bulabilmek için G-aktinine moleküler dinamik yöntemlerle etkileşime sokuldu ve aktin üzerinde etkileştiği bölgeler tespit edildi.

Tablo 3. SpvB toksinin toksik kısmın amino asit dizilimi

392	401	411	421	431	441
SKQIQALRY	YSAQGYSVIN	KYLRGDDYPE	TQAKETLLSR	DYLSTNEPSD	EEFKNAMSVY
451	461	471	481	491	501
INDIAEGLSS	LPETDHRVVY	RGLKLDKPAL	SDVLKEYTTI	GNIIIDKAFM	STSPDKAWIN
511	521	531	541	551	561
DTILNIYLEK	GHKGRILGDV	AHFKGEAEML	FPPNTKLKIE	SIVNCGSQDF	ASQLSKLRLS
571	581	591			
DDATADTNRI	KRIINMRVLN	S			

SpvB ile G-Aktin Etkileşiminin İncelenmesi

Bilgisayar ortamında SpvB ve aktin, autodock programı kullanılarak etkileşime sokulmadan önce, bir dizi veri seti hazırlama sürecine geçildi. Çalışmada kullanılacak olan reseptör gridlerinin oluşturulması için, hem modellenen hem de veri bankalarından, SpvB'ye ait PDB (Protein Data Bank File) dosyaları elde edildi. Sonraki aşamada, aktin için ligand kimyasal yapısı hazırlandı. Bunun için LigPrep programı kullanıldı. Veri setlerinin hazırlanmasından sonra, SpvB-aktin ortak motifinin etkileşim bölgelerini belirlemek amacıyla gerekli olan bağlanma enerjisi tespiti için docking işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında PIPER skorlama tekniği kullanıldı. Bağlanma enerjileri hesaplaması yapılarak bağlanma ihtimali en yüksek olan etkileşim bölgeleri tespit edildi (Tablo 4). Yapılar arası etkileşimlerin hesaplanması esnasında bükülme açıları, dihedral açılar, bağ esnekliği, amino asitlerin bulundukları ortamdaki H atomları ile yaptıkları etkileşimler, amino asit atomları arasındaki

Van der Waals etkileşimleri ve atom yüklerinden kaynaklanan elektrostatik etkileşimler göz önünde bulunduruldu.

Tablo 4. Bağlanma Enerjileri

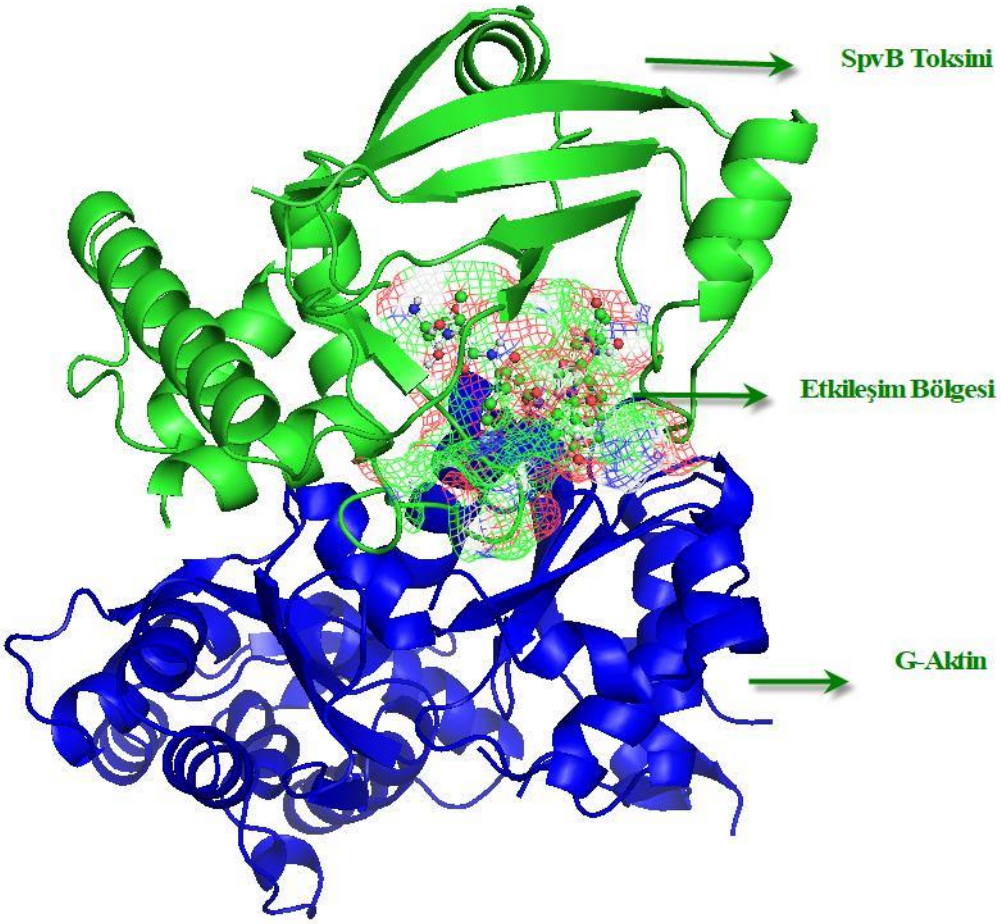
Id	ΔG(Coulomb)	ΔG(vdw)	ΔG(Kovalent)	ΔG(Bağlanma)
SpvB	-38,2 kcal/mol	51.01 kcal/mol	8.12 kcal/mo	-54.11 kcal/mol

