T.C.
ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI SCHİFF BAZLARI VE SCHİFF BAZI METAL KOMPLEKSLERİNİN TİROZİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Ramazan DEMİR

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ramazan DEMİR tarafından hazırlanan **"Bazı Schiff Bazları ve Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi"** adlı tez çalışması 10/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri :

Başkan: Doç. Dr. Müslüm KUZU

Üye : Doç. Dr. Şevki ADEM

Üye : Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Bazı Schiff Bazları ve Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı'yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (……/……/20…..).

Ramazan DEMİR

ÖZET

Y. Lisans Tezi

BAZI SCHİFF BAZLARI VE SCHİFF BAZI METAL KOMPLEKSLERİNİN TİROZİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ramazan DEMİR

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şevki ADEM

Bu tez kapsamında melanogenez prosesinin ilk enzimi olan tirozinaz enzim aktivitesi üzerinde bazı schiff bazlı sülfonamid bileşiklerinin inhibisyon etkisi *in vitro* ve *in silico* olarak test edilmiştir. Tirozinaz inhibisyonu bu prosesi durduracağı için farmakolojik ve kozmetik uygulamaları için önemlidir. *İn vitro* sonuçlardan elde edilen IC_{50} değerleri 9,7-99 μM aralığındadır.

Enzim-ligand etkileşimlerini moleküler seviyede belirlemek için LeadIT 2.3.2 ve Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programları kullanılarak doking çalışması yapıldı. Hidrojen bağlarının ve sterik etkileşmelerin Ligand-protein bağlanmasında etkili olduğu gözlemlendi. Özellikle molekül üzerindeki sülfonil grubuna bağlı oksijenler, izoksasol halkası üzerinde bulunan oksijen ve azot, benzene bağlı metoksi grubunun oksijeni hidrojen bağı oluşumuna katkı sağladığı görülmüştür. Benzen yapılarının hidrofobik etkileşmelerde görev aldığı tespit edilmiştir. *İn vitro* ve *in silico* çalışmalar değerlendirildiğinde paladyum ve bakır kompleksleri ligandların enzim üzerinde etkisini artırmaktadır.

Ocak, 2020

Anahtar Kelimeler: Schiff bazlı sülfonamid, Tirozinaz, inhibisyon, *in vitro*, *in silico*, Sterik ve hidrojen bağ, hidrofobik etkileşmeler

SUMMARY

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME SCHIFF BASES AND SCHIFF BASE METAL COMPLEXES ON THYROZINASE ENZYME ACTIVITY

Ramazan DEMİR

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Department

Supervisor: Associate professor Dr. Şevki ADEM

In this thesis, the inhibition effect of some schiff based sulfonamide compounds on tyrosinase enzyme activity, the first enzyme of melanogenesis process, was tested as *in vitro* and *in silico*. Inhibition of the enzyme is important for pharmacological and cosmetic applications since it will halt this process. IC_{50} values obtained from in vitro results are in the range of 9.7-99 μM.

To determine the enzyme-ligand interactions at molecular level, docking studies were performed using LeadIT 2.3.2 and Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programs. Hydrogen bonds and steric interactions were observed to be effective in ligand-protein binding. In particular, it has been found that the oxygen group attached to the sulfonyl group on the molecule, the oxygen and nitrogen present on the isoxasol ring, and the methoxy group attached to the benzene contribute to the formation of hydrogen bonding. Benzene structures were found to be involved in hydrophobic interactions. According to *in vitro* and *in silico* studies, palladium and copper complexes increase the effect of ligands on the enzyme.

January, 2020

Keywords: Schiff-based sulfonamide, Tyrosinase, inhibition, *in vitro*, *in silico*, steric and hydrogen bonding, hydrophobic interactions

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince özellikle kıymetli görüşlerinden yararlandığım ve yakın ilgisini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Şevki ADEM'e, tez jürisinde yer alarak değerli katkılarını sunan Sayın Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU'na ve Doç. Dr. Müslüm KUZU'ya, İn vitro çalışmalarda kullandığımız molekülleri bizlere veren Sayın Doç. Dr. Saliha ALYAR'a, geçici lisans vererek in silico çalışmalarımızı yapmamıza imkan sağlayan LeadIT 2.3.2 ve Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 program üreticilerine, manevi desteklerinden dolayı değerli mesai arkadaşlarıma, çalışmam boyunca beni büyük bir sabır ve özveri ile destekleyen eşim Büşra DEMİR'e, sevgili oğullarım Ömer Furkan DEMİR ve Osman Enes DEMİR'e, yaşamım boyunca maddi-manevi hep yanımda olan AİLEME teşekkürü bir borç bilirim.

Ramazan DEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
SUMMARY ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÇİZELGELER DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 3
2.1. Enzimler 3
2.2. Tirozinaz 10
2.2.1. Enzim hakkında genel bilgi 10
2.2.2. Tirozinazın moleküler özellikleri 11
2.2.3. Tirozinazın katalizlediği tepkimeler 12
2.2.4. Tirozinaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar 13
2.2.5. Tirozinaz enzim inhibitörleri 15
2.2.6. Çalışılan Moleküllerin şekilleri 20
2.2.7. Moleküler Doking Modelleme Çalışmaları 22
3. MATERYAL VE METOD 24
3.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Programlar 24
3.2. Deneysel Yöntem 27
4. BULGULAR 30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 47
6. KAYNAKLAR 49
ÖZGEÇMİŞ 52

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Å	**:** Bağ uzunluğu
%	**:** Yüzde
°C	**:** Santigrat Derece
dk	**:** Dakika
g	**:** Gram
kg	**:** Kilogram
m^2	**:** Metrekare
mg	**:** Miligram
mL	**:** Mililitre
mM	**:** Milimolar
nm	**:** Nanometre
µg	**:** Mikrogram
ng	**:** Nanogram
µL	**:** Mikrolitre
µM	**:** Mikromolar
±	**:** Artı-Eksi
Cu	**:** Bakır
DMSO	**:** Dimetil sülfoksit
DNA	**:** Deoksiribonükleik asit
DOPA	**:** 3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin
HK	**:** Hidrokinon
IC_{50}	**:** Aktivitenin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon değeri
L1	**:** Ligand 1
Pd	**:** Paladyum
TRP-1	**:** Tirozinaz ilişkili protein
UV	**:** Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Geri dönüşümlü inhibitörlerin çalışma prensibi.. 7
Şekil 2.2. Kompetitif inhibitörlerin hareket mekanizması 8
Şekil 2.3. (a) Kompetitif ve (b) Unkompetitif inhibisyon çeşitleri. 8
Şekil 2.4. Unkompetitif inhibitörlerin hareket mekanizması 9
Şekil 2.5. Nonkompetitif inhibisyon çeşidi. 9
Şekil 2.6. Geri dönüşümsüz inhibitörlerin reaksiyon aktivitesi. 10
Şekil 2.7. Tirozinaz enziminin yapı içeriğinin ayrıntılı gösterimi 11
Şekil 2.8. Tirozinaz enzimi ile fenol giderim aktivitesi gösterimi. 12
Şekil 2.9. Tirozinaz enzimi ile Melanogenez yolu (eumelanin ve feomelanin oluşumu) 13
Şekil 2.10. Mantar tirozinazının standart inhibitörü olan kojik asitin inhibitör aktivitesiyle bazı tirozinaz inhibitörlerine ait inhibitör aktivitelerinin kıyaslanması. 17
Şekil 2.11. Geri dönüşümsüz tirozinaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları 18
Şekil 2.12. Prontosil molekülünün yapısı 19
Şekil 4.1. 1'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 31
Şekil 4.2. 2'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 31
Şekil 4.3. 3'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 32
Şekil 4.4. 4'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 32
Şekil 4.5. 5'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 33
Şekil 4.6. 6'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 33
Şekil 4.7. 7'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 34
Şekil 4.8. 8'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 34
Şekil 4.9. 9'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi 35
Şekil 4.10. L1 in Tirozinaz enzimi ile muhtemel etkileşimi 37
Şekil 4.11. L2'nin Tirozinaz enzimi ile muhtemel etkileşimi 38
Şekil 4.12. L3'ün Tirozinaz enzimi ile muhtemel etkileşimi 39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Cihaz Listesi 24
Çizelge 3.2. Tirozinaz Enzim Aktivitesi Hazırlanışı 27
Çizelge 4.1. Tirozinaz Enzim Aktivitesi İnhibisyon Etkisi Sonuçları 30
Çizelge 4.2. Ligandların docking sonuçları 36
Çizelge 4.3. Molegro virtual docker programdan elde edilen metal kompleksleri-enzim etkileşimi docking genel sonuçları 40
Çizelge 4.4. Kompleks 2. (3MeS2M-Pd) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları 41
Çizelge 4.5. Kompleks 3. (3MeS2M-Cu) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları 42
Çizelge 4.6. Kompleks 5. (4Me-S2M-Pd) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları 43
Çizelge 4.7. Kompleks 6.(4Me-S2M-Cu) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları 44
Çizelge 4.8. Kompleks 8.(4Me-S1M-Pd) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları 45
Çizelge 4.9. Kompleks 9. (4Me-S1MCu) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları 46

1. GİRİŞ

İnsanların gelişen teknolojik şartlarına göre ihtiyaçlarında da değişiklikler meydana geldi. Bilim insanları, insanların ihtiyaçlarını karşılamak için özellikle gıda, ilaç ve kimya endüstrisi gibi kimya ve biyokimyanın konularında yaptıkları çalışmalarla faydalı olmuşlardır.

Biyokimyasal alanda yapılan çalışmaların başında enzimatik reaksiyonlar meydana gelir. Biyokimyasal reaksiyonlar oluşmasında enzimler katalizör görevi gördüklerinden her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Hayatın devamı için birçok fizyolojik faaliyetlerin olması gerekli ve bu faaliyetlerde oluşan kimyasal reaksiyonların gerçekleşebilmesi için enzimlere ihtiyaç duyulmakta ve bu reaksiyonların neredeyse tamamına yakını onların sayesinde gerçekleşmektedir (Champe ve ark. 2008).

Enzimler, biyolojik sistemlerde görev yapan ve hayatın devamında önemli görevleri olan biyomoleküllerdir. Enzimlerden kimya endüstrisinde, temizlik maddeleri, gıdalarda, ilaç, dericilik, boya konularda biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında hayatın her yerinde enzimleri kullanarak fayda sağlamaktayız(Barrett ve ark. 2012).

Enzimler birçok ilacın etki mekanizmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle ilaç olarak kullanılabilecek yeni moleküllerin tanımlanmasında ve keşfinde enzim inhibisyon ve aktivasyon çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır(McGrath ve Walsh 2005).

Gıda maddeleri içerisinde tirozinaz bulunmasından dolayı enzimlerin etkisiyle kararma meydana getirmekte bu durumda ürünlerin kalitesini düşürmektedir. Sebze ve meyvelerdeki bu kararma ürünün oksijenle teması sırasında tirozinaz enzimin aktive olarak ürünün kararmasına sebep olmaktadır. Ürünün bozulmasıyla da sonuçlanarak maddi kayıplara neden olmaktadır. Gıdalardaki kararma ve ürünün bozulmasını önlemek için tirozinaz enzim aktivitesini durdurmaya yönelik çok sayıda birleşikler

bulunmaktadır. Enzimatik kararmaları önlemek için enzimlerin çalışmasını etkileyen faktörlerden; substratın oksijenle teması, pH değeri, sıcaklık, inhibitör dikkate alınarak reaksiyonu durdurmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır(Ullah ve ark. 2016).

Tıp alanında tirozinaz inhibitörleri, dermatolojik hastalıklardan örneğin melanin hiperpigmentasyonu, melazma, albino, lentigo gibi pigment oluşumu sırasında aşırı çoğalmasını azaltması yönünde tedavi yapmaktadır(Pillaiyar ve ark. 2017, Masum ve ark. 2019). Ayrıca kozmetik alanda yüzlerde oluşan çillerin yok edilmesinde, gebelikte ve yaşlılıkta vücuttaki oluşan lekelerin tedavisinde, güneş ışınlarının hassas cilt yapısında oluşan koyulaşan lekelenmelerin giderilmesinde ve akne tedavisinde etkili olmaktadır. Bilimsel çalışmalarda tirozinaz inhibitörü doğal olarak veya sentetik olarak elde edilebilmektedir. Bu ürünlerin içerisindeki toksisiteden dolayı pek azı kullanılabilmektedir(Bonesi ve ark. 2019, Zaidi ve ark. 2019). Tirozinaz inhibitörü aynı zamanda cilt beyazlatıcı olarak kullanılmaktadır. Cilt rengini beyazlatmada en çok kullanılan maddelerin başında kojik, askorbik asit, asit hidrokinon, hidrokinon manometil eter, arbutin, azelaik, hidroksi asitler (AHA, BHA), gelmektedir. Ayrıca, bazı kanser türleri incelendiğinden kanserli hücrelerde tirozinaz aktivesinin oldukça yoğun olduğu görülmüş ve bu enzimin bu özelliğinden dolayı tedavide yararlanılması düşünülmüştür(Pillaiyar ve ark. 2017, Pillaiyar ve ark. 2018).

Bu tez kapsamında medikal ve kozmetik endüstrisi açısından önemli olan tirozinaz enzim aktivitesi üzerinde bazı schiff bazlı sülfaonamid bileşiklerinin inhibisyon etkisi *in vitro* olarak test edilmiştir. Ayrıca, bileşiklerin enzim aktivitesini inhibe ederken hangi etkileşimlerle etki ettiğini anlamak için docking çalışmaları yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Enzimler

Biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesini sağlayan protein yapısındaki katalizör maddelere enzim denir. İlk defa W. Künhe tarafından enzim olarak adı kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyonlardan çok eski zamanlar boyunca sütün ekşimesi, şarap, sirke ve peynirin yapılması, ekmeğin mayalanması gibi proseslerde faydalanmışlardır(Berg ve ark. 2002, Nelson 2005).

Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan çok büyük kısmı protein yapısında olan maddelerdir. Enzimleri genellikle tek ve belirli bir grup maddelere etki yaparlar. Bazı durumlarda enzimler birbirlerine benzer özellikler gösteren maddelere de etki oluşturabilirler(Keha ve Küfrevioğlu 2004). Enzimin protein yapısı etkileyeceği maddeyi ve kataliz edeceği reaksiyonu kendisi belirler. Enzimlerin bir kısmı kendi protein yapılarıyla etkili olurlar (Rodwell ve ark. 2015).

Enzimlerin bir kısmı basit proteinlerden oluşur ve bunların katalitik etki oluşturan kısmı proteinin polipeptid zinciridir. Katalitik etki gösterebilen bazı enzimler için proteinden başka bileşiklere protein olmayan organik bir bileşiğe, metal iyonuna veya her ikisine de gereksinim duyarlar(Fromm ve Hargrove 2012).

Enzimin etkilediği madde veya madde karışımına substrat denir. Koenzim veya prostetik grup enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu etkisini belirler. Apoenzim ise enzimin substrat spesifitesinde hangi substrata etki edeceğini belirler(Kaya 1993).

Enzimlerin sentezlenmesi polipeptid zincirler şeklindedir. Fakat enzimin aktivite olabilmesi için polipeptidin sekonder, tersiyer ve bazı durumda da kuarterner yapıda olmalıdır. Bazı enzimler örneğin pepsin, tripsin, kimotripsin gibi yalnızca amino asitlerin birbirlerine eklenmesi sonucunda proteinlerden meydana gelmiştir. Bu tarz enzimlerde aminoasitler dışında başka etken bulunmaz. Diğer bazı enzimler ise aminoasitlerin dışında grupları da etki etmektedirler(Fromm ve Hargrove 2012).

Enzimin fonksiyonu katalizör olarak aktivasyon enerjisini düşmesini sağlayarak reaksiyonun hızını artırmaktır. Enzimatik bir reaksiyon, enzim üzerindeki merkezde bulunan cep bölgesinde vuku bulur. Merkezdeki aktif bölge, enzim molekülünün üzerinde, substratın bağlanması için özellikli bir yerdir. Merkezdeki aktif bölge tarafından tutularak enzimin substrat ile reaksiyonunun basit gösterimi şekilde gibidir(Nelson 2005).

$$E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + \text{Ü}$$

Bu denklemde E enzimi, S substratı, Ü ürünü ifade eder; ES enzim-substrat kompleksi, EÜ ise enzim-ürün kompleksini gösterir. Enzim-substrat kompleksi, enzim etkisi için temeldir.

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve kimyasal yapıda birbirinden farklı olan enzimlere **izoenzim** adı verilir. İzoenzimlerin, substrat, kofaktör ve inhibitörlere afiniteleri değişik olabilir. İzoenzimler aynı kimyasal reaksiyonu katalize ettikleri halde aminoasit bileşimleri, kinetik özellikleri ve hatta dizileri yönünden farklılık gösterirler. İzoenzimlerin kimyasal, fiziksel, ve immunolojik özellikler yönünden belirgin farklılıkları bulunmaktadır(Berg ve ark. 2012).

Biyolojik sistemlerde bazı proteinler inaktif ön bileşikler halinde sentezlenmektedir. Proenzim olarak adlandırılan bu enzimler bir veya birkaç peptid bağının proteolitik enzimler tarafından hidrolizlenmesi sonucu aktif hali gelmektedir.

Allosterik enzimler grubu diğerlerinden farklı bir kinetiğe sahiptir. Bu allosterik enzimlerin aktivitesi etken maddeler tarafından azaltılabilir veya arttırılabilir. Her allosterik enzime kendi etken maddeleri etki eder. Allosterik etkenler, substrat bağlama bölgeleri dışında enzime bağlanmasıyla birlikte aktif bölgede oluşacak değişiklikleri etkilerler.

Enzimler, katalitik etkilere ve "substrat" adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, "az" eki getirilerek adlandırılmıştır. Örneğin, üreyi parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz, fosfataz enzimi fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini katalizlenmesine denilmiştir. (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Enzimlerin zamanla daha fazla yeni enzim çeşidi bulunmasından ve bu durumun karışıklığa neden olmasından dolayı (pepsin, tripsin kimotripsin, diastaz ve katalaz gibi.) sistematik bir isimlendirmeye gereksinim duyulmuştur. Bu konuda 1965'te Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB: International Union of Biochemistry) komisyonu tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre sistematik isimlendirme yapılarak dünya bilim çevrelerince kullanılması sağlanmıştır. Enzimler sistematik isimlendirmeye göre altı ana gruptan oluşmaktadır(Kaya 1993).

Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

Hidrolazlar: Substratın çeşidine göre ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H_2O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

Liyazlar: Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması

reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzim aktivitesi çeşitli faktörler tarafından etkilenir. Enzim aktivitesinde sıcaklığın etkisi oldukça önemlidir. Bütün kimyasal tepkimelerin hızı sıcaklıkla artar. Enzimli reaksiyonlarda da bu şekilde artan sıcaklıkla birlikte enzimatik reaksiyon hızı artar. Enzimlerin en iyi çalıştığı bir optimum sıcaklık derecesi vardır. Hayvansal enzimlerin çoğunlukla optimum sıcaklığı 40-50 ^{o}C iken bitkisel enzimler de bu değer 50-60 ^{o}C arasında değişmektedir. (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

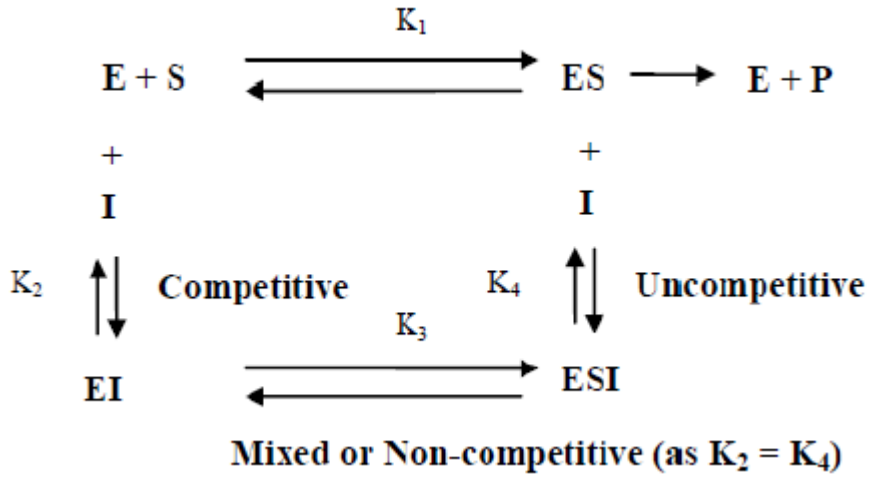
Enzimlerin aktivitelerinin maksimum olduğu pH' değeri ile optimum derecesi vardır. Bu pH' değerinin altında veya üstünde reaksiyon hızı düşer. Bu durumda enzim denatüre olmuş olur. Enzimlerin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak sıcaklıkla pH derecesi değişir(Frey ve Hegeman 2007).
Enzimin pH-aktivite ilişkisinde etkileyen faktörler vardır.
Bunlar;
1) İyonlaşabilir grupların pK'sı, enzimin aktif bölgesinde bulunarak substratı bağlamada görev alırlar.
2) substrat gruplarının pK'sı, enzime bağlanma sırasında görev alırlar.
3) Enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların pK'sı,
4) Enzimin biyolojik olarak aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı. Bunlar her bir pH için substratla doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan deneyler sonucu pH-aktivite eğrileri meydana gelir. Bu nedenle birçok enzimin K_M sabiti pH ile değiştiği görülür.(Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Enzim konsantrasyonunun etkisi: Substrat konsantrasyonu sabit tutulduğunda enzim konsantrasyonu artırılırsa enzim molekülleri birbirinden bağımsız olarak çalıştığından dolayı reaksiyon hızı da orantılı olarak artmaktadır.

Substrat konsantrasyonunun etkisi: Enzim konsantrasyonun sabit olduğunda enzimatik reaksiyonun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artma gösterir. Enzimatik reaksiyonda hız maksimuma ulaştıktan sonra substrat konsantrasyonunun artması reaksiyon hızını değiştirmeyecektir.

Enzim inhibitörü bazı moleküller enzimlerle ilişki kurma yeteneğinde oldukları halde, substrat gibi olamadıklarından yeni bir ürüne dönüşemezler. Bu durumda enzimin kendisi de bu birleşme nedeni ile katalitik görevini yapamaması durumundaki maddelere Enzim inhibitör denir. Enzimatik inhibisyon geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak ikiye ayrılır(Cornish-Bowden ve Cornish-Bowden 2012).

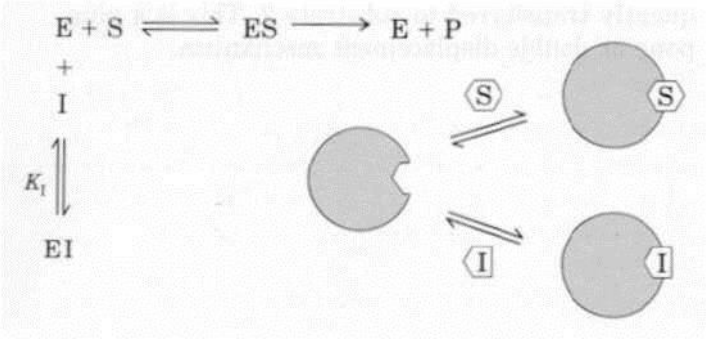
Geri dönüşümlü inhibisyon: Bu gruptaki inhibitörler kompetitif (yarışmalı) inhibitörler, unkompetitif (yarışmasız) inhibitörler ve nonkompetitif (sınırlı yarışmalı) inhibitörler olmak üzere üçe ayrılır. İnhibitör şekli Şekil 2.1'de gösterilmiştir. E, S, I ve P sırasıyla enzim, substrat, inhibitör ve ürün. ES, enzim substrat kompleksi, EI ve ESI sırasıyla enzim-inhibitör ve enzim-substrat-inhibitör kompleksleri ifade eder.



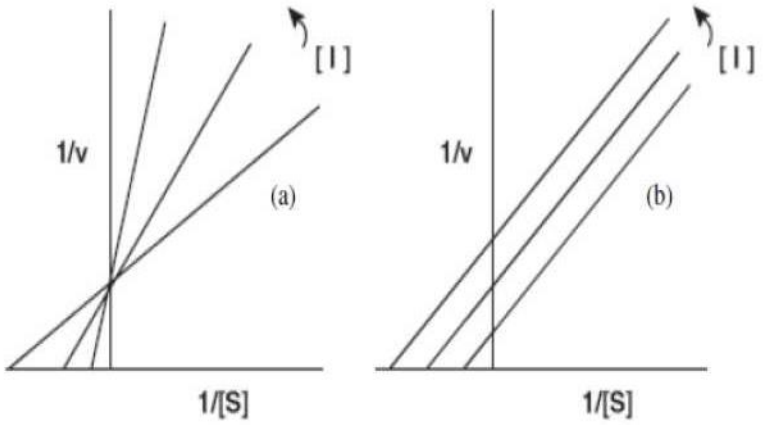
Şekil 2.1. Geri dönüşümlü inhibitörlerin çalışma prensibi. (Chang 2009).

Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon: Geri dönüşümlü enzim inhibisyonunun yaygın bir şeklidir. Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör ile substrat enzimin aktif yerine bağlanmak için yarışırlar. İnhibitör enzimin aktif yerine bağlanmasıyla reaksiyon gerçekleşemez. Bu durumda inhibitör aktif yeri işgal ederken substratın enzime bağlanmasını önler. Kompetitif enzim inhibisyonunda enzimin substratına olan ilgisini inhibitör madde azaltır, Km değeri büyür. Kompetitif inhibitör yapısı genellikle

substrata benzemektedir. Enzime reversible bağlanma özelliği gösteren substrat gibi bir bileşiktir. Enzim ile reversible olarak birleşerek EI kompleksi oluşturur. (Şekil 2.7).

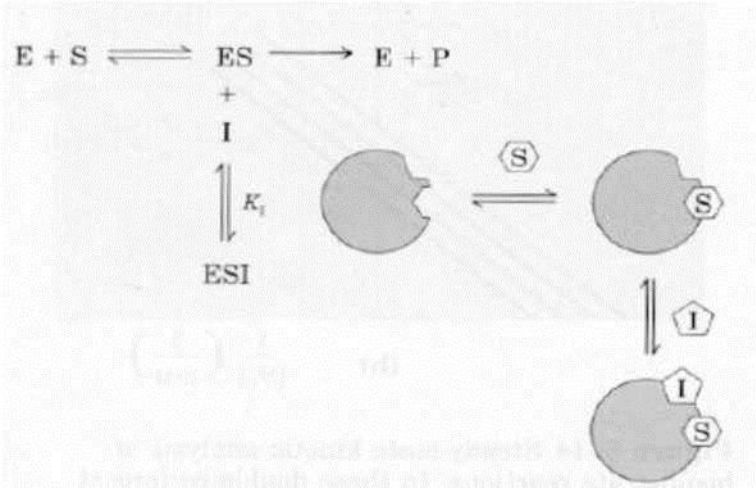


Şekil 2.2. Kompetitif inhibitörlerin hareket mekanizması (Chang 2009).



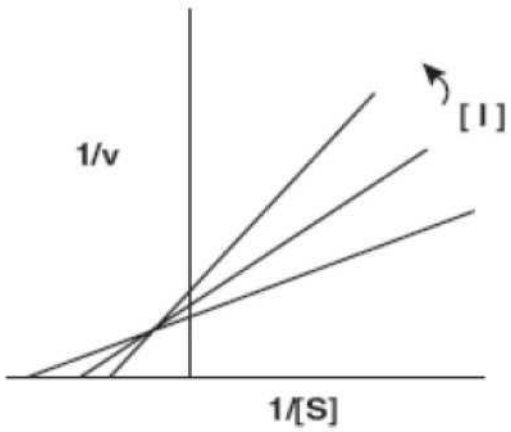
Şekil 2.3. (a) Kompetitif ve (b) Unkompetitif inhibisyon çeşitleri.

Unkompetitif (yarışmasız) inhibisyon: Unkompetitif inhibitörünün enzime bağlanması sonucu oluşan enzim inhibisyonudur. Unkompetitif inhibitör enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden başka bir yere geri dönüşümlü olarak bağlanır. Fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabilirken unkompetitif inhibitör, yalnızca ES kompleksi meydana geldikten sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine geri dönüşümlü bağlanmasıyla şekil 2.9 da gösterildiği gibi enzimi inaktive olur**.**



Şekil 2.4. Unkompetitif inhibitörlerin hareket mekanizması (Chang 2009).

Nonkompetitif inhibisyon: Substrata yapı bakımında benzemeyen bazı maddelerin belirgin bir şekilde enzimi inhibe ederek katalitik bölgesi dışında spesifik başka bir bölgeye yani inhibitörle substrat enzimin farklı farklı yerlerine bağlanırlar. Bundan dolayı bu iki bileşik bağlanmak için kendi aralarından yarışma halinde olmadığından dolayı bu tür inhibisyona yarışmasız inhibisyon da denir. Bu tarz inhibitörler enzimin yapısını bozması sonucu katalizi engeller.

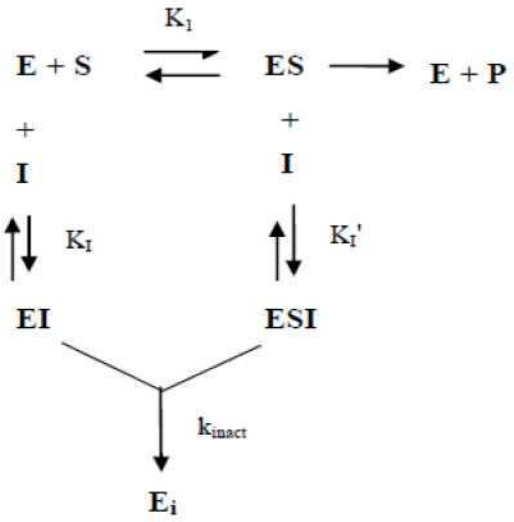


Şekil 2.5. Nonkompetitif inhibisyon çeşidi.

Geri dönüşümsüz inhibitörler: Geri dönüşümlü olmayan inhibitörler aynı zamanda

spesifik inaktivatörler olarak tanınırlar. Geri dönüşümsüz inhibitörler enzimle kovalent bir bağ oluşturup onu kolayca inaktif hale şekil 2.11 de gibi getirirler.

Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonu, bir geri dönüşümsüz inhibitörün, enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla geri dönüşümsüz olarak birleşmesinden meydana gelir. Geri dönüşümsüz inhibitör ile enzim arasında kovalent bağ oluşma çok fazla olur. Şekil 2.6'da enzim(E), inaktif enzim (Ei), substrat(S), inhibitör(I), ürün(P), ara ürünler ES ,EI ve ESI olarak sembolize edilir.



Şekil 2.6. Geri dönüşümsüz inhibitörlerin reaksiyon aktivitesi. (Chang 2009).

2.2. Tirozinaz

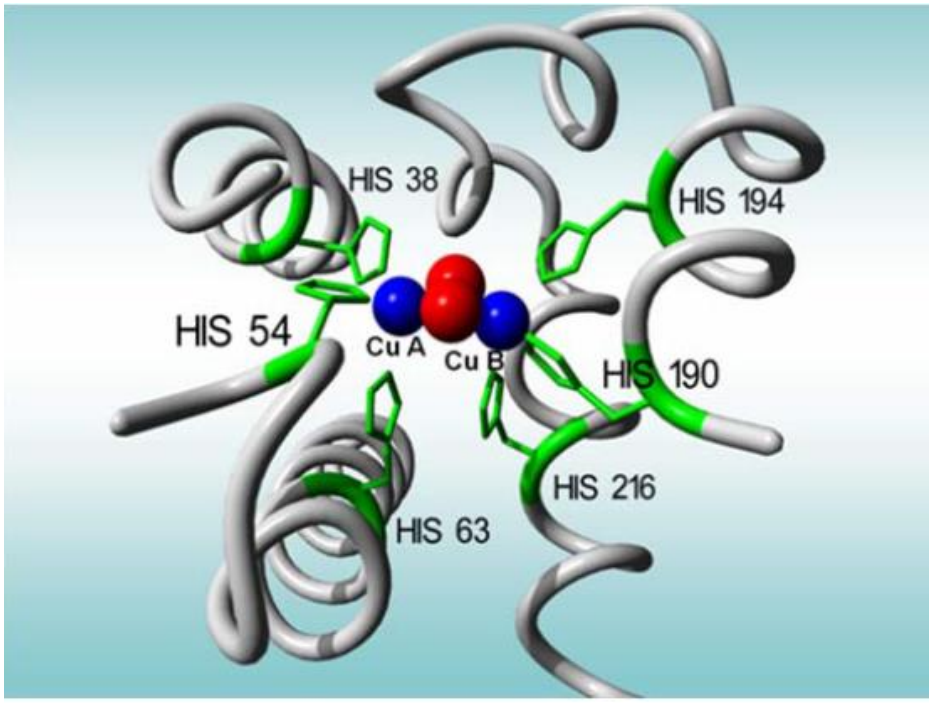
2.2.1. Enzim hakkında genel bilgi

Tirozinaz enzimini 1856 yılında Schoenbein tarafından mantar üzerine yapılan çalışmalarda keşfedilmiştir (Whitaker ve ark. 1995),

Tirozinaz enziminin genel adları polifenol oksidaz, fenolaz, katekol oksidaz, monofenol oksidaz, kresolaz ve katekolaz olarakta isimlendirilir. Ayrıca enzimi 1,2-benzendiol ve oksijen oksidoredüktaz olarak sistematik adı vardır. Tirozinaz enzimleri (monofenol, o-difenol: oksijen oksidoredüktaz EC 1.14.18.1) proteinlerin büyük bir grubu olan tip-3 bakır proteinleri grubundandır (Wong 1995).

Tirozinaz enzimi içerisinde bakır atomları vardır. Tirozinaz enzimi içerisinde aktif merkezde bulunan iki bakır atomu her biri üç histidin aminoasidi grubuna bağlanmış şekildedir(Ellingsen ve ark. 2015). Aktif merkezdeki iki bakır atomu iki tane oksijen atomuyla etkileşim durumundadır(Ullah ve ark. 2016).

Şekil 2.7'de tirozinaz enziminin yapı içeriğini gösteriminde bakır atomları yeşil renkte, molekül yüzeyi kırmızı renkte, aktif merkezdeki bakır atomları ile koordine olmuş histidin aminoasitleri mavi çizgi şeklinde tanıtılmıştır(Collins 2016).



Şekil 2.7. Tirozinaz enziminin yapı içeriğinin ayrıntılı gösterimi(Agarwal ve ark. 2016).

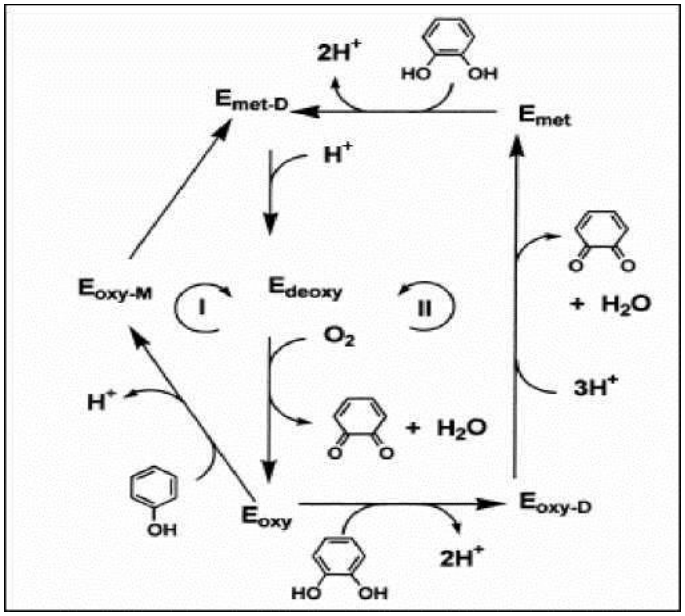
2.2.2. Tirozinazın moleküler özellikleri

Tirozinaz tipi fenol oksidazların moleküler ağırlıkları izole edildikleri kaynaklara göre farklılık göstermektedir. Yüksek yapılı izole edilen dört farklı bitki türünden moleküler ağırlıkları 33.0 kDa ile 200.0 kDa arasında değişmekte olan bitki türlerinden elde edilmektedir. Mantardan elde edilen tirozinaz enziminin moleküler ağırlığı 128.0 kDa', üzüm tirozinazı 40.680 kDa olarak kabul edilir (Jackman ve ark. 1992). Bu enzimi için

katekol substratı kullanıldığında, enzimin Km (Michaelis-Menten sabiti) değeri 3.06 mM' olarak bulunur(Nishimura ve ark. 2017).