Elektrostatik etkileşimlerden kaynaklı Coulomb enerjisi, iki yük arasındaki çekme veya itme kuvvetine bağlıdır. Coulomb etkileşimi, yüklerin büyüklükleri ve aralarındaki mesafe ile ilgilidir. Negatif Coulomb enerjisi, iki yük arasındaki çekim kuvvetinin varlığını işaret eder ve bu durum, moleküllerin kararlı bir yapı oluşturması için gerekli olan bağlanma enerjisini sağlar. SpvB toksin Coulomb enerjisi -38,2 kcal/mol olarak tespit edilmiştir. Bu da molekülün kararlı bir yapı oluşturabileceği anlamına gelmektedir.

Van der Waals etkileşimi, moleküller arasındaki çekme ve itme kuvvetlerine bağlı olarak oluşan kuvvetlerdir. Bu kuvvetler, moleküller arasındaki geçici dipol momentlerinden ve yük dağılımından kaynaklanır. Moleküller arası uzaklık arttıkça, Van der Waals etkileşimi azalır. Bu etkileşimler, proteinlerin katlanma ve stabilizasyonunda önemli bir rol oynar. Proteinlerin hidrofobik kısımları, diğer hidrofobik kısımlarla Van der Waals aracılığıyla etkileşir. Van der Waals etkileşiminin pozitif bir değer alması, moleküller arasındaki çekim kuvvetinin arttığının bir göstergesidir. SpvB toksininin Van der Waals bağlanma enerjisi 51.01 kcal/mol olarak tespit edilmiştir. Bu da molekülün daha kararlı bir yapı oluşturması için enerjisi harcaması gerektiği anlamına gelir. Yani, moleküller birbirlerine yaklaşmış ve bağların oluşması için gerekli olan bağlanma enerjisi artmıştır.

Kovalent bağlanma enerjisi, iki veya daha fazla atomun elektronlarını paylaşarak bir kovalent bağ oluşturduklarında salınan enerjidir. Bu enerji bağın yapısına, atomların arasındaki mesafeye, yük dağılımına ve molekülün diğer özelliklerine bağlıdır. Kovalent bağlanma enerjisinin pozitif çıkması, reaksiyonun termodinamik olarak olumsuz olduğu anlamına gelmez. Bazı endotermik reaksiyonlar, uygun koşullar altında gerçekleşebilir. Bununla birlikte, kovalent bağlanma enerjisinin pozitif olması, bağın zayıf olduğunu gösterir. SpvB toksininin kovalent bağlanma enerjisi 8.12 kcal/mol olarak tespit edilmiştir.