2.2.3. Tirozinazın katalizlediği tepkimeler

Tirozinaz enzimi bakır içermesiyle bilinir. Tirozinaz enzimi moleküler oksijeni kullanarak, monofenollerin oksidasyonunu katalizlerler. Bu şekilde iki tane oksidasyon reaksiyonunu şekil 2,8'deki gibi katalizleme yaparlar. Şekil 2.8'de Tirozinaz enzimi ile fenol giderim aktivitesinde birinci durum(1) Monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu, ikinci durum(2) o-difenollerin tirozinazla o-benzokinonlara dehidrojenasyonu. Şekilde M:monofenol ve D:difenol ifade etmektedir.

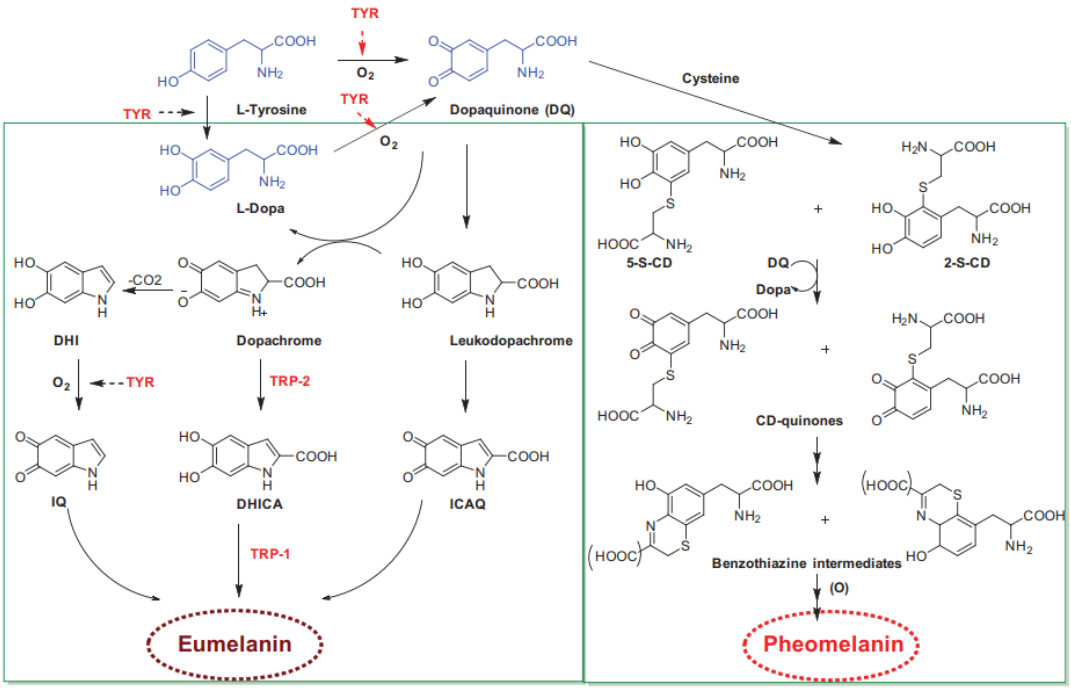


Şekil 2.8. Tirozinaz enzimi ile fenol giderim aktivitesi gösterimi(Ikehata ve Nicell 2000).

Tirozinaz enzimi iki yarı oksidasyon reaksiyonunu katalizleme yapar. Şekil 2.8'de birinci bölümde oluşan reaksiyonda dört faklı tirozinaz enzim yapısı oluşur. Bunlar; Edeoxy, Eoxy, Eoxy-M, Emet-D birinci çevrimde monofenollerin(C6H5OH) oksidasyonunu oksijen kullanarak katalizlenmesiyle oluşur. İkinci reaksiyon çevriminde enzim altı farklı enzim yapısını oluşturur. Bunlar şekil 2.8'de ikinci bölümde gösterilen Edeoxy, Eoxy, Eoxy-D, Emet, Emet-D çevriminde o-difenollerin(C6H5OH)

oksidasyonunu katalizleyerek oluşturur. İki reaksiyon sonucunda da oligomerlerle reaksiyon veren o-kinonlar meydana gelir (Duran ve Esposito 2000).

Tirozinaz enzimi aktif kısmındaki bakır iyon değerliğine ve moleküler oksijene bağlı olarak üç ara formda bulunmaktadır. Bu yapılardan Met(Cu II- Cu II) formundan iki elektronun ortamdan alınması ile deoksi(Cu I-Cu I) forma dönüşmektedir. Bu dönüşümden ortaya çıkan deoksi form moleküllerinin oksijenle birlikte geri dönüşümlü oksi(Cu II-O2-Cu II), formu oluşturur (Sánchez-Ferrer ve ark. 1995). Şekil 2.9 da Melanin biyosentezinin özellikle ilk basamağını meydana getiren L-tirosinin L-dopakinon ve L-dopakrom'a dönüşümünden tirozinazlar görevlidir (Soler-Rivas ve ark. 1999).



Şekil 2.9. Tirozinaz enzimi ile Melanogenez yolu (eumelanin ve feomelanin oluşumu)(Hałdys ve Latajka 2019)

2.2.4. Tirozinaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar

Enzim memeli canlılarda melanomaların albinizm, vitiligo gibi pigmentasyon sorununa bağlı gelişim hastalıklarına etkisi incelenmiştir. Mantarlarda ise kahverengileşme ile

pigmentasyonla ilişkisi incelenmiştir (Van Gelder ve ark. 1997). Melaninler UV radyasyonuna, serbest radikallere, dehidratasyona ve aşırı sıcaklıklara karşı savunmaya geçerek, direniş gösterirler.

Mantar tirozinazı mantarın gelişimi ve hasatı sırasında meydana gelen enzimatik kararma soncunda ürünün ticari değerini azaltmasından dolayı yenilebilir bir mantar olan Agaricus bisporus, adlı mantar üzerine ilk çalışmayı (NAKAMURA ve ark. 1966) yapmıştır ve sonraki yıllarda (Robb ve Gutteridge 1981), (Wichers ve ark. 1996), dan çalışmalarıyla saflaştırmışlardır. Diğer mantarlardan Nevraspora crassa, (Kupper ve ark. 1989), Lentinula edodes, (Kanda ve ark. 1996), Aspergillus oryzae ve Pycnoporus sanguineus, (Halaouli ve ark. 2006), gibi elde edilen enzim mantar tirozinaz biyokimyası üzerine yeni çalışmalar yapmışlardır.

Polifenol oksidazlar da monofenolleri uygun şartlar altında hidroksillediklerinden dolayı tirozinaz ile arasındaki fark her zaman açık olamaz. Tirozinaz aktivitesi gerçekleştiğinde canlılarda deri pigmentasyonu, koruma ve savunma mekanizmaları devreye girer.

Bitkilerde tirozinaz inhibisyonu sonucu kararma reaksiyonları gibi istenmeyen zararlı etkiler de görülmektedir (Ikehata ve Nicell 2000).

Güneşten gelen UV radyasyonunun zararlı etkilerinden cildi korumada Melanin önemli bir görevi vardır. İnsan cildini foto koruyucu özelliği olduğu halde, anormal miktarda Melanin bulunması durumunda cildin bazı özel bölgelerinde daha fazla pigmentli parçalar oluşturur ve bu durum estetik bakımından sorun oluşturabilmektedir.

Tirozinaz enzimi genellikle kararma önleyici ve cilt beyazlatıcı molekülleri tespit etmek amacıyla doğal kaynaklardan veya sentetik olarak elde edilir. İnsan vücudu için oluşan tirozinaz derideki pigmentasyonu azaltmak için kullanılırken mantar tirozinazı ise organik materyallerin, karboksilatların, diğer protein ve enzimlerin varlığında tirozinaz aktivitesindeki farklılıkların tespit edilmesinde kullanılır (Naidja ve ark. 1998).

2.2.5. Tirozinaz enzim inhibitörleri

Tirozinaz enzimin doğal ve sentetik kaynaklı birçok inhibitörü çalışması bulunmaktadır. İnhibitörler enzim substratları olan tirozin ve dopa varlığında dopakrom oluşumu bakımından incelenmiştir(Ullah ve ark. 2016, Nishimura ve ark. 2017, Nunes ve Vogel 2018).

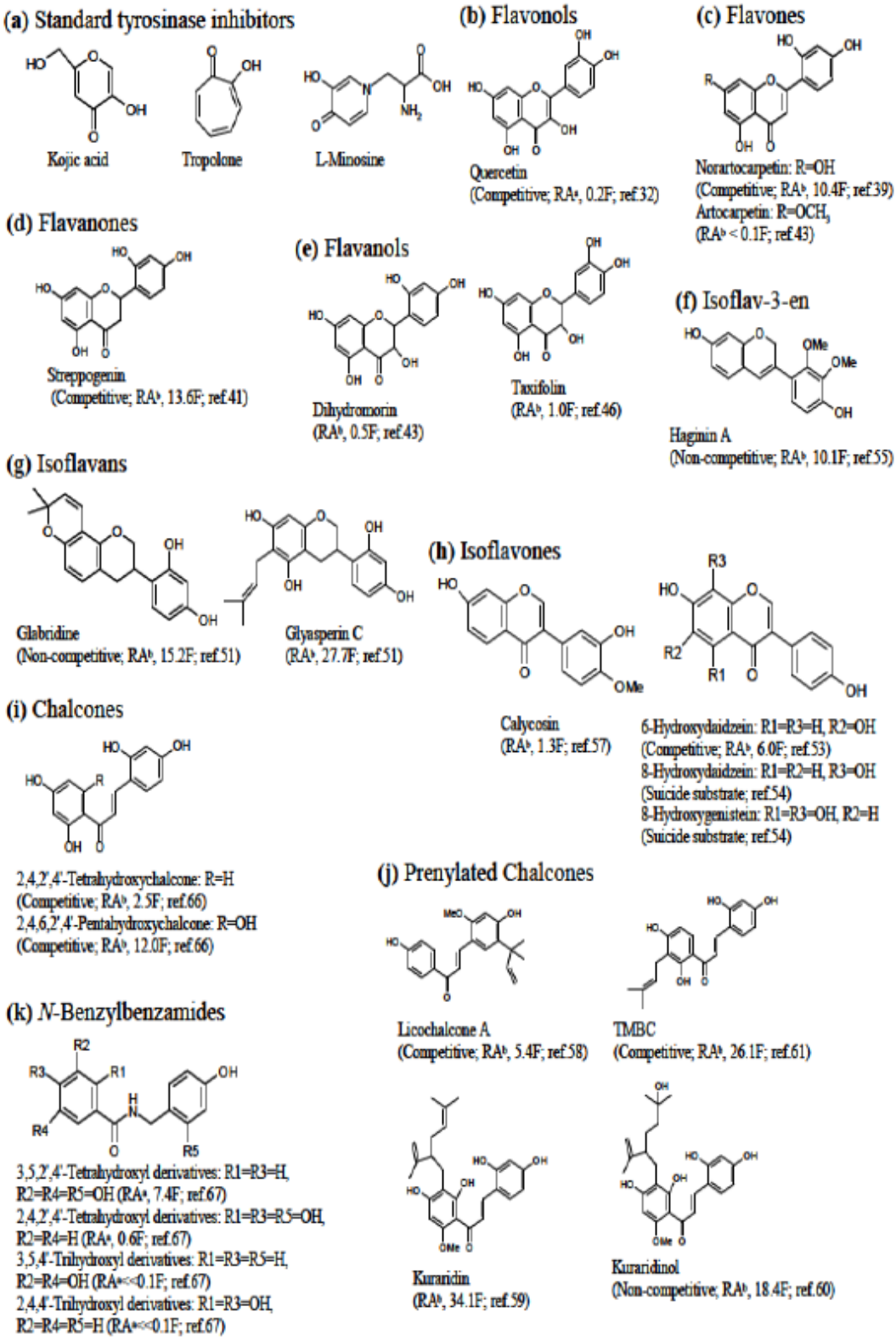
Meyve ve sebzelerin taşınması sırasında oluşan zedelenmelerden dolayı veya bu ürünlerin işlenmesi sürecinde kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havayla teması sırasında veya ürünlerin dondurulması ve çözünmesi durumlarında enzimatik kararma meydana gelir. Ürünler hasat edildikten sonra depolama yapıldıklarında meydana gelen enzimatik kararma ürünün ticari yönden değerinin düşmesiyle sonuçlanır. Bu durumda enzimin gıda endüstrisi içerisinde çok önemli olduğunu ortaya çıkarır (Jolivet ve ark. 1998).

Tirozinazın monofenolleri difenollere dönüştürme yeteneği olmasından ve antioksidan orto-difenollerin üretilmesi amacıyla faydalanılmaktadır. Gıda endüstrisinde ve ilaç ve kozmetik sektöründe bu maddelerin katkıları oldukça fazladır. Tirozinaz inhibitörlerinin cilt beyazlatıcı etkileri bulunmasından dolayı kozmetik sektöründe oldukça geniş uygulama sahası bulmaktadır(Seo ve ark. 2003).

Tirozinaz inhibitörleri arasında en yaygın olan, polifenoller pek çok fenolik işlev içeren moleküllerdir. Flavanoidler de yapıları aydınlatılmış şekilde en fazla çalışılan polifenollerdir. Bitkilerinin birçoğunun yaprak, tohum, çiçek ve kabuklarında yaygın olarak vardır. Bu zamana kadar yapılmış çalışmalarda yapısı aydınlatılmış 4000'den fazla flavanoid tespit edilmiştir. Bu flavanoidler bitkilerde UV ışınlarına, patojenlere ve ot oburlara karşı savunma mekanizması olarak görev yaparlar.

Tirozinazın en çok çalışılmış inhibitörü kojik asittir. Bu inhibitör günümüzde kozmetikte cilt beyazlatıcı ve gıda endüstrisinde enzimatik kararmayı önleyici gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. (Chen ve ark. 1991), Mantar tirozinazının standart inhibitörü olan kojik asitin monofenolaz aktivitesi üzerinde kompetitif inhibisyon etkisi

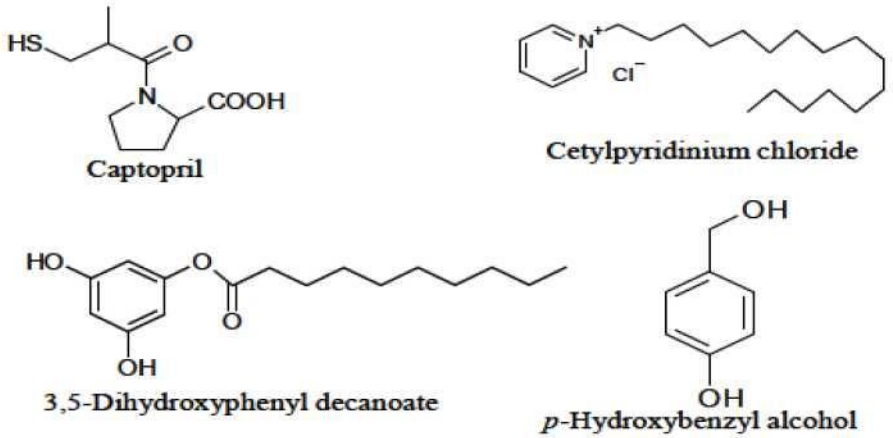
gösterdiği ve bu etkinin yanında difenolaz aktivitesi üzerine karışık inhibisyon etkisi olduğunu göstermiştir. Tirozinazın difenolaz aktivitesine slow-binding inhibitör etkisi gösterdiği de belirtilmiştir (Cabanes ve ark. 2002).



Şekil 2.10. Mantar tirozinazının standart inhibitörü olan kojik asitin inhibitör aktivitesiyle bazı tirozinaz inhibitörlerine ait inhibitör aktivitelerinin kıyaslanması (Chang 2009).

Morus türü bitkilerde polifenol oldukça fazladır. Bu bitkinin farklı bölümlerinden elde edilen ekstraların toksik olmayan etkiye sahip olduklarından cilt beyazlatmada yaygın olarak kullanıldığından dolayı çok sayıda inhibitör saflaştırılmıştır. Bu bitkinin yapraklarından alınan moracin (M-6,3'-o-p- glucopyranoside) tirozinazın anti-difenolaz aktivitesi üzerine kojik asitten 4-5 kat daha fazla inhibitör etkisi olduğu görülmüştür (Lee ve ark. 2002).

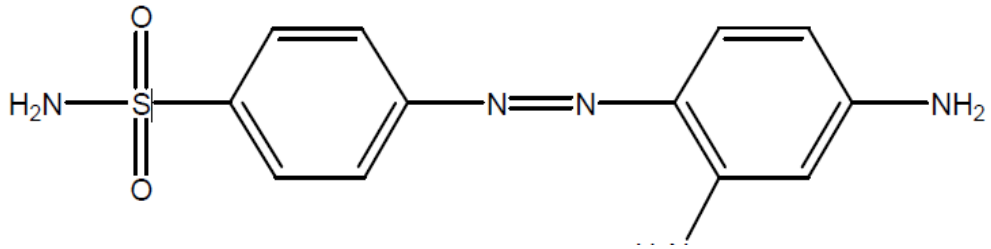
Bitki kabuklarından elde edilen ekstrattan saflaştırılan norartocarpetin (5,2,7',4'-tetrahydroxyflavone)'un etkisi, mantar tirozinazının aktivitesine karşı inhibitör etkisinin kojik asitten 10,4 kat daha fazla olduğu tespit etmiştir (Ryu ve ark. 2008).



Şekil 2.11. Geri dönüşümsüz tirozinaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları (Chang 2009).

Sülfonamidler

1932'de Alman kimyacıları Klarer ve Mietzch, yün polenleri üzerine güçlü bir şekilde bağlanan prontosil (para-Sülfonamit okrizodin) adlı azot türevi bir kırmızı boya keşfettiler.