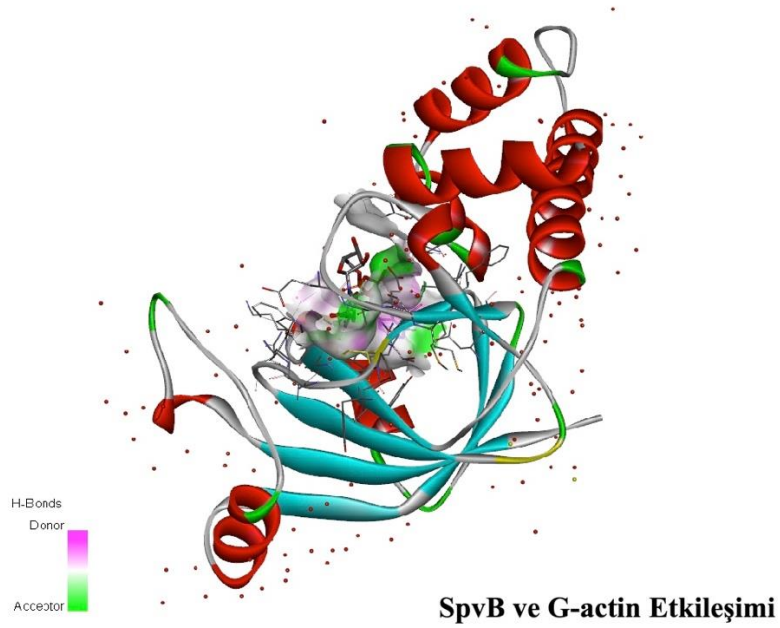
Gibbs bağlanma enerjisi, iki molekülün veya iki atomun birleşerek bir bağ oluşturması sırasında açığa çıkan veya tüketilen enerjidir. Bu enerji bağın termodinamik özelliklerini belirlemeye yardımcı olan Gibbs serbest enerji denkleminin bir parçasıdır. Gibbs bağlanma enerjisi negatif bir değer alıyorsa, bağ oluşumu kendiliğinden gerçekleşir. SpvB toksininin Gibbs bağlanma enerjisi -54.11 kcal/mol olarak tespit edilmiştir. Bu da molekülün bağ oluşturma özelliğinin kendiliğinden olduğunu göstermektedir.



Şekil 13. G-aktin ile SpvB toksininin etkileşim bölgesi

Protein-protein etkileşimi, iki veya daha fazla proteinin bir araya gelerek birbirleriyle etkileşim kurmasıdır. Protein etkileşim bölgeleri ise, proteinlerin diğer proteinler ve nükleik asitler ve biyomoleküller ile etkileşim kurduğu bölgelerdir. Bu bölgeler, proteinin yüzeyinde

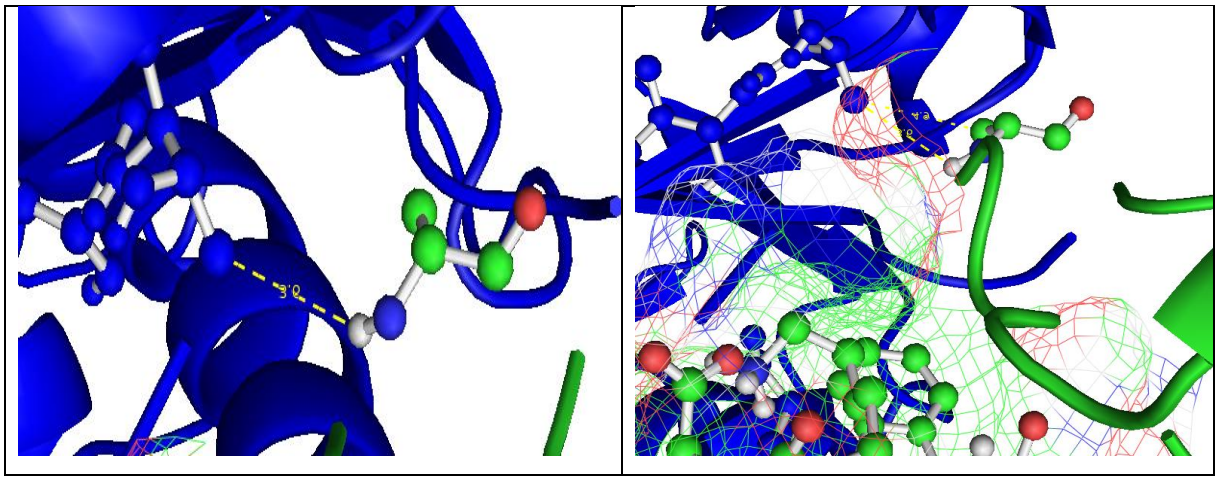
bulunabilir veya iç kısımlarda yer alabilir. Yapılan termodinamik hesaplamalar ve modelin stereokimyasal analizi sonucu SpvB'nin G-Aktin ile protein-protein etkileşimine girildiği tahmin edildi.

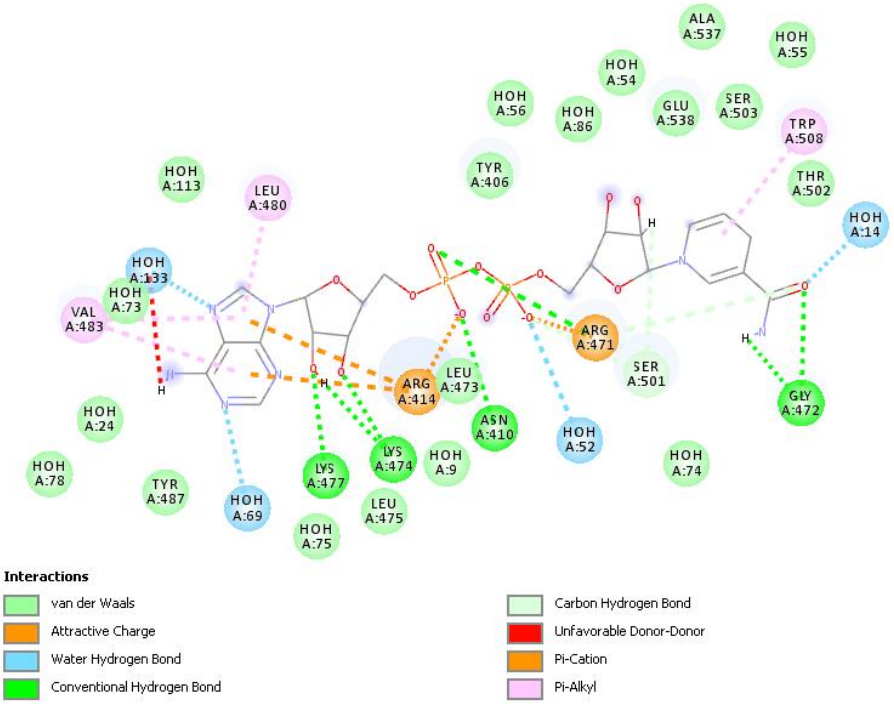


Şekil 14. Aktin ve SpvB arasındaki enerji hesaplamaları

Hotspot nokta, bir proteinin yüzeyindeki belirli bir bölgede, proteinin işlevi için önemli olan aminoasitlerin yer aldığı konumdur. Bu noktalar, protein-protein etkileşimleri, protein-ligand etkileşimleri ve protein-nükleik asit etkileşimleri gibi biyolojik etkileşimlerde önemlidir. Hotspot noktaları, proteinin üzerindeki belirli bir bölgede, sadece bir veya birkaç aminoasit içerebilir. Bu aminoasitler diğer moleküllerle doğrudan etkileşime girebilir ve bu nedenle proteinin işlevi için kritik öneme sahiptir.

Tablo 5. Aktin ile SpvB arasındaki hot spot noktalar



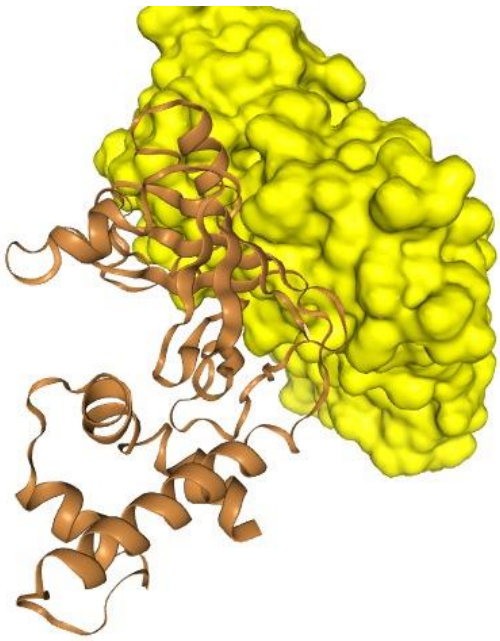


Şekil 15. Toksin-Aktin etkileşimi sıcak noktaları

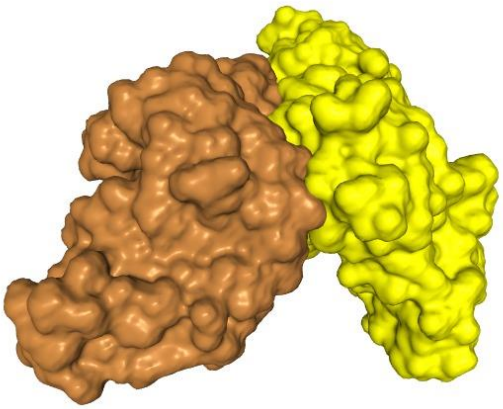
Aktin üzerinde hotspot bağlanma bölgeleri toksin üzerindeki hot spot bağlanma bölgeleri tespit edildi (Şekil 14). Toksin üzerinden D504 (Aspartat 504), W508 (Triptofan 508)