Şekil 2.12. Prontosil molekülünün yapısı

1935'te G. Domark ve arkadaşlarının, farelerde oluşturdukları hemolitik streptekoklardan (bir bakteri türü) ileri gelen enfeksiyonları prontosille tedavi etmelerinden sonra antifeksiyöz kemoterapide ilk adım atılmış oldu (Dökmeci ve ark. 1992).

İnsanlardaki bakteriyel hastalıkların sistematik olarak tedavisi ve önlenmesinde ilk kullanılan ilaçlar sülfonamitlerdir. Bulunmaları ve hemen geniş şekilde kullanılmaya başlanmalarını takiben etkili oldukları bakterilerin yol açtıkları hastalıklarda önemli azalma olmuştur (Dural 2002).

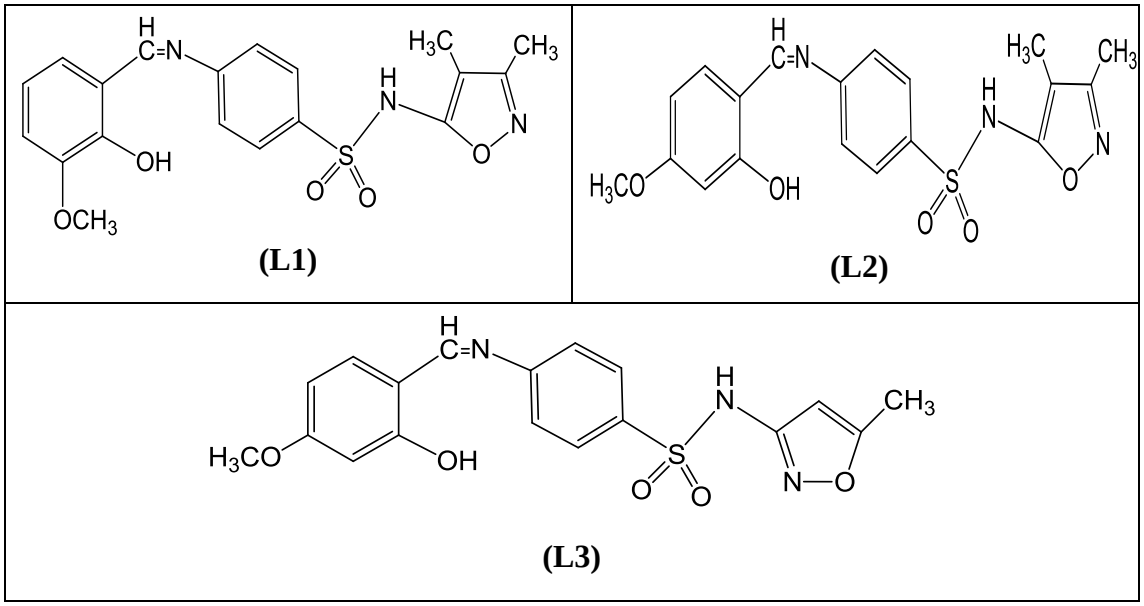
Günümüze kadar sayıları binleri aşan sülfonamit türevi sentezlenmiş ancak bunlardan sadece 25–30 kadarı uygulama alanı bulmuştur. Tüm sülfonamitler aynı yapıya sahiptir. Bakteriler üzerinde etkinlik için molekülde para konumunda amino grubunun bulunması esastır. Para konumuna vücutta amino grubuna çevrilebilen yapılar da bağlanabilir (Solomons 2004).

Sülfonamid türevlerinin tirozinaz enzim aktivitesini inhibe ettiği çalışmalar çok azdır. 2014 yılında yapılan bir çalışmada 0.30 mg/ml derişimde bazı sülfonamid türevlerinin tirozinaz enzim aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir(Mojzych ve ark. 2014). Bazı kiral pirazolo [4,3-e] [1,2,4] triazin sülfonamidlerin bu enzim üzerinde inhibisyon etkisi çalışmalarında 27.9–40.17 µM aralığında inhisyon etkisi rapor edilmiştir(Mojzych ve ark. 2017). Alyar ve arkadaşları bazı schiff baz sülfo ilaçların ve metal komplekslerinin tirozinaz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisini rapor ettiler(Alyar ve ark. 2019). Bu çalışmalar sülfonamid türevlerinin ve metallerle kompleks oluşturduğu bileşiklerin tirozinaz enzim aktivitesini etkileyebileceğini göstermiştir. Biz bu çalışmamızda schiff baz yapıdaki sülfonamid türevleri ve onların

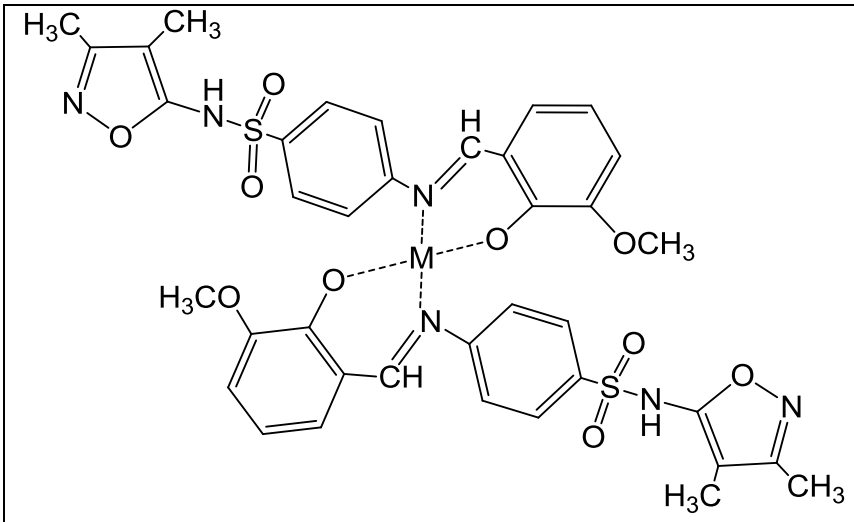
bakır ve paladyum komplekslerinin bu enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırdık. Çalışılan moleküllerin adları ve yapıları aşağıda verilmiştir.

2.2.6. Çalışılan Moleküllerin şekilleri

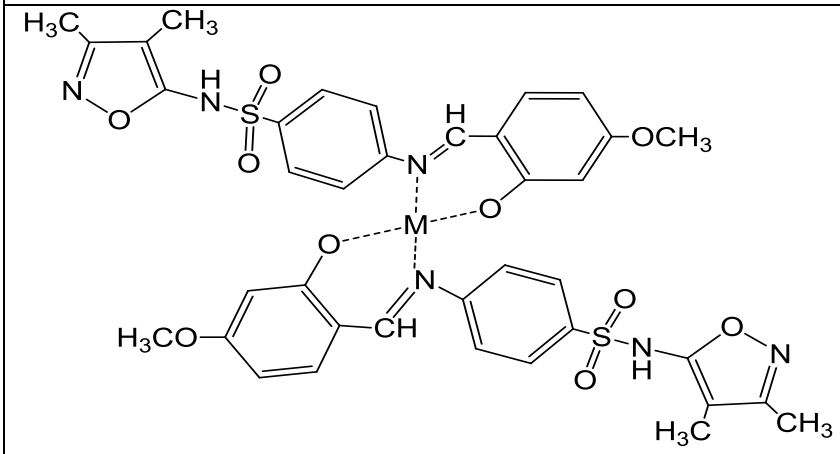
İn vitro ve *in silico* çalışmalarda aşağıda yapıları gösterilen moleküller çalışılmıştır. Moleküllerin daha önce bazı enzimler üzerinde inhibisyon etkisi rapor edilmiştir(Alyar ve ark. 2018).



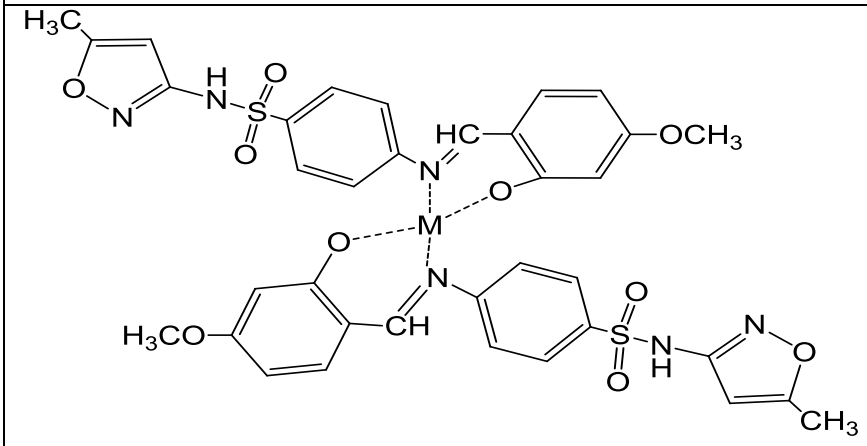
1. 2-Hidroksi 3-metoksibenzaldehit Sülfisoksazol Schiff bazı **(L1)**
2. 2-Hidroksi 4-metoksibenzaldehit Sülfisoksazol Schiff bazı **(L2)**
3. 2-Hidroksi 4-metoksibenzaldehit Sülfametoksazol Schiff bazı **(L3)**



M=Pd(L1)$_2$ ve M=Cu(L1)$_2$



M=Pd(L2)$_2$ ve M=Cu(L2)$_2$



M=Pd(L3)$_2$ ve M=Cu(L3)$_2$

4. Bis (2-Hidroksi 3-metoksibenzaldehit Sülfisoksazol) Paladyum(II) **[Pd(L1)$_2$]**
5. Bis (2-Hidroksi 3-metoksibenzaldehit Sülfisoksazol) Bakır(II) **[Cu(L1)$_2$]**
6. Bis (2-Hidroksi 4-metoksibenzaldehit Sülfisoksazol) Paladyum(II) **[Pd(L2)$_2$]**
7. Bis (2-Hidroksi 4-metoksibenzaldehit Sülfisoksazol) Bakır(II) **[Cu(L2)$_2$]**
8. Bis (2-Hidroksi 4-metoksibenzaldehit Sülfametoksazol) Paladyum(II) **[Pd(L3)$_2$]**
9. Bis (2Hidroksi 4-metoksibenzaldehit Sülfametoksazol) Bakır(II) **[Cu(L3)$_2$]**

2.2.7. Moleküler Doking Modelleme Çalışmaları

Terapötik bileşiklerin rasyonel tasarımı, moleküler modellemesi üzerine yapılan çalışmalarda bilgisayarlardaki donanım ve yazılım teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak işlemler çok pratik ve kolay bir şekilde daha hızlı sonuçlar alınmaya başlanmıştır.

Doking, iki molekülün kararlı bir kompleks yapı oluşturmak üzere birbirlerine bağlanması sırasında molekülün birinin yönlendirmesinin bilgisayar ortamında tahmin edilmesi yöntemidir (Lengauer ve Rarey 1996).

İlaç tasarımında küçük moleküllü yapıların protein hedeflerine karşı bağlanma etkilerini yani biyolojik aktivesini rasyonel tasarımını bilgisayar ortamında önceden tahmin edebilmek için kullanılmaktadır. (Kitchen ve ark. 2004); (Chikhi ve ark. 2008).

Doking çalışmalarında biyolojik hedef olarak incelenen yapı protein yapısındadır. Bunlar reseptör, enzim, iyon kanalı veya yapısal protein olabilir. Proteinin yapısının belirlenmesinde en fazla X-ışınları kristallografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri uygulanmaktadır.

Bu yöntemlerin uygulanmasında öncelikle kristal olarak oluşturulan bir protein üzerine gönderilen X-ışınları ile birlikte bu proteinin yapısı ortaya çıkartılır. İkinci olarak su ortamında çözünen protein konformasyonu belirlemek için NMR yöntemi kullanılır. Bu yöntemde karışık ve kompleks çözümlere ihtiyaç olduğundan dolayı X-ışınları

kristallografisi yöntemi daha çok kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle proteinin üç boyutlu yapısı aydınlatılır. Doking programları, küçük moleküllerin proteine bağlanma potansiyeli ve bu bağlanmada etkili olan kimyasal etkileşimleri anlamamızı sağlar.

Doking sürecinde, sürekli hareket edebilen protein ve ligand, bu hareketlerinin sonucunda durabildikleri en düşük potansiyel enerjili konumları belirlenir. Bunu hesaplamak için, tıpkı doğada olduğu gibi, bir optimizasyon işlemi kullanılır. Ligandın proteine göre konumu değiştirilerek enerjisi hesaplanır ve en düşük enerji bulunana kadar bu işleme devam edilir. Başka bir deyişle amaç protein-ligand sisteminin serbest enerjisinin en düşük olduğu konformasyonu bulmaktır.

Bu amaçla ticari olarak satılan, internet ve açık kaynaklar üzerinden ulaşılabilecek bazı doking programları mevcuttur.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Programlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan çeşitli kimyasallar ve cihazlar verilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihaz Listesi

RADWAG AS220 R2 ANALİTİK HASSAS TERAZİ Maksimum Kapasite 220 g Minimum Yük 00 mg Okunabilirlik 0,1 mg Dara Ağırlığı -310 g Tekrarlanabilirlik 0,1 mg Lineerlik ±0,2 mg Stabilizasyon Süresi 3,5 sn Hassasiyet Sapması 1 ppm/°C sıcaklık +10 ° - +40°C Çalışma sıcaklığı +10° - +40° C Ekran LCD (backlight)	
GLF Saf Su Cihazı Kapasite: 6 litre/saat Soğutma su tüketimi: 100 litre/saat Su basıncı: 4 psi (min) Isıtma elamanı: 2 tane 2.4 kW	

PH Metre pH-aralığı -2.000 ~20.000 pH-çözünürlüğü Kullanıcı tarafından tanımlanabilen: 0.001 / 0.01 / 0.1 pH- bağıl hassasiyet ± 0.002 mV- aralığı -2000.0 ~ 2000.0 mV- çözünürlüğü Kullanıcı tarafından tanımlanabilen: 0.1 / 1 mV- bağıl hassasiyet ± 0.2 Sıcaklık aralığı °C MTC: -30.0 to 130.0ATC: -5.0 to 130.0 Sıcaklık hassasiyeti °C ± 0.1 Ekran TFT 4.3” Güç tüketimi 9-12V/10W Konsantrasyon aralığı 1.00E-9 ~9.99E+9 Konsantrasyon hassasiyeti +/- 0.5%	
VELP TX4 Digital Vortex Mixer V Cihaz Tipi : Analog, Masa üstü Orbital Çap: 4,5 mm Karıştırma Hızı: 3000 rpm ayarlanabilir Çalışma Modu: Infrared sensörlü çalışma ve sürekli mod Zamanlayıcı Süresi : 0 ila 999 saat 59 dakika arası ayarlanabilir Ekran: LCD Gövde Malzemesi: Çinko alaşımı ve teknopolimer Destek Sistemi: Kaymayı önleyen 4 ayak Ağırlık: 2,7 Kg Ebatlar (GxYxD): 150 x130 x165 mm Koruma Sınıfı CEI EN 60529: IP 42 Güç: 15 Wortex	
Spektrofotometre / multiplate reader Işık kaynağı: Xenon flaşı Detektör: fotodiyot Dalga boyu seçimi: monokromatör Dalga boyu aralığı:200~999 nm, 1 nm'lik artışlarla Monokromatör bant genişliği:5nm Dinamik aralık 0 - 4,0 OD çözüm:0.0001 OD Monokromatör dalga boyu doğruluğu+ 2 nm ve tekrarlanabilirliği+ 0.2 nm OD doğruluğu 0 OD 2: + % 1 + 0.010 OD 2 OD 2.5: + % 3 + 0.010 OD Okuma hızı (kinetik) 96 kuyu: 15 saniye 384 kuyu: 31 saniye	

OTOMATİK PİPET 1-10 mL Ayarlanabilir Mikro 12 Kanallı Otomatik Pipet 30-300 µl Eppendorf	
96 Kuyucuklı plate Ebat 128 x 86 mm Materyal PS Taban Şekli U Kuyucuk çapı 8 mm çapında Kuyucuk derinliği 10 mm	

Kullanılan kimyasallar

- Tirozinaz enzimi (Sigma T3824, 50,000 ünite, ≥ 2000 ünite/mg katı),
- Enzim substratı olarak L-Dopamin
- Tampon hazırlamada, disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ve sodyum fosfat (Na_2HPO_4) kullanılmıştır.
- NaCl, Etanol, Metanol, HCl, DMSO

Cihazlar

- Çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında, metler toledo marka pH/mV/°C metre ve elektrot kullanılmıştır.
- Deneysel çalışmalarda multiplate okuyucu kullanılmıştır. Cihazdaki datalar GEN5 programı ile değerlendirilmiştir.

Kullanılan Programlar

Deneysel çalışmalarda enzim-ligand etkileşimlerini moleküler seviyede belirlemek için LeadIT 2.3.2 ve Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programları ile grafiklerin hazırlanmasında ve hesaplamalarında Microsoft Office programı kullanılmıştır.

Çözeltiler

1. 0,1 mM fosfat tamponu: 1,36 gram NaH_2PO4 tartılarak 80 ml saf suda çözüldü. 0,1 M NaOH ile pH'ı 6,8 olarak ayarlandı. Daha sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
2. Subsrat:2,5 mg L-DOPA tartılarak 5 ml tamponda çözüldü.
3. Enzim: Enzim 45 U/ml olacak şekilde tamponda çözüldü.
4. Moleküller 1 mg/ml DMSO da çözüldü. Daha sonra bu numuneler çözünme durumları ve inhibisyon etkilerine göre 10-50 kat saf su ile seyreltildi.

3.2. Deneysel Yöntem

Tirozinaz enzim aktivitesi aşağıda belirtilen yönteme göre belirlenmiştir(Tomita ve ark. 1992). Enzim aktivitesi 475 nm de absorbans ölçümü ile yapıldı. Absorbans ölçümleri mikroplate okuyucuda 96'lık platelerde yapılmıştır. Kullanılan çözeltiler ve miktarları çizelge de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tirozinaz Enzim Aktivitesi Hazırlanışı

Tyrosinase assay	
Madde	Pipetleme miktarı (µL)
100 mM fosfat tamponu	80
L-DOPA (2.5 mM in buffer)	20
Enzim	10
Saf su	70

İnhibisyon çalışmaları için moleküller 1 mg/ml olacak şekilde DMSO da çözüldü. Daha sonra 100 mikro litre stoktan alınıp üzerine 900 mikro litre saf su eklendi. Reaksiyon ortamına eklenen inhibitör hacmi kadar saf su hacminden azaltıldı. İnhibitörün katılmadığı reaksiyon kontrol olarak kabul edildi. Maddelerin inhibisyon etkileri kontrolle yüzdelik olarak kıyaslanarak belirlendi. %aktivite-[Konsantrasyon] grafiklerinin eğrilerinden IC_{50} değerleri hesaplandı.

Doking Çalışmaları

Komplekslerin doking çalışmaları Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programının geçici lisansı kullanılarak yapılmıştır. Ligandların Doking çalışmaları için BioSolveIT, Germany şirketi tarafından yazılımı yapılan The FlexX programının LeadIT 2.3.2 paketi kullanılmıştır. Enzimin üç boyutlu yapısı http://www.rcsb.org/pdb sitesinden 2Y9W (**Method:** X-RAY DIFFRACTION, **Resolution:** 2.3 Å, **R-Value Work:** 0.181) kodu ile verilen kristal yapı kullanılmıştır. Referans ligand olarak di(hydroxyethyl)ether (PEG) kullanılmıştır.

Moleküllerin Gaussian programı kullanılarak moleküllerin SDF formatları hazırlandı.

LeadIT programı ile Docking çalışması aşağıda belirlenen protokolle yapılmıştır.

1- Web sayfasından enzimin üç boyutlu yapısı indirildi.

2- Enzimin Docking yapılacak alt birimi seçildi.

3- Enzimin ligandı bağlı olduğu, doking yapılacak alan (Gried 7.5) 7.5 Å olarak seçildi.

4- Docking yapılacak alandaki sular çıkarılıldı.

5- Aktif bölgedeki Amino asitlerin yükleri kontrol edildi.

6- Molekül seçilecek.

7- Doking işlemi yapılmıştır.

Program bize aşağıda bildirtilen sonuçları vermektedir.

Score: ΔG (toplam etkileşimi ifade etmektedir.)

Match: Hidrojen bağı etkileşimini

Lipo: Hidrofobik etkileşimi

Ambig: Van der walls etkileşimi

Clash: sterik etkileşimi

Match: Toplam etkileşim sayısını ifade etmektedir.

Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programında komplekslerin doking çalışmalarında programın kullanılışı

1. File menüsünden Import Molecule kullanılarak protein (enzim) programa alındı.
2. Protein üzerinde çalışma yapılacak şekilde ayarlamalar yapıldı.
3. Enzim üzerindeki oyuklar (Cavit) belirlendi.
4. Docking sekmesindeki Docking Wizard kullanılarak doking yapılacak molekül programa aktarıldı.
5. Docking ayarları yapıldıktan sonra program çalıştırıldı.
6. Docking sonuçları "Import Docking Result" seçeneğinden çalışmada kullanılan Docking programa sırasıyla çekildi.
7. Çekilen moleküldeki en uygun model seçilerek "Convert Pose to Ligand" seçeneğiyle liganda çevrildi.
8. View menüsünden Hidrojen bağ etkileşimlerini göster seçeneğiyle hidrojen bağlarını gösterilmesi sağlandı. Burada hidrojen bağının bağlanma şekli enerjisi ve uzunluğu gösterilmektedir.
9. Ligand map seçeneğinde hangi amino asitle hidrojen bağı yaptığı göstermektedir. Ayrıca buradaki sterik etkileşimleri hangi amino asitle yapmış olduğu da görülebilmektedir. Bu sterik etkileşimlerin enerji ve uzunluklarını da hesaplanmaktadır.
10. Docking görselleri Ekran Alıntı Aracı kullanılarak alındı.

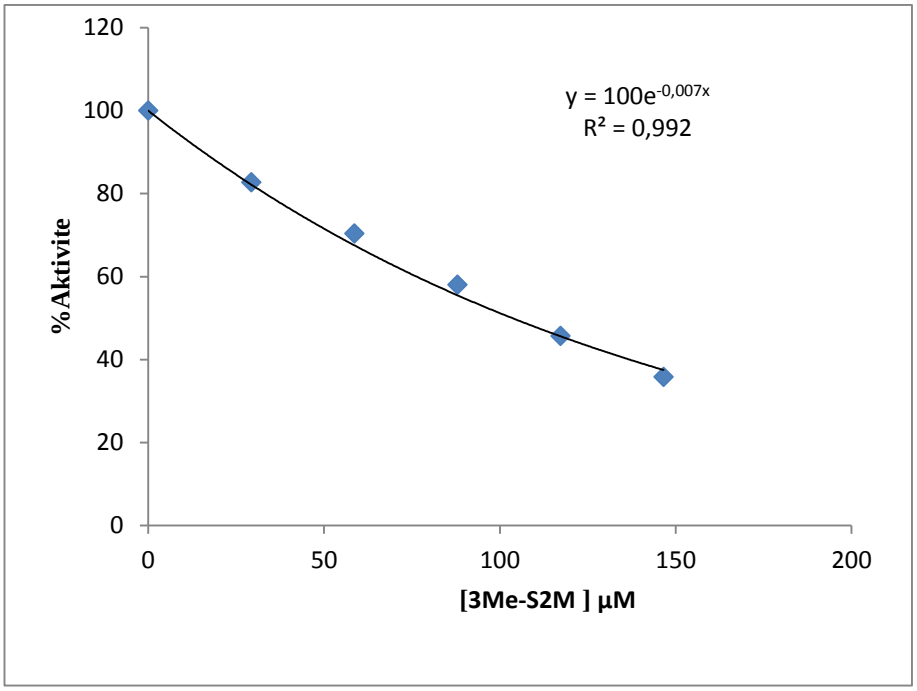
4. BULGULAR

Yapılan tez çalışmasında üç adet ligand ve onların bakır ve paladyum komplekslerinin tirozinaz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi incelenmiştir. Moleküllerin hepsi enzim üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Sonuçlar çizelge halinde aşağıda verilmiştir. İnhibisyon çalışmaları sonucu elde edilen %aktivite–[konsantrasyon] grafikleri şekil 4.1- 4.9 arasında verilmiştir.

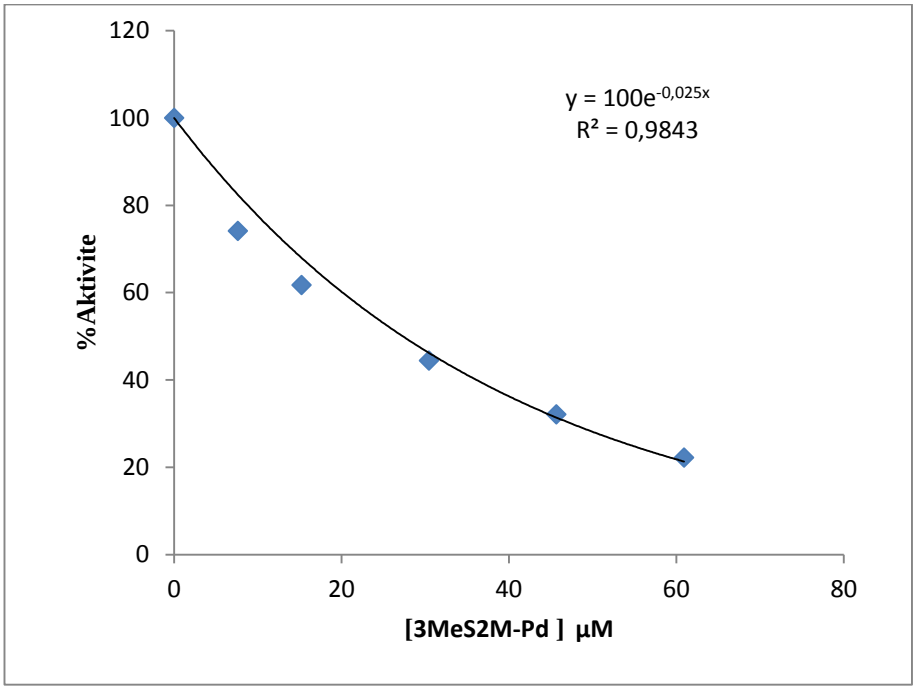
Çizelge 4.1. Tirozinaz Enzim Aktivitesi İnhibisyon Etkisi Sonuçları

No	**Bileşikler**	IC_{50} değerleri (μM)
1.	3Me-S2M **(L1)**	99
2.	3MeS2M-Pd ***Pd(L1)₂***	27
3.	3MeS2M-Cu ***Cu(L1)₂***	46
4.	4Me-S2M **(L2)**	16
5.	4Me-S2M-Pd ***Pd(L2)₂***	20
6.	4Me-S2M Cu ***Cu(L2)₂***	12.8
7.	4Me-S1M **(L3)**	27
8.	4Me-S1M-Pd ***Pd(L3)₂***	23
9.	4Me-S1MCu ***Cu(L3)₂***	9.7

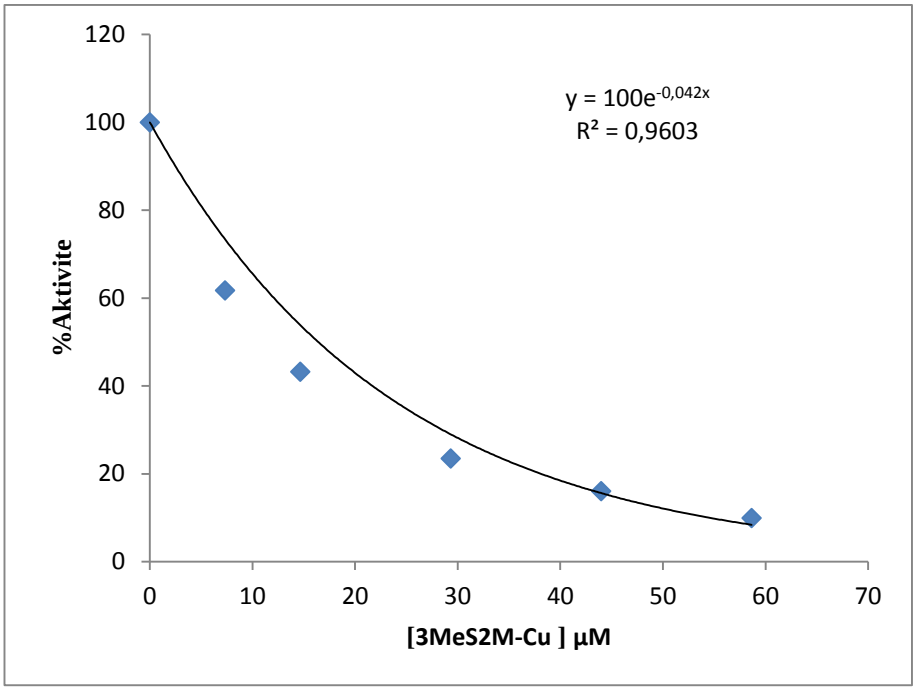
Ligand 1,2,3 değerleri 16 ile 99 μm aralıkta IC_{50} değerleri ile inhibisyon etkisi göstermiştir. Paladyumlu (Pd) bileşikler 20 μM ile 27 μM değerleri arasında IC_{50} değerleri ile bakırlı (Cu) komplekslerde ligandlarla etkileşimlerinde 9.7 μM ile 46 μM IC_{50} değerleri ile değerleri arasında inhibisyon etkisi göstermiştir. En yüksek inhibisyon etkisi gösteren kompleks bakır (Cu) ile ligand 3 yapmış olduğu komplekstir. En düşük inhibisyon etkisi gösteren kompleks bakır (Cu) ile ligand 1 yapmış olduğu komplekstir. Sonuçlardan da anladığımız kadarıyla metaller ile ligandların yapmış olduğu komplekslerde ligandların inhibisyon potansiyelini artırmıştır.



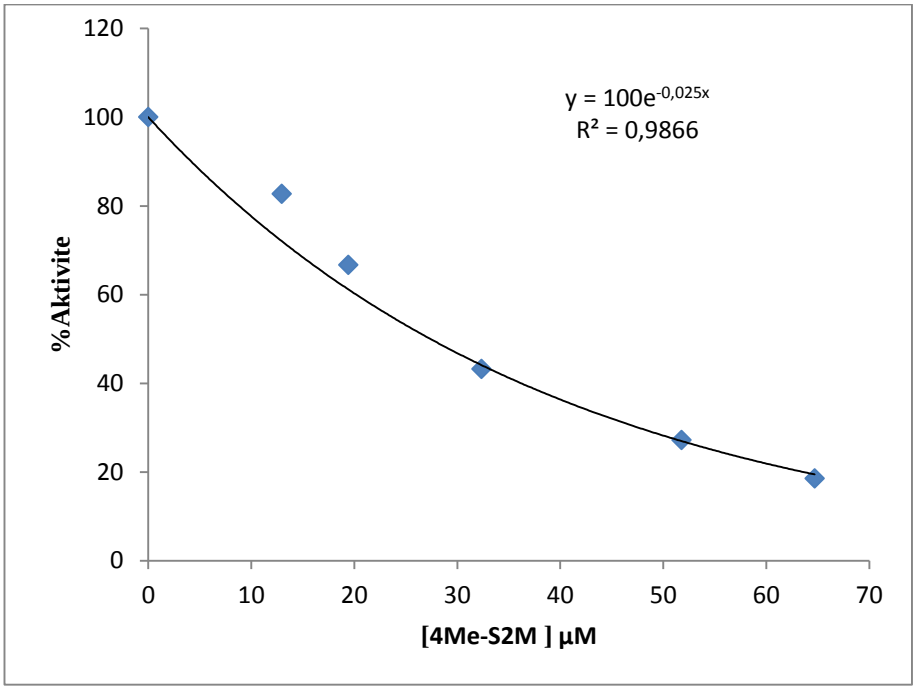
Şekil 4.1. 1'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



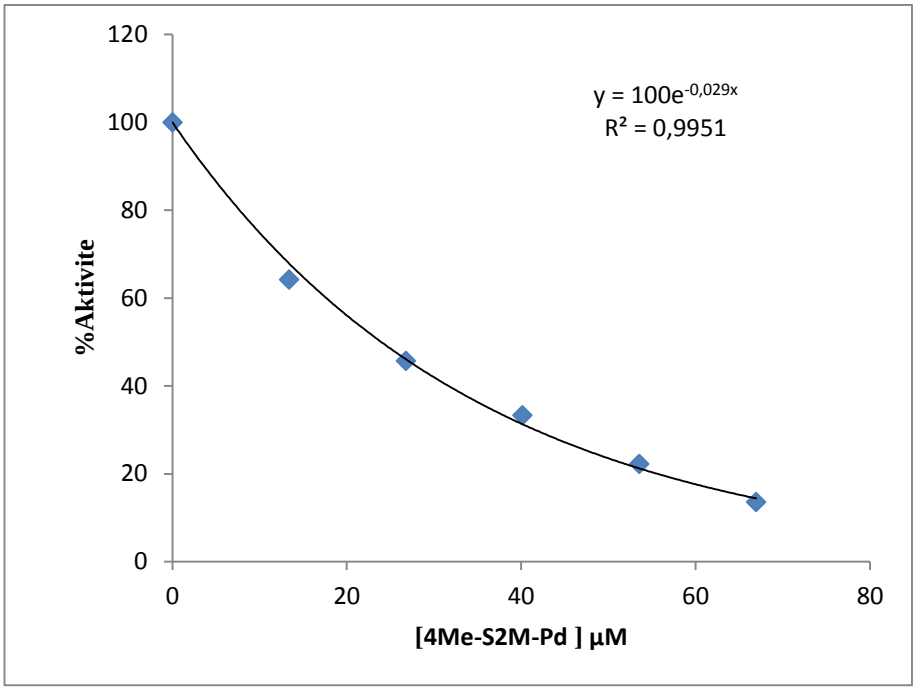
Şekil 4.2. 2'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



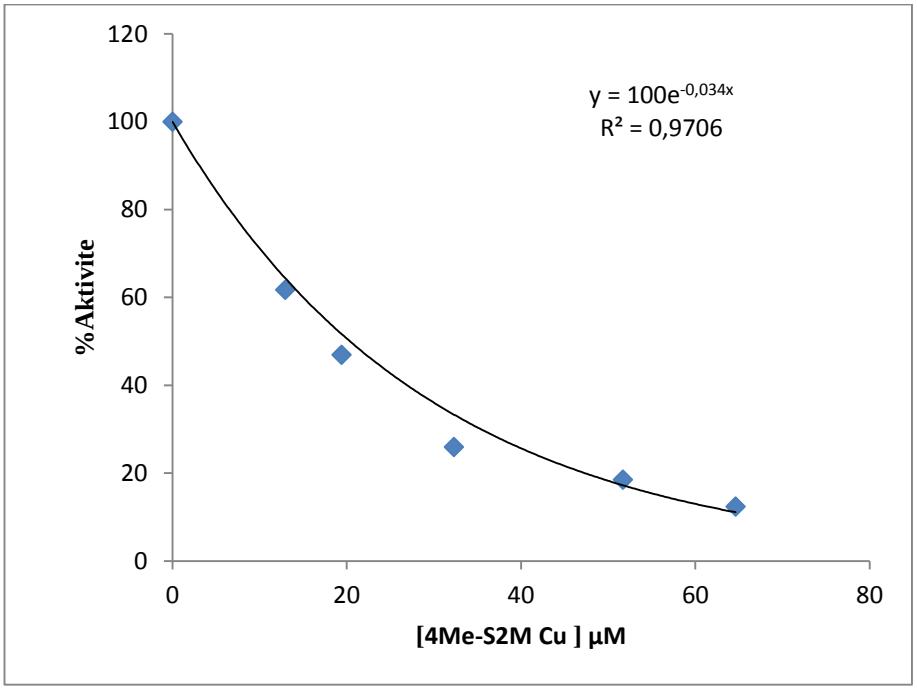
Şekil 4.3. 3'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