ve A571 (Alanin 571), aktin üzerinden T349 (Treonin 349), Q352 (Glutamin 352) ve I355 (İzolösin 355) noktaları arasında etkileşime girdiği tespit edildi (Şekil 15).

Elde edilen etkileşim bölgeleri gauss yüzeyi oluşturularak görüntülendi (Şekil 16-17). Gauss yüzeyi bir molekülün üç boyutlu yapısını anlamak ve molekülün etkileşimlerini incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle molekülün hangi bölgelerinin daha yüksek veya düşük elektron yoğunluğuna sahip olduğu gösterilebilir. Böylece molekülün kimyasal özellikleri hakkında bilgi edinilir.



Şekil 16. 2 boyutlu toksin molekülünün aktin yüzey molekülü ile etkileşimi



Şekil 17. SpvB-aktin etkileşimi yüzey görünümü

TARTIŞMA

Salmonella, gıda kaynaklı hastalıkların nedeni olan, oldukça sık rastlanan gram negatif bir bakteri türüdür. Salmonellanın insanlarda bulaşma yolu, kontamine olmuş yiyecek ve su tüketimidir. İki ana türü olmasına rağmen 2659 farklı alttürü olan, çok etkili bir patojendir. Salmonella ayrıca neden olduğu hastalıklara göre de sınıflandırılır. Alttürlerin çoğunluğu hafif bir gastroenterite (genellikle nontifoidal türlerin neden olduğu) neden olurken, bazı türleri (*Typhi*, *Sendai* ve *Paratyphi* A, B ve C) enterik ateş olarak bilinen ciddi bir enfeksiyona sebep olur (33). Salmonellanın bazı türleri hayvanlarda önemli bir hastalık nedenidir (34). Hayvanlar, Salmonella bakterisi ile enfekte olup ve doğrudan temas hastalığın bulaşması için bir risk faktörü olsa da (35), enfeksiyonların büyük çoğunluğu gıda kaynaklıdır (36) ve genellikle sporadik enfeksiyonun sonucudur (yani hayvanlarla doğrudan temas değil) (37).

Salmonella bakterisinin hastalık yapan en önemli ve en iyi bilinen toksinlerinden biri olan SpvB, ADP ribozilleyen toksin ailesinden olan kolera toksin grubuna dahil bir toksindir. ADP ribozilleyen toksinler, *Bordetella pertusis*, *Vibrio kolera*, *Clostridium botulinum*, *Corynebacterium* ve diğerleri olmak üzere bir dizi bakteriyel patojenin patogenezinde önemli bir rol oynar (38,39).

SpvB, hücrede G-aktini değiştiren bir mono-ADP riboziltransferazdır. Mono-ADP ribozillenme, NAD'ın ADP riboz grubunun bir aksektör protein veya aminoasite bağlanması

reaksiyonudur. Bu reaksiyon mono-ADP riboziltransferaz enzimi tarafından katalizlenir ve sentez sonrası bir modifikasyondur. SpvB iki yapısal bölgeden oluşur. SpvB'nin C-terminal bölgesi (SpvB-C), mono-ADP ribozil transferaz aktivitesine sahiptir ve yapısı belirlenmiştir. Bu bölgenin, aktini ADP ribozilleyerek modifikasyonuna sebep olduğu ve modifikasyonun aktin hücre iskeletini bozduğu bilinmektedir. SpvB'nin N-terminal bölgesinin yapı ve işlevi bilinmemektedir. C-terminal bölgesinin aktini değiştirmesine karşılık, N- terminal bölgesinin C- terminalinin işlevine yardımcı olmak için aktine bağlanması makul görünmektedir.