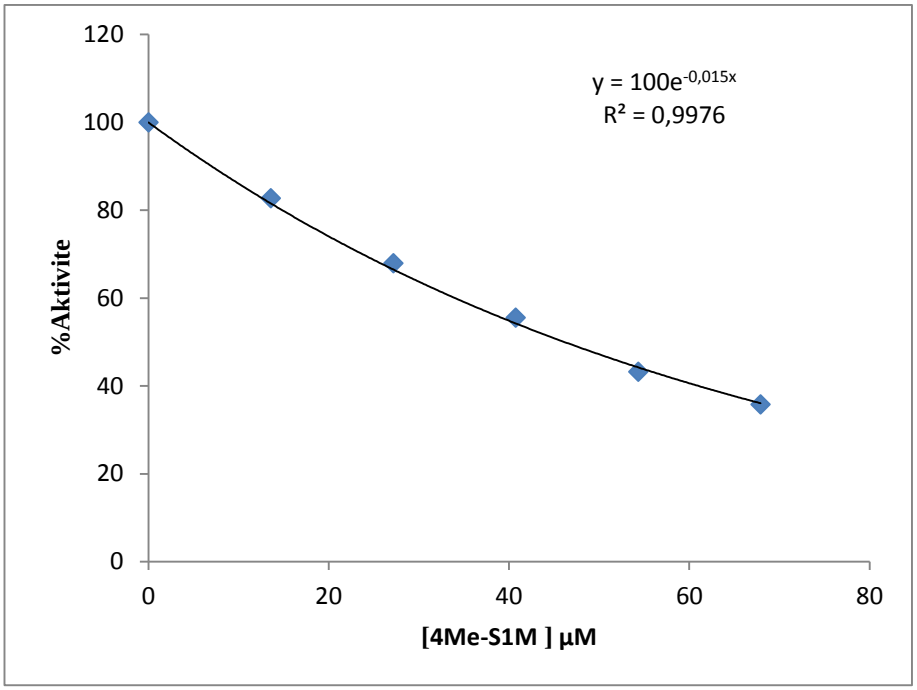
Şekil 4.4. 4'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



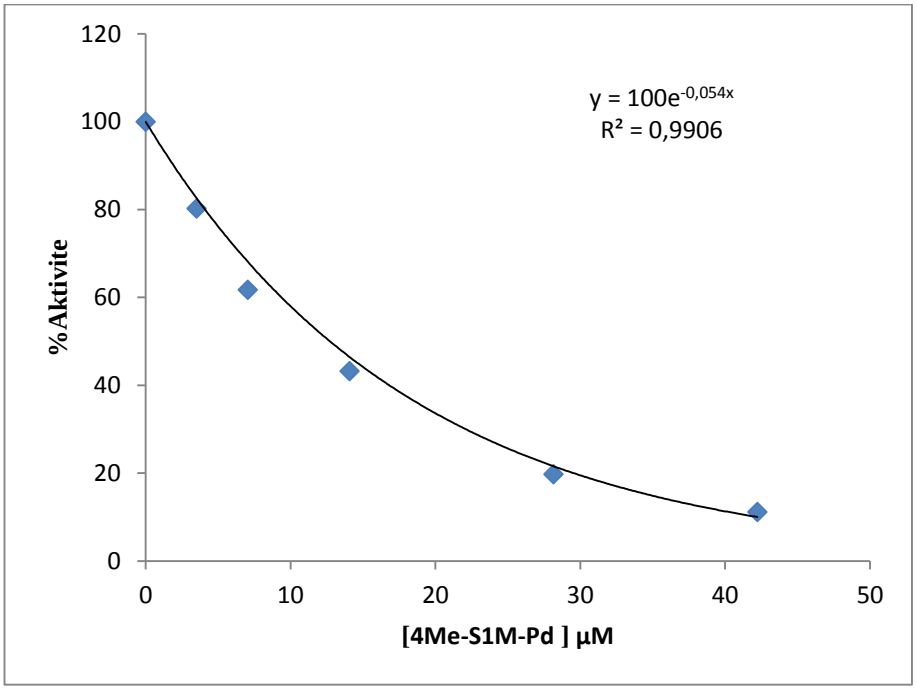
Şekil 4.5. 5'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



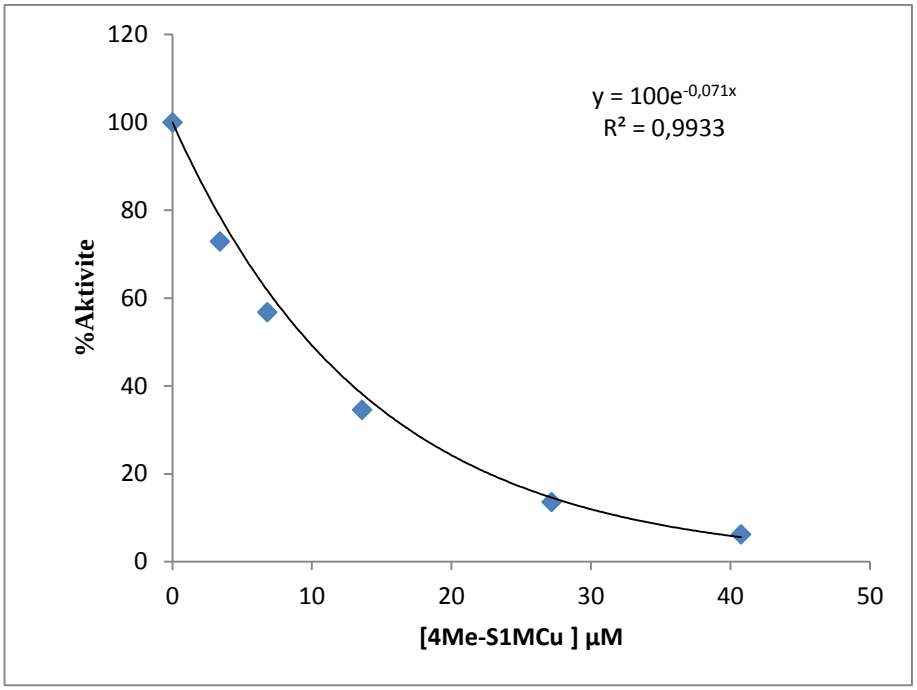
Şekil 4.6. 6'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



Şekil 4.7. 7'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



Şekil 4.8. 8'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi



Şekil 4.9. 9'nolu Bileşiğin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

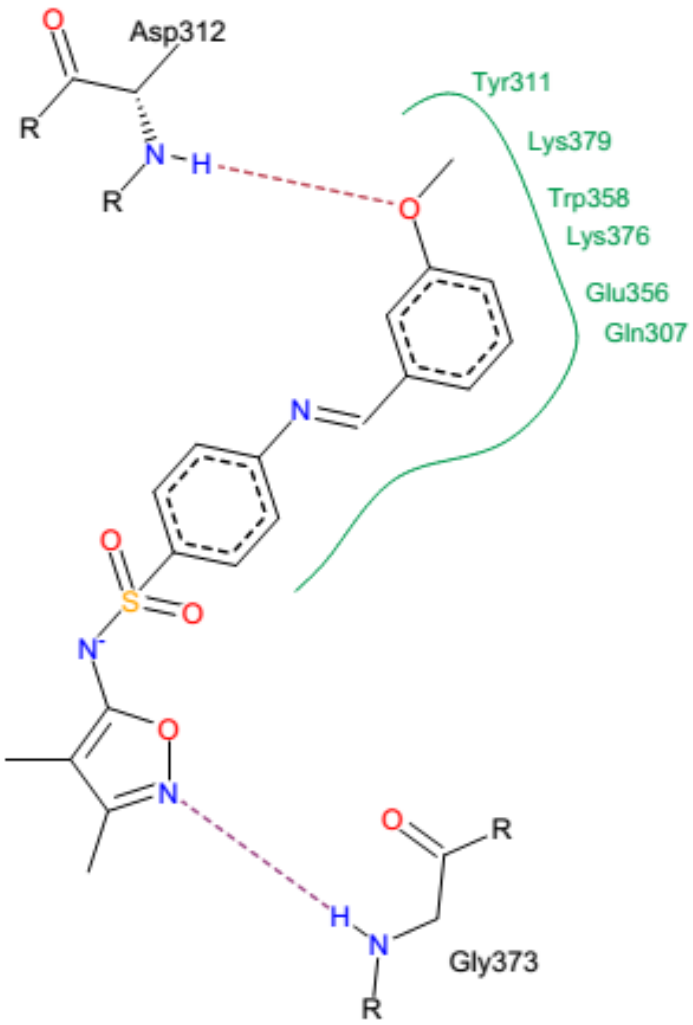
Üç ligand için doking çalışmaları LeadIT 2.3.2 programı kullanılarak yapılmıştır. Docking sonuçları Çizelge 4.2 verilmiştir. Muhtemel bağlanma modelleri Şekil 4.10-12 verilmiştir. Enzimin aktif bölgesindeki amino asitlerin listesi aşağıdaki gibidir.

ILE A 17 (ile);
ARG A 95 (arg+);
ALA A 304 (ala);
GLN A 307 (gln);
THR A 308 (thr);
TYR A 311 (tyr);
ASP A 312 (asp-);
TYR A 314 (tyr);
LEU A 355 (leu);
GLU A 356 (glu-);
ASP A 357 (asp-);
TRP A 358 (trp);
GLU A 359 (glu-);
THR A 360 (thr);
PHE A 363 (phe);
SER A 364 (ser);
PHE A 368 (phe);
VAL A 371 (val);
LYS A 372 (lys+);
GLY A 373 (gly);
LYS A 374 (lys+);
LYS A 376 (lys+);
LYS A 379 (lys+);

Çizelge 4.2. Ligandların docking sonuçları

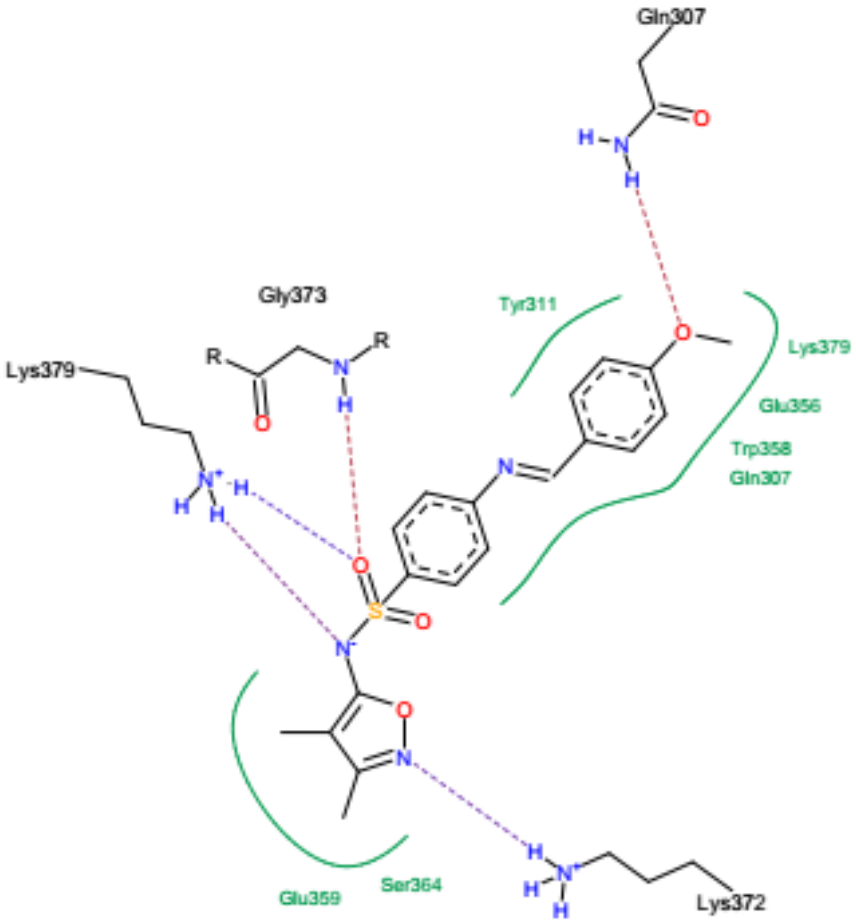
Bileşikler	3Me-S2M **(L1)**	4Me-S2M **(L2)**	4Me-S1M **(L3)**
Bağlanma enerjisi	-8.681	-19.838	-20.792
Hidrojen bağ Enerjisi	-10.896	-22.216	-19.726
Hidrofobik etkileşmeler	-7.714	-10.383	-9.925
Van der walls etkileşmeler	-4.298	-5.856	-6.039
Sterik engelleme enerjisi	4.627	9.017	5.297
Dönebilen bağların enerjisi	4.200	4.200	4.200
Etkileşimdeki toplam bağ sayısı	9	15	14

Doking sonuçları ile inhibisyon etkisi sonuçları arasında bir paralellik gözlenmektedir. Örneğin ligand 3 (27 μM) ile ligand 2 (16 μM)'nin inhibisyon etkisi sonuçlarına bakıldığında yaklaşık olarak uyum halinde olduğu görülmektedir. Bağlanma enerjileri L1= 8.681, L2=19.838, L3=20.792 olarak bulunmuştur. Ligandlarla enzimin etkileşmelerinde Hidrojen bağ, Hidrofobik, Van der walls, sterik etkileşimlerinin rol aldığı gözlenmektedir.



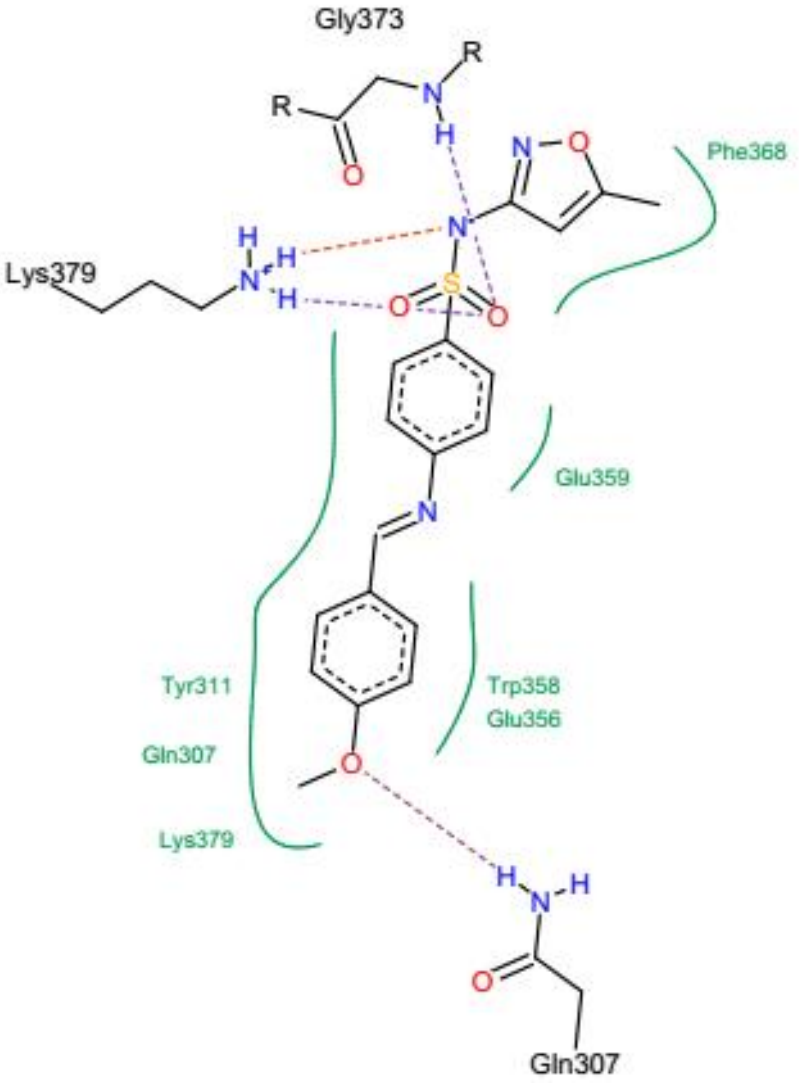
Şekil 4.10. L1 in Tirozinaz enzimi ile muhtemel etkileşimi

Şekil 4.10'da Asp 312 amino asiti yan zinciri ile molekülün metoksiye bağlı benzen halkasının OH grubu arasında hidrojen bağ oluşmuştur. Tyr311, Lys379, Trp358, Lys376, Glu356, Gln307 gruplar arasında hidrofobik etkileşmeler meydana gelmiştir**.** Aynı zaman da Gly373'nolu amino asitin yan zincirindeki azotun hidrojeni ile molekülün izalosyon halkası üzerindeki azot ile hidrojen bağ meydana gelmiştir.



Şekil 4.11. L2'nin Tirozinaz enzimi ile muhtemel etkileşimi

Şekil 4.11'da Gln307 amino asiti yan zinciri ile molekülün metoksi bağlı benzen halkasının Oksijeni arasında hidrojen bağ oluşmuştur. Lys379, Glu356, Trp358, Gln307, Tyr311 gruplar arasında hidrofobik etkileşmeler meydana gelmiştir**.** Gly373'nolu amino asitin yan zincirindeki azotun hidrojeni ile sülfonamide bağlı oksijen ile hidrojen bağ meydana gelmiştir. Lys379'nolu amino asitin yan zincirindeki azotun hidrojeni ile molekülün izoksazol izalosyon halkasına bağlı azot ile hidrojen bağ yapmıştır. Lys372'nolu amino asitin yan zincirindeki azotun hidrojeni ile molekülün izoksazol izalosyon halkası üzerindeki azot ile hidrojen bağ meydana gelmiştir. Glu359, Ser364 gruplar arasında hidrofobik etkileşmeler meydana gelmiştir**.** Lys379 amino asiti yan zinciri ile sülfol grubu oksijeni ile hidrojen bağ yapmıştır.



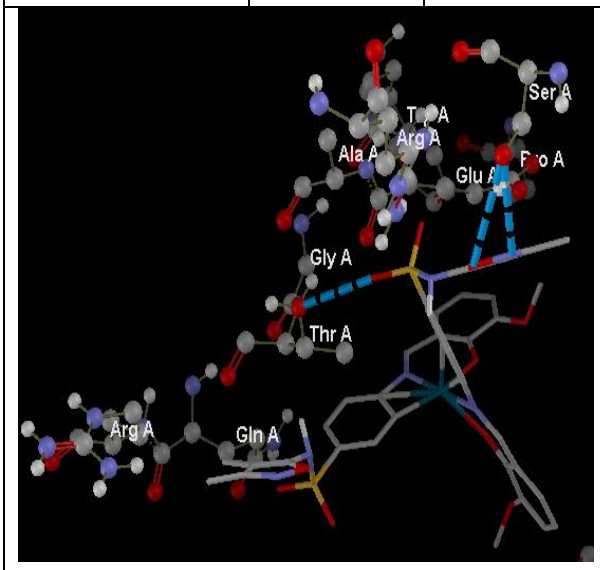
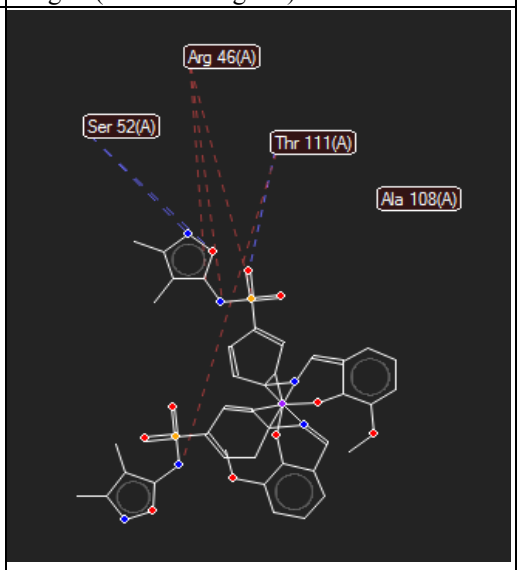
Şekil 4.12. L3'ün Tirozinaz enzimi ile muhtemel etkileşimi

Şekil 4.12'de Gln307 amino asiti yan zinciri ile molekülün metoksi bağlı benzen halkasının oksijen grubu arasında hidrojen bağ oluşmuştur. Lys379, Gln307, Tyr311, Trp358, Glu356, Glu 359, gruplar arasında hidrofobik etkileşmeler meydana gelmiştir**.** Gly373'nolu amino asitin yan zincirindeki azotun hidrojeni ile sülfonamidin oksijeni ile hidrojen bağ meydana gelmiştir. Lys379'nolu amino asitin yan zincirindeki azotun hidrojeni ile sülfol grubuna bağlı oksijen ile hidrojen bağ yapmıştır.

Çizelge 4.3. Molegro virtual docker programdan elde edilen metal kompleksleri-enzim etkileşimi docking genel sonuçları

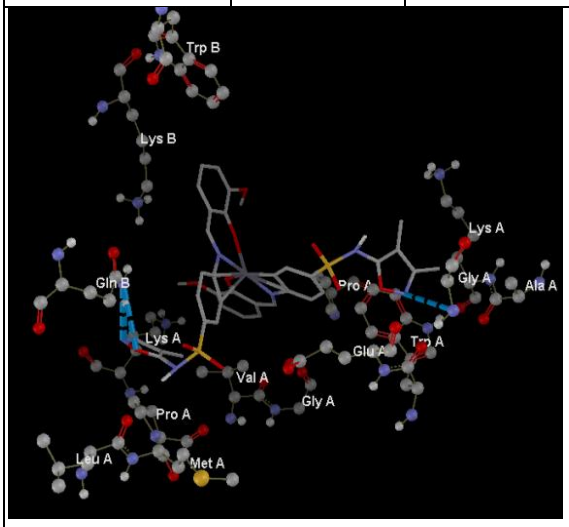
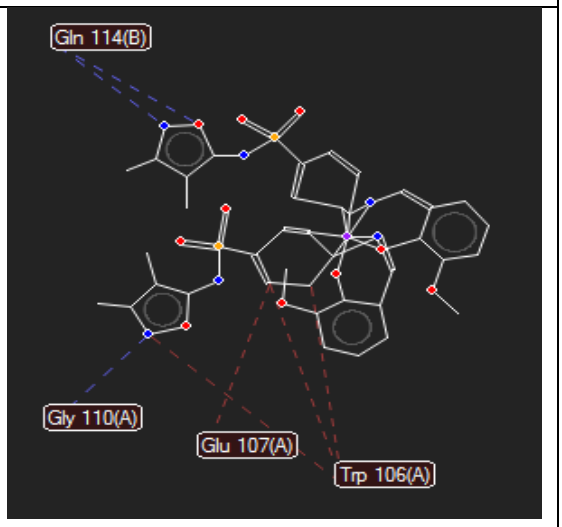
Name	Ligand	Plants Score	MolDock Score	Rerank Score
Docking 2	1	-76.7914	-153.444	-90.8738
	2	-75.8083	-137.217	-94.3128
	3	-74.0077	-152.352	-94.0462
	4	-73.1564	-138.533	-88.2274
	5	-71.6691	-126.068	-79.9617
Docking 3	1	-84.048	-160.35	-102.458
	2	-82.0924	-154.388	-105.123
	3	-80.8393	-152.681	-76.7666
	4	-80.2901	-152.19	-109.879
	5	-80.1445	-154.393	-108.926
Docking 5	1	-76.145	-150.161	-98.5806
	2	-74.0918	-135.864	-92.2149
	3	-70.7556	-135.525	-62.6516
	4	-70.5133	-130.079	-86.334
	5	-69.8804	-146.538	-95.7575
Docking 6	1	-70.1015	-162.814	-104.636
	2	-69.6631	-152.123	-97.3471
	3	-69.3007	-154.013	-94.3312
	4	-69.2077	-143.665	-98.6955
	5	-68.915	-150.159	-80.1606
Docking 8	1	-75.9686	-126.397	-69.6566
	2	-73.2418	-114.642	-66.3791
	3	-68.6291	-134.413	-77.0917
	4	-68.2439	-129.936	-53.8028
	5	-66.4287	-137.269	-82.312
Docking 9	1	-72.363	-155.56	-85.8034
	2	-71.9528	-150.905	-82.4334
	3	-71.7657	-153.316	-88.1122
	4	-70.9251	-142.439	-69.0702
	5	-67.2479	-152.347	-88.6494

Çizelge 4.4. Kompleks 2. (3MeS2M-Pd) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları

Etkileşim Türü 2. Molekül	Uzunluk (Å)	Energy (kcal/mol)	Etkileşimdeki amino asit ve molekülde etkileştiği atom
Hydrogen bond	3.16896 3.38335 2.89621	-2.1552 -0.967887 -2.5	Thr111 (Sülfonile bağlı O) Ser52 (İzoksasol halkası üzerindeki O) Ser52 (İzoksasol halkası üzerindeki N)
Steric Etkileşmeler	3.20 3.10 2.46 3.05	0.63 1.24 5.07 1.49	Thr111 (Sülfonile bağlı O) Arg46 (İzoksasol halkası) Arg46 (İzoksasol halkasına bağlı N) Arg46 (Sülfonile bağlı O)
			

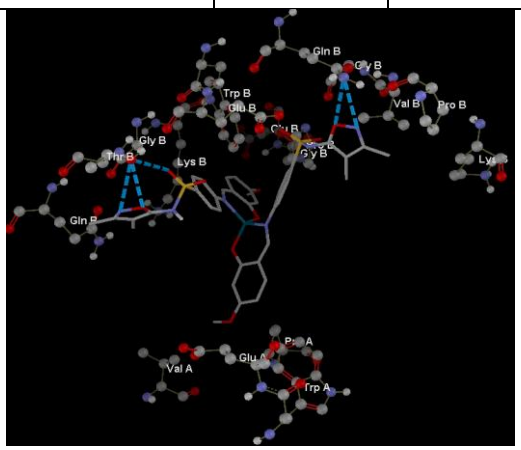
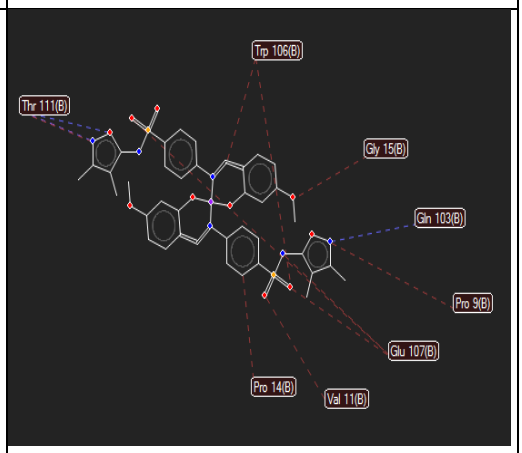
Çizelge 4.4'de verilere göre 3Me-S2M ligandın Paladyumlu kompleksinin inhibisyon etkisinde enzim ile üç hidrojen bağı ve dört sterik etkileşimler oluşmuştur. Enzimin Ser52(A) ve Thr111(A) amino asitleri hidrojen bağı etkileşiminde, Thr111(A) ve Arg46(A) amino asitleri sterik etkileşmelerde rol oynamıştır.

Çizelge 4.5. Kompleks 3. (3MeS2M-Cu) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları

Etkileşim Türü 3. Molekül	Uzunluk (Å)	Energy (kcal/mol)	Etkileşimdeki amino asit ve molekülde etkileştiği atom
Hydrogen bond	3.3869 2.91989 3.53818	-1.0655 -2.5 -0.0793014	Gln114(B) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Gln114(B) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Gln110(A) (İzoksasol halkası üzerindeki N)
Steric Etkileşmeler	2.85 2.80 2.83 3.17	2.7 3.05 2.84 0.8	Trp106(A) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Trp106(A) (İzoksasol halkası ile) Trp106(A) (İzoksasol halkası ile) Glu107(A) (İzoksasol halkası ile)
			

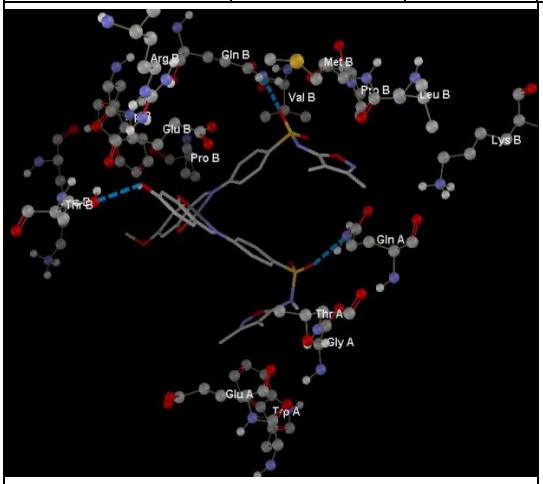
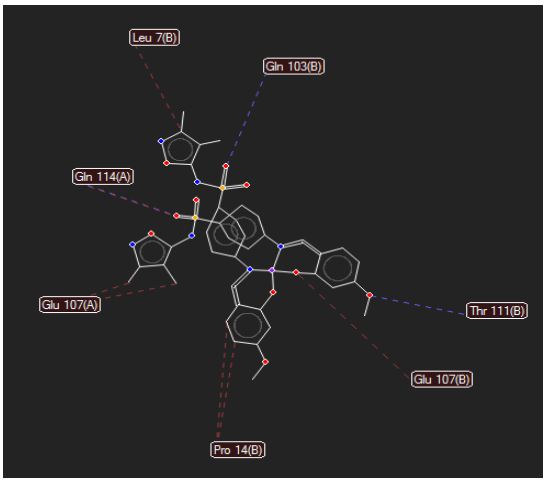
Çizelge 4.5'te verilere göre 3Me-S2M ligandın bakırla kompleksinin inhibisyon etkisinde enzim ile üç hidrojen bağı ve dört sterik etkileşimler oluşmuştur. Enzimin Gln114(B) ve Gln110(A) amino asitleri hidrojen bağı etkileşiminde, Trp106(A) ve Glu107(A) amino asitleri sterik etkileşmelerde rol oynamıştır.

Çizelge 4.6. Kompleks 5. (4Me-S2M-Pd) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları

Etkileşim Türü 5. Molekül	Uzunluk (Å)	Energy (kcal/mol)	Etkileşimdeki amino asit ve molekülde etkileştiği atom
Hydrogen bond	3.1003 2.90057 3.12355 2.90057 2.84926	-2.49849 -2.5 -2.38227 -2.5 -2.5	Thr111(B) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Thr111(B) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Thr111(B) (Sülfonile bağlı O) Gln103(B) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Gln103(B) (İzoksasol halkası üzerindeki N)
Steric Etkileşmeler	2.88 3.14 2.55 2.84 3.22 2.97 3.22 2.96 2.94 3.10	2.54 0.97 4.57 2.76 0.47 2.02 0.46 2.06 2.21 1.22	Glu107(B) (İzoksasol halkasına bağlı N) Glu107(B) (Sülfonile bağlı O) Glu107(B) (Sülfonile bağlı O) Gly15(B) (İzoksasol halkasına bağlı O) Pro9(B) (İzoksasol halkasına bağlı N) Val11(B) (Sülfonile bağlı O) Trp106(B) (Sülfonile bağlı O) Trp106(B) (İzoksasol halkası ile) Pro14(B) (İzoksasol halkasına ile) Thr111(B) (İzoksasol halkası üzerindeki N)
			

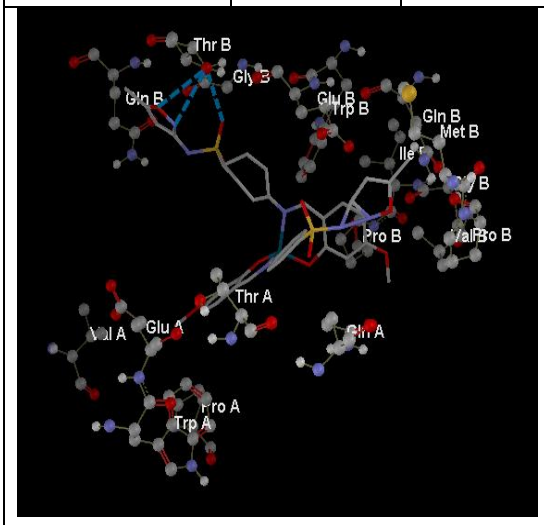
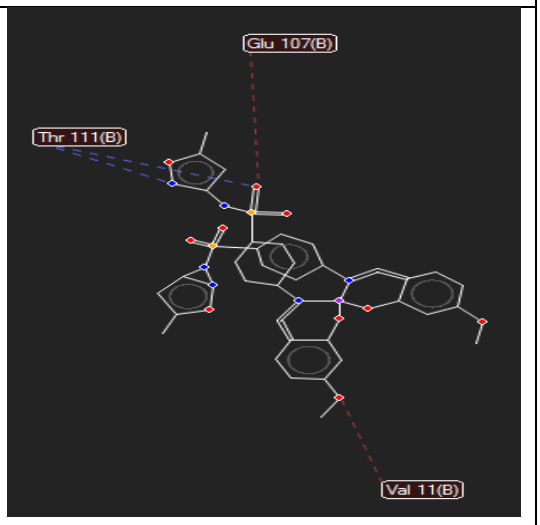
Çizelge 4.6'da verilere göre 4Me-S2M ligandın paladyumlu kompleksinin inhibisyon etkisinde enzim ile beş hidrojen bağı ve on sterik etkileşimler oluşmuştur. Enzimin Thr111(B) ve Gln103(B) amino asitleri hidrojen bağı etkileşiminde, Glu107(B), Gly15(B), Pro9(B), Val11(B), Trp106(B), Pro14(B) ve Thr111(B) amino asitleri sterik etkileşmelerde rol oynamıştır.

Çizelge 4.7. Kompleks 6.(4Me-S2M-Cu) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları

Etkileşim Türü 6. Molekül	Uzunluk (Å)	Energy (kcal/mol)	Etkileşimdeki amino asit ve molekülde etkileştiği atom
Hydrogen bond	2.67528 2.61606 2.85368	-2.1048 - 0.430174 -1.35818	Gln114(A) (Sülfonile bağlı O) Gln114(A) (Sülfonile bağlı O) Thr111(B) (İzoksasol halkasına bağlı O)
Steric Etkileşmeler	3.23 3.16 2.85 2.91 2.97 3.27 3.24 3.08 3.29 3.13	0.44 0.85 2.72 2.38 2.01 0.16 0.36 1.36 0.08 1.03	Pro14(B) (İzoksasol halkasına ile) Pro14(B) (İzoksasol halkasına ile) Glu107(A) (İzoksasol halkası bağlı metil grup ile) Glu107(A) (İzoksasol halkası bağlı metil grup ile) Gln114(A) (Sülfonile bağlı O) Gln114(A) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Pro14(B) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Glu107(B) (Bakır ile kompleks oluşumuna katılan benzene bağlı O) Leu7(B) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Leu7(B) (İzoksasol halkası ile)
			

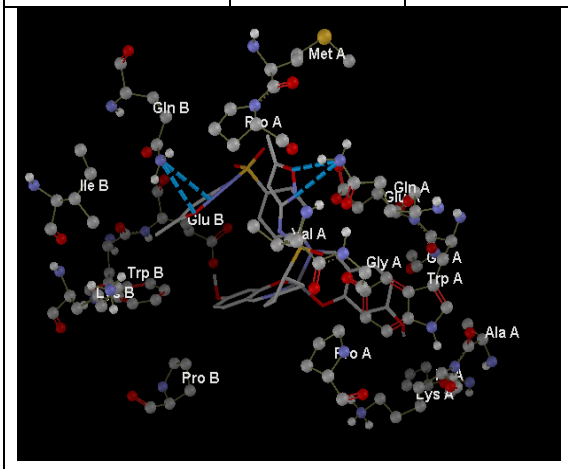
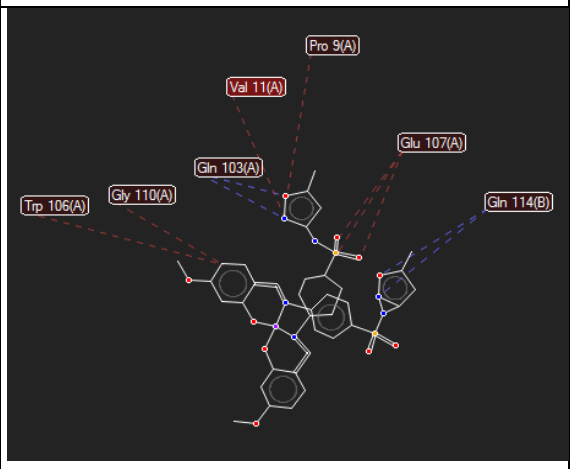
Çizelge 4.7'de verilere göre 4Me-S2M ligandın bakırla kompleksinin inhibisyon etkisinde enzim ile üç hidrojen bağı ve on sterik etkileşimler oluşmuştur. Enzimin Gln114(A) ve Thr111(B) amino asitleri hidrojen bağı etkileşiminde, Pro14(B), Glu107(A), Gln114(A), Glu107(B) ve Leu7(B) amino asitleri sterik etkileşmelerde rol oynamıştır.