SpvB, tek zincirli bir A bölgesine sahip toksindir. Hücre içi Salmonella tarafından SPI-2 T3SS aracılığı ile, direk konakçı sitoplazmasına salgılanır. Aktin monomerlerinin mono ADP-ribozillenme mekanizmasını katalizler. Bu reaksiyon sonunda, aktinin ATP hidroliz kabiliyeti durur ve polimerizasyonu engellenir. Yapılan kuramsal çalışmalar sonucunda tespit edilen katalitik bölgeler, SpvB- aktin etkileşimini ve aktin depolimerizasyonunu doğrular niteliktedir.

SONUÇLAR

SpvB'nin, aktini ADP-ribozillediğini ve bu reaksiyon sonucunda, aktinin polimerizasyon aktivitesinin kaybolduğunu, G- ve F- aktin arasındaki dengenin bozulduğunu düşünmekteyiz. Bu mekanizmaya göre hücre iskeletinin SpvB tarafından bozulması, apoptozu başlatır ve bu da enfekte hücrelerin makrofajlar tarafından alınmasına neden olur. Konak hücre içinde G- ve F- aktin denge halindedir. NAD^+'nın varlığında SpvB, ADP- ribozil parçasını G-aktine aktarır. Modifiye edilmiş aktin, dengeyi G-aktine doğru kaydıran ve kısmi F-aktin depolimerizasyonuna neden olan F-aktine polimerize olma yeteneğini kaybeder. G- aktinin SpvB tarafından sürekli uzaklaştırılması, F-aktin hücre iskeletinin tamamen depolimerizasyonuna yol açar. SpvB toksini vücutta üretilen poli ADP-riboziltransferazları taklit ederek 501-STSPDKAW-508 bölgesinden aktini tanıyarak katalizlediğini düşünmekteyiz. Bu bulgular ileride yapılacak çalışmalarla desteklenecektir

ÖZET

Tifo, kirli içme suları ve yiyeceklerden bulaşan, gelişmekte olan ülkelerde hala etkisini gösteren bakteriyel bir hastalıktır. Hedef kitlesi, savunmasız gruplar olan çocuklar ve yaşlılar olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyon nedeni olan Salmonella bakterisinin bilinen birkaç toksininden biri SpvB 'dir. SpvB, etki mekanizması göz önünde bulundurulduğunda ADP-ribozilleyen toksin ailesi grubu içerisindeki mono-ADP ribozilleyen toksinlerden biridir. Bu toksin ailesi NAD'ı katalizler ve nikotinamid ve ADP-riboza ayırır. Daha sonra ADP-riboz grubu bir akseptör proteine ya da aminoasite transfer edilir. SpvB, bu reaksiyon ile aktinin çalışma mekanizmasına etki eder ve hücre iskelet yapısını geri dönüşümsüz olarak değiştirir ve sonuçta hücrenin apoptozuna neden olur. Çalışmamızın gelecekte bu konu ile ilgili yapılacak olan ilaç ve inhibitör çalışmalarına katkıda bulunacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: salmonella, SpvB, aktin, ADP ribozillenme, NAD

ANALYSING OF TYPHOID TOXIN AT THE MOLECULAR LEVEL BY THEORETICAL AND EXPERIMENTAL METHODS

SUMMARY

Typhoid fever is a bacterial disease transmitted via contaminated drinking water and food, which is still showingits effect in developing countries. Its vulnerable groups have been identified as children and the elderly. SpvB, one of the few known toxins of the Salmonella bacterium, is the cause of infection. According to the mechanism of action, it is one of the mono-ADP ribosylating toxins in the ADP-ribosilating toxin family group. This toxins family catalyzes NAD and cleaves it into nicotinamide and ADP-ribose. The ADP-ribose group is then transferred to an acceptor protein or amino acid. With this process, SpvB affects the working mechanism of actin and irreversibly changes the cytoskeleton structure, which ultimately leads to cell apoptosis. In this thesis study, we examined the crystal structure of SpvB and investigated how it interacts with actin and where it binds. We think that our study will be useful for upcoming pharmacological and inhibitor investigations on this topic.

Keywords: salmonella, SpvB, actin, ADP ribosylation, NAD

KAYNAKLAR

1. Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, Guiney DG. The Salmonella spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. Mol Microbiol 2001;39:1464–70.

2. Tezcan Merdol D, Nyman T, Lindberg U, Haag F, Koch Nolte F, Rhen M. Actin is ADP-ribosylated by the Salmonella enterica virulence-associated protein SpvB. Mol Microbiol 2001;39:606– 19.

3. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid Erişim tarihi: 30 Mart 2023

4. https://tr.wikipedia.org/wiki/Salmonella Erişim tarihi: 27 Ocak 2023

5. Caishuang X. Structural and Functional Studies of Salmonella Typhimurium Effectors GTGE and SpvB (Dissertation). Saskatchewan Univ; 2015.

6. Shall S. ADP-ribosylation as a cellular control mechanism in: Althaus FR, Hilz H, Shall S. (eslt) ADP-ribosylation of proteins. Springer-Verlag Edt Berlin 1985:9-29.

7. Okazaki IJ, Zolkiewska A, Takada T, Moss J. Characterization of mammalian ADP-ribosylation cycles. Biochemie 1995;77:319-25.

8. Lee YM, Babu CS, Chen, YC, Milcic M, Qu Y, Lim C. Conserved structural motif for recognizing nicotinamide adenine dinucleotide in poly(ADP-ribose) polymerases and ADP-ribosylating toxins: implications for structure-based drug design. J Med Chem 2010;53(10):4038–49. https://doi.org/10.1021/jm1001106

9. Plummer R: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: From Bench to Bedside. Clin Oncol. 2014; 26: 250-256.

10. Zhou D, Chu W, Xu J, Jones LA, Peng X, Li S, Chen DL, Mach RH: Synthesis, [18F] radiolabeling, and evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors for in vivo imaging of PARP-1 using positron emission tomography. Bioorg Med Chem Lett. 2014; 22: 1700-1707.

11. PARP-1: An Abundant and Ubiquitous Protein with Roles in Many Cellular Processes by W. Lee Kraus Conell University.

12. Shall S.:ADP-ribosylation, DNA repair, cell differantiation and cancer. In: Miwa M, Hayaishi O, Shall, S, Smulson N, Sugimura T. (eds) ADP-ribosylation, DNA repair and cancer. VNU Sci, Utiecht 1983:3.

13. https://phdmuscle.com/an-introduction-to-metabolism/nad-structure/ Erişim tarihi: 9 Mayıs 2020

14. Holbourn KP, Shone CC, Acharya KR. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins FEBS J 2006;273:4579– 93.

15. Fieldhouse, RJ, Merrill AR. Needle in the haystack: structure-based toxin discovery. Trends Biochem Sci 2008;33:546– 56.

16. Holbourn KP, Shone CC, Acharya KR. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. FEBS J 2006;273:4579– 93.

17. Fieldhouse RJ, Merrill AR. Needle in the haystack: structure- based toxin discovery. Trends Biochem Sci 2008;33:546–56.

18.Yates SP, Merrill AR. A catalytic loop within pseudomonas aeruginosa exotoxin a modulates its transferase activity. J Biol Chem 2001;276:35029–36.

19. Jorgensen R, Wang Y, Visschedyk D, Merrill AR. The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. EMBO Rep 2008;9:802–9.

20. Guiney DG, Fierer J. The role of the *spv* genes in *salmonella* pathogenesis. Front Microbiol 2011;2:129–29.

21. Song J, Gao X, Galán JE. Structure and function of the *salmonella* typhi chimaeric A2B5 typhoid toxin. Nature 2013;499:350–54.

22. Galan JE. Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. Annu Rev Cell Dev Biol 2001;17:53–86.

23. Barth H, Aktories K. New insights into the mode of action of the actin ADP-ribosylating virulence factors salmonella enterica spvB and clostridium botulinum C2 toxin. Eur J Cell Biol 2011;90(11):944-950. doi:10.1016/j.ejcb.2010.11.007

24. Cheng RA, Wiedmann M. The ADP-ribosylating toxins of Salmonella. Toxins (Basel) 2019;11,(7):416

25. Lüleyap HÜ. Moleküler Genetiğin Esasları. Adana: Nobel Kitabevi; 2008:85.

26. https://tr.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/translation-overview Erişim tarihi: 23 Ekim 2016

27. Lüleyap HÜ. Moleküler Genetiğin Esasları. Adana: Nobel Kitabevi; 2008:80.

28. John R. P. Knight & Owen J. Sansom (2021) Tuning protein synthesis for cancer therapy, Molecular & Cellular Oncology, 8:2, 1884034

29. Martin Holcik& Tatyana V Pestova Translation mechanism and regulation: old players, new concepts. Meeting on Translational Control and Non-Coding RNA.2007 Jul; 8(7): 639–643

30. https://tr.strephonsays.com/difference-between-microtubules-and-microfilaments Erişim tarihi: 7 Nisan 2021

31. Cooper GM, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım. M. Sakızlı ve N. Atabey (Çeviri Editörleri). İzmir: İzmir Tıp Kitabevi; 2006

32. https://docplayer.biz.tr/12860067-Hucre-iskeleti-insan-fibroblastlari-alp-can-2002-prof-dr-alp-can-histoloji-embriyoloji-anabilim-dali.html Erişim tarihi: 2016

33. Gal-Mor O. Persistent infection and long-term carriage of typhoidal and nontyphoidal salmonellae. Clin Microbiol Rev 2018;32:e00088-18.

34. Pecoraro HL, Thompson B, Duhamel GE. Histopathology case definition of naturally acquired salmonella enterica serovar Dublin infection in young Holstein cattle in the northeastern United States. J Vet Diagn Invest 2017;29:860–64.

35. Hoelzer K, Moreno Switt AI, Wiedmann M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. Vet Res 2011;42:32.

36. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. Emerg Infect Dis 2011;17:7.

37. Ebel ED, Williams MS, Cole D, Travis CC, Klontz KC, Golden NJ, et al. Comparing characteristics of sporadic and outbreak-associated foodborne illnesses, United States, 2004–2011. Emerg Infect Dis 2016;22:1193.

38. Simon NC, Aktories K, Barbieri JT. Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. Nat Rev Microbiol 2014;12:599–11.

39. Deng Q, Barbieri JT. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. Annu Rev Microbiol 2008;62:271–88.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER	**Sayfa**
Şekil 1. Salmonella	4
Şekil 2. Salmonella türlerinin ve alt türlerinin sınıflandırılması	5
Şekil 3. ADP-riboz katalizleme mekanizması	6
Şekil 4. PARP-1'i oluşturan ana bölgeler	7
Şekil 5. NAD^+ molekül yapısı	9
Şekil 6. SpvB aracılı aktin hücre iskeleti dinamikleri	12
Şekil 7. Translasyon esnasında ribozom kompleksinin hareket yönü	14
Şekil 8. DAPI yöntemiyle boyanmış aktin iskeleti	19
Şekil 9. Aktin polimerizasyonu	20
Şekil 10. SpvB toksinin ikincil yapısı	25
Şekil 11. SpvB'nin Ramachadran grafiği	26
Şekil 12. SpvB toksini etkileşim bölgesi	27
Şekil 13. G-aktin ile SpvB toksininin etkileşim bölgesi	30

Şekil 14. Aktin ve SpvB arasındaki enerji hesaplamaları 31

Şekil 15. Toksin-Aktin etkileşimi sıcak noktaları 32

Şekil 16. 2 boyutlu toksin molekülünün aktin yüzey molekülü ile etkileşimi 33

Şekil 17. SpvB-aktin etkileşimi yüzey görünümü 33

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Salmonella türlerinde bakteriyel ADP-ribozile edici toksinlerin (bARTT'ler) mevcut anlayışı 12

Tablo 2. Difteri toksini (1POX), kolera toksini (2A5F), VIP2 (1QS2) ve SpvB toksininin (2GWL) moleküler dinamik yöntemlerle incelenmesi 26

Tablo 3. SpvB toksinin toksik kısmın amino asit dizilimi 28

Tablo 4. Bağlanma Enerjileri 29

Tablo 5. Aktin ile SpvB arasındaki hot spot noktalar 32

ÖZGEÇMİŞ

07.05.1978 Bolu doğumluyum. İlkokul ve ortaokul öğrenimimi Bolu'da tamamladıktan sonra lise öğrenimimi Konya'da bitirdim. 1994 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Fizik Öğretmenliği (İngilizce) bölümünde üniversite hayatıma başladım. Eylül 1999'da Milli Eğitim Bakanlığı'na bağlı bir liseye öğretmen olarak atandım. 2015- 2018 yılları arasında Namık Kemal Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği bölümünde ikinci üniversite eğitimimi tamamladım. İyi derecede İngilizce bilmekteyim. Evli ve dört çocuk annesiyim. Halen Çorlu'da öğretmenlik mesleğine devam ediyorum**.**