Çizelge 4.8. Kompleks 8.(4Me-S1M-Pd) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları

Etkileşim Türü 8. Molekül	Uzunluk (Å)	Energy (kcal/mol)	Etkileşimdeki amino asit ve molekülde etkileştiği atom
Hydrogen bond	3.37215 3.29026 3.09775	-1.13927 -0.283605 -2.5	Thr111(B) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Thr111(B) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Thr111(B) (Sülfonile bağlı O)
Steric Etkileşmeler	3.27 3.27 2.89 2.65 3.26 3.28 3.28	0.18 0.21 2.47 3.95 0.22 0.09 0.14	Thr111(B) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Gly110(B) (Sülfonile bağlı O) Glu107(B) (Sülfonile bağlı O) Val11(B) (İzoksasol halkasına bağlı O) Pro14(B) (İzoksasol halkasına ile) Gly12(B)) (İzoksasol halkasına bağlı O) Gln114(A) (Sülfonile bağlı O)
			

Çizelge 4.8'de verilere göre 4Me-S1M ligandın paladyumlu kompleksinin inhibisyon etkisinde enzim ile üç hidrojen bağı ve yedi sterik etkileşimler oluşmuştur. Enzimin Thr111(B) amino asitleri hidrojen bağı etkileşiminde, Thr111(B), Gly110(B), Glu107(B), Val11(B), Pro14(B), Gly12(B) ve Gln114(A) amino asitleri sterik etkileşmelerde rol oynamıştır.

Çizelge 4.9. Kompleks 9. (4Me-S1MCu) Molekülünün Enzim ile Muhtemel Etkileşim Sonuçları

Etkileşim Türü 9. Molekül	Uzunluk (Å)	Energy (kcal/mol)	Etkileşimdeki amino asit ve molekülde etkileştiği atom
Hydrogen bond	3.43586 3.09503 3.44893 3.25969	-0.820712 -2.5 -0.755355 -1.70157	Gln103(A) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Gln103 (B) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Gln114(B) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Gln114 (B) (İzoksasol halkası üzerindeki O)
Steric Etkileşmeler	2.90 3.10 3.14 3.26 3.11 3.23 2.87 3.11 3.07 3.27 3.25 3.30	2.42 1.23 0.97 0.26 1.17 0.44 2.58 1.13 1.38 0.19 0.29 0.02	Glu107(A) (Sülfonile bağlı O) Glu107(A) (Sülfonile bağlı O) Glu107(A) (Sülfonile bağlı O) Glu107(A) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Pro9(A) (İzoksasol halkası üzerindeki O) Val11(A) (Sülfonile bağlı N) Val11(A) (İzoksasol halkası üzerindeki N) Gly110(A)) (İzoksasol halkası ile) Trp106(A) (İzoksasol halkası ile) Trp106(A) (İzoksasol halkası ile) Trp106(B) İzoksasol halkasına bağlı O) Glu107(B) (İzoksasol halkasına bağlı metil grup)
			

Çizelge 4.9'da verilere göre 4Me-S1M ligandın bakırla kompleksinin inhibisyon etkisinde enzim ile dört hidrojen bağı ve on iki sterik etkileşimler oluşmuştur. Enzimin Gln103(A) ve Gln114(B) amino asitleri hidrojen bağı etkileşiminde, Glu107(A), Pro9(A), Val11(A), Gly110(A), Trp106(B) ve Glu107(B) amino asitleri sterik etkileşmelerde rol oynamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tirozinaz, enzimi L-dopanın dopakinona sentezini katalizler. Bu reaksiyon melanogez prosesinin ilk reaksiyonunu oluşturmaktadır. Enzimin inhibisyonu bu prosesi durduracağı için farmakolojik ve kozmetik uygulamaları için önemlidir. Ayrıca gıda maddelerinde meydana gelecek kararmaların da bu enzim inhibisyonu ile önlenebildiği için gıda endüstrisinde de önemli bir yere sahiptir.

Biz yaptığımız çalışmada schiff bazlı sülfonamid moleküllerin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisini *in vitro* ve *in silico* olarak araştırdık. Bileşiklerin inhibisyon büyükten küçüğe doğru etkisi sırasıyla 4Me-S1MCu (9,7μM), 4Me-S2M Cu (12,8 μM), 4Me-S2M (16 μM), 4Me-S2M-Pd (20 μM), 4Me-S1M-Pd (23 μM), 3MeS2M-Pd (27 μM), 4Me-S1M (27 μM), 3MeS2M-Cu (46 μM), 3Me-S2M (99 μM) sonuçları ortaya çıkmıştır. Elde edilen IC_{50} değerleri 9,7-99 μM aralığındadır. *İn vitro* çalışmalar değerlendirildiğinde Paladyum ve bakır kompleksleri ligandların enzim üzerinde etkisini artırmaktadır.

Enzim-ligand etkileşimlerini moleküler seviyede belirlemek için LeadIT 2.3.2 programı kullanılarak doking çalışması yapıldı. Hidrojen bağlarının Ligand-protein etkileşimde etkili olduğu gözlemlendi. Özellikle molekül üzerindeki sülfonil grubuna bağlı oksijenler, izoksasol halkası üzerinde bulunan oksijen ve azot, benzene bağlı metoksi grubunun oksijeni hidrojen bağı oluşumuna katkı sağladığı görülmüştür. Benzen yapılarının hidrofobik etkileşmelerde görev aldığı tespit edilmiştir. Bu etkileşmede protein zinciri üzerindeki Tyr311, Gln307, Trp358, Lys 379, Glu 356 amino asitlerinin katkısı gözlenmiştir.

Komplekslerin enzim ile etkileşimini moleküler seviyede anlamak için Molegro Virtual Docker programı kullanılmıştır. Sterik ve hidrojen bağı etkileşimlerinin etkileşimde önemli olduğu gözlemlenmiştir.

Molegro Virtual Docker programdan elde edilen metal kompleksleri-enzim etkileşimi doking genel sonuçları değerlendirilmesi,

Kompleks yapılarının hepsinde hidrojen bağı ve sterik etkileşimler oluşmuştur. Thr111 ve Gln 114 amino asitinin genel olarak komplekslerle hidrojen bağı oluşturduğu görülmektedir. Glu 107 ve Trp 106 amino asitinin genel olarak komplekslerle sterik etkileşimler oluşturduğu görülmektedir. Hidrojen bağları incelendiğinde kompleks moleküllerden enzim ile etkileşmesi sonucu 4Me-S1M-Pd Molekülün etkileşmesi sonucu Thr111(B) amino asiti Sülfonile bağlı olan Oksijen ile en yüksek enerji -2.5 kcal/mol ve uzunlukta 3.09775 Å bağ oluşturmuştur. Ayrıca yine aynı 4Me-S1M-Pd Molekülde Thr111(B) amino asiti izoksasol halkası üzerindeki Azot (N) ile en düşük enerji 0.283605 kcal/mol 3.29026 Å uzunlukta bağ oluşturmuştur.

Kompleks birleşiklerden en fazla hidrojen bağ oluşturan molekül yapısı 4Me-S2M-Pd Molekülün yapısında 5 adet hidrojen bağ oluşmuştur.

Sonuç olarak; Yapılan çalışmada kullanılan dokuz molekülün farmakolojik, gıda ve kozmetik uygulama için önemli olan Tirozinaz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi tespit edildi. Bakır ve paladyumun, Ligandlarla kompleks oluşturarak onların enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu ligandların farklı gruplarla modifiye edilmiş yeni formları ve onların bakır ve paladyum kompleksleri enzim üzerinde daha etkili olabilir. Daha ileri aşamalarda inhibisyon etkisi güçlü olan komplekslerin *in vivo* olarak çalışmaları yapılabilir. Ayrıca bu kompleksler kozmetik ve gıda uygulamalarında test edilebilir.

6. KAYNAKLAR

Agarwal, P., R. Gupta ve N. Agarwal (2016). "A review on enzymatic treatment of phenols in wastewater." J Biotechnol Biomater **6**(249): 2.

Alyar, S., C. Şen, H. Alyar, Ş. Adem, A. Kalkanci ve U. O. Ozdemir (2018). "Synthesis, characterization, antimicrobial activity, carbonic anhydrase enzyme inhibitor effects, and computational studies on new Schiff bases of Sulfa drugs and their Pd (II), Cu (II) complexes." Journal of Molecular Structure **1171**: 214-222.

Alyar, S., T. Şen, Ü. Ö. Özmen, H. Alyar, Ş. Adem ve C. J. J. o. M. S. Şen (2019). "Synthesis, spectroscopic characterizations, enzyme inhibition, molecular docking study and DFT calculations of new Schiff bases of sulfa drugs." **1185**: 416-424.

Barrett, A. J., J. F. Woessner ve N. D. Rawlings (2012). Handbook of proteolytic enzymes, Elsevier.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko ve L. Stryer (2002). Biochemistry. W. H, Freeman and Company.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko ve L. Stryer (2012). Biochemistry, WH freeman.

Bonesi, M., J. Xiao, R. Tundis, F. Aiello, V. Sicari ve M. R. Loizzo (2019). "Advances in the Tyrosinase Inhibitors from Plant Source." Current medicinal chemistry **26**(18): 3279-3299.

Cabanes, J., S. Chazarra ve F. J. J. o. t. b. Garcia-Carmona (2002). "Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates--reply." **214**(2): 321-328.

Champe, P. C., R. A. Harvey ve D. R. Ferrier (2008). Biochemistry (Lippincott's Illustrated Reviews), Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.

Chang, T.-S. J. I. j. o. m. s. (2009). "An updated review of tyrosinase inhibitors." **10**(6): 2440-2475.

Chen, J. S., C. I. Wei, M. R. J. J. o. A. Marshall ve F. Chemistry (1991). "Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase." **39**(11): 1897-1901.

Chikhi, A., A. J. J. o. P. Bensegueni ve Bioinformatics (2008). "Comparative study of the efficiency of three protein-ligand docking programs." **1**: 161-165.

Collins, J. F. (2016). Copper: Basic Physiological and Nutritional Aspects. Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals**:** 69-83.

Cornish-Bowden, A. ve A. Cornish-Bowden (2012). Fundamentals of enzyme kinetics, Wiley-Blackwell Weinheim, Germany.

Dökmeci, İ., A. Akçasu, N. Banoğlu ve Ş. F. J. N. T. K. Berkarda, İstanbul (1992). "İlaç uygulamalarında temel kavramlar." **418**.

Dural, E. A. Ö. (2002). Farmakoloji, Nobel Tıp Kitabevleri.

Duran, N. ve E. J. A. c. B. e. Esposito (2000). "Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review." **28**(2): 83-99.

Ellingsen, D. G., L. B. Møller ve J. Aaseth (2015). Copper. Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition. **1:** 765-786.

Frey, P. A. ve A. D. Hegeman (2007). Enzymatic reaction mechanisms, Oxford University Press.

Fromm, H. J. ve M. Hargrove (2012). Essentials of biochemistry, Springer Science &

Business Media.
Halaouli, S., M. Asther, J. C. Sigoillot, M. Hamdi ve A. J. J. o. a. m. Lomascolo (2006). "Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications." **100**(2): 219-232.
Hałdys, K. ve R. Latajka (2019). "Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity." MedChemComm **10**(3): 378-389.
Ikehata, K. ve J. A. Nicell (2000). "Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols." Bioresource Technology **74**(3): 191-199.
Ikehata, K. ve J. A. J. B. T. Nicell (2000). "Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols." **74**(3): 191-199.
Jackman, M. P., M. Huber, A. Hajnal ve K. J. B. J. Lerch (1992). "Stabilization of the oxy form of tyrosinase by a single conservative amino acid substitution." **282**(Pt 3): 915.
Jolivet, S., N. Arpin, H. J. Wichers ve G. J. M. R. Pellon (1998). "Agaricus bisporus browning: a review." **102**(12): 1459-1483.
Kanda, K., T. Sato, S. Ishii, H. Enei, S.-i. J. B. Ejiri, biotechnology, ve biochemistry (1996). "Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of Lentinus edodes fruiting body." **60**(8): 1273-1278.
Kaya, N. (1993). Biyokimya.
Keha, E. E. ve Ö. İ. Küfrevioğlu (2004). Biyokimya, Aktif Yayın Dağıtım.
Kitchen, D. B., H. Decornez, J. R. Furr ve J. J. N. r. D. d. Bajorath (2004). "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications." **3**(11): 935.
Kupper, U., D. Niedermann, G. Travaglini ve K. J. J. o. B. C. Lerch (1989). "Isolation and characterization of the tyrosinase gene from Neurospora crassa." **264**(29): 17250-17258.
Lee, S. H., S. Y. Choi, H. Kim, J. S. Hwang, B. G. Lee, J. J. Gao, S. Y. J. B. Kim ve P. Bulletin (2002). "Mulberroside F isolated from the leaves of Morus alba inhibits melanin biosynthesis." **25**(8): 1045-1048.
Lengauer, T. ve M. J. C. o. i. s. b. Rarey (1996). "Computational methods for biomolecular docking." **6**(3): 402-406.
Masum, M. N., K. Yamauchi ve T. Mitsunaga (2019). "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents." Reviews in Agricultural Science **7**: 41-58.
McGrath, B. M. ve G. Walsh (2005). Directory of therapeutic enzymes, CRC Press.
Mojzych, M., A. Dolashki, W. J. B. Voelter ve m. chemistry (2014). "Synthesis of pyrazolo [4, 3-e][1, 2, 4] triazine sulfonamides, novel Sildenafil analogs with tyrosinase inhibitory activity." **22**(23): 6616-6624.
Mojzych, M., P. Tarasiuk, K. Kotwica-Mojzych, M. Rafiq, S.-Y. Seo, M. Nicewicz, E. J. J. o. e. i. Fornal ve m. chemistry (2017). "Synthesis of chiral pyrazolo [4, 3-e][1, 2, 4] triazine sulfonamides with tyrosinase and urease inhibitory activity." **32**(1): 99-105.
Naidja, A., P. Huang ve J.-M. J. S. S. S. o. A. J. Bollag (1998). "Comparison of reaction products from the transformation of catechol catalyzed by birnessite or tyrosinase." **62**(1): 188-195.
Nakamura, T., S. SHO ve Y. J. T. J. o. B. ogura (1966). "On the purification and properties of mushroom tyrosinase." **59**(5): 481-486.
Nelson, D. (2005). Cox MM Lehninger principles of biochemistry, New York: WH

Freeman and Company.
Nishimura, M. I., A. A. Al-Khami, S. Mehrotra ve T. Wolfel (2017). Tyrosinase: Overview. Cancer Therapeutic Targets. **1-2:** 529-536.
Nunes, C. S. ve K. Vogel (2018). Tyrosinases-physiology, pathophysiology, and applications. Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives**:** 403-412.
Pillaiyar, T., M. Manickam ve S. H. Jung (2017). "Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options." Drug Discovery Today **22**(2): 282-298.
Pillaiyar, T., M. Manickam ve V. Namasivayam (2017). "Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors." Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry **32**(1): 403-425.
Pillaiyar, T., V. Namasivayam, M. Manickam ve S. H. Jung (2018). "Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review." Journal of medicinal chemistry **61**(17): 7395-7418.
Robb, D. A. ve S. J. P. Gutteridge (1981). "Polypeptide composition of two fungal tyrosinases." **20**(7): 1481-1485.
Rodwell, V., D. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly ve P. A. Weil (2015). Harpers illustrated biochemistry 30th edition, McGraw Hill Professional.
Ryu, Y., I. Westwood, N. Kang, H. Kim, J. Kim, Y. Moon ve K. J. P. Park (2008). "Kurarinol, tyrosinase inhibitor isolated from the root of Sophora flavescens." **15**(8): 612-618.
Sánchez-Ferrer, Á., J. N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, F. J. B. e. B. A.-P. S. García-Carmona ve M. Enzymology (1995). "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism." **1247**(1): 1-11.
Seo, S.-Y., V. K. Sharma, N. J. J. o. a. Sharma ve f. chemistry (2003). "Mushroom tyrosinase: recent prospects." **51**(10): 2837-2853.
Soler-Rivas, C., S. Jolivet, N. Arpin, J. Olivier ve H. J. F. m. r. Wichers (1999). "Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of Agaricus bisporus." **23**(5): 591-614.
Solomons, T. J. Q. o. (2004). "Graham; Fryhle, Craig B." **1**: 9.
Tomita, Y., K. MAEDA ve H. J. P. C. R. TAGAMI (1992). "Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation." **5**(5): 357-361.
Ullah, S., S. Son, H. Y. Yun, D. H. Kim, P. Chun ve H. R. Moon (2016). "Tyrosinase inhibitors: A patent review (2011-2015)." Expert Opinion on Therapeutic Patents **26**(3): 347-362.
Van Gelder, C. W., W. H. Flurkey ve H. J. J. P. Wichers (1997). "Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases." **45**(7): 1309-1323.
Whitaker, J., D. J. b. W. D. Wong, Chapman ve N. Y. Hall (1995). "Food enzymes, structure and mechanism."
Wichers, H. J., Y. A. Gerritsen ve C. G. J. P. Chapelon (1996). "Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of Agaricus bisporus." **43**(2): 333-337.
Wong, D. W. (1995). Food enzymes: structure and mechanism, Springer Science & Business Media.
Zaidi, K. U., S. A. Ali, A. Ali ve I. Naaz (2019). "Natural tyrosinase inhibitors: Role of herbals in the treatment of hyperpigmentary disorders." Mini-Reviews in Medicinal Chemistry **19**(10): 796-808.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ramazan DEMİR

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 1984

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Yenimahalle / ANKARA

Tel : 05366030009

E-posta : rdmuhendis@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İnönü Lisesi

Lisans : Gazi Üniversitesi Makine Mühendisliği-2006

Yüksek Lisans: Bozok Üniversitesi Makine Mühendisliği A.B.D.-2019

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya A.B.D.-2020

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Kültür ve Turizm Bakanlığı- Makine Mühendisliği 2012- Devam ediyor.