T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜBERKÜLOZA KARŞI BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ TASARIMI; FOSFODİESTERAZ İÇİN İNHİBİTÖR GELİŞTİRİLMESİ

Şükran DEMİRÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Mayıs 2018

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

ŞükranDEMİRÇETİN….tarafından yapılan "Tüberküloza Karşı Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı; Fosfodiesteraz İçin İnhibitör Geliştirilmesi " konulu bu çalışma , jürimiz tarafından .....KİMYA..... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan :Prof. Dr. Ebru İnce Bostancı.....

Üye... : Prof. Dr. Necmettin Pirinççioğlu.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selami Ercan.....

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 08./06/2018

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../201

Doç.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince baştan sona amacıma ulaşmam adına gerekli imkanları sağlayıp desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp yol gösteren danışmanım sayın Prof. Dr. Necmettin Pirinççioğlu'na teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hayatımda her koşulda yanımda olmayı ve bana güvenmeyi ihmal etmeyip bu çalışma sırasında da içtenlikle destek veren sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……...I
İÇİNDEKİLER……II
ÖZET……..……..III
ABSTRACT……..IV
ÇİZELGE LİSTESİ…...……..V
ŞEKİL LİSTESİ…….....VI
KISALTMA VE SİMGELER…….....VII
1. GİRİŞ……1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR…….……3
2.1. Tüberküloz**…**……..3
2.1.1. Tüberküloza Karşı Geliştirilen İlaçlar**..**……...5
2.1.2. Önlemler……..6
2.1.3. Tanımı ve Önemi……6
2.1.4. Genom yapısı……...7
2.2. Siklik-dinükleotid Sinyal İletimi…….....10
2.3. Fosfodiesteraz……..…….11
2.4. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı**…….……...**13
2.4.1. Ligant Temelli İlaç Tasarımı…….……...…14
2.4.2. Yapı Temelli İlaç Tasarımı**…….……**14
2.4.2.1. Dock**…….……..**15
3. MATERYAL VE METOT…….……17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……..,,,28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER……...**…**35
6. KAYNAKLAR……...……..37
ÖZGEÇMİŞ…… .45

ÖZET

TÜBERKÜLOZA KARŞI BİLGİSAYAR DESTEKLİ İLAÇ TASARIMI;
FOSFODİESTERAZ İÇİN İNHİBİTÖR GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şükran DEMİRÇETİN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2018

Tüberküloz, bakteriyel ve bulaşıcı bir hastalıktır. *Mycobacterium tuberculosis* mikrobu bu hastalığa neden olan bakteridir. Bakterilerin çoğu günümüzde antibiyotiklere karşı direnç kazanmışken yeni anti-tüberküloz ilaçlara sürekli ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden mevcut ilaçlar yerine bu bakterinin bulunduğu çevre ile adaptasyonu, büyümesi ve yaşamasını hedef alan mekanizmaları seçmek yeni ilaç hedefleridir. Bakteri dış koşullara karşı adaptasyon, çoğalma ve büyümeyi bir sinyal iletimi ile sağlamaktadır. Bakterilerin çoğu ikincil haberci sinyal iletimini kullanarak bu iletişimi sağlamaktadır. Bu iletişimde yer alan biyolojik aktif maddeleri hedef alan yaklaşımlar iyi bir ilaç tasarım hedefidir. Biz de bu çalışmada ikincil haberci işleminde yer alan ve c-di-AMP'nin açılma reaksiyonunda görevli fosfodiesteraz (PDE) enzimini hedef alan yeni anti-tüberküloz ilaçların belirlenmesini bilgisayar yaklaşımı (Docking) ile araştırdık. PDE inhibitörü olan ve halı hazırda tüberküloz tedavisinde kullanılan çeşitli bileşiklere (40 adet) ilaveten doğal kaynaklarda, başlıca zencefilde (*Curcuma longa L.*) bulunan (8 adet) olmak üzere toplam 59 adet ligand X-ray yapısı (5ceu) bilinen ve c-di-AMP ile kompleksi olan PDE ye dock edildi. Orijinal ligandın dock skoru -82.02 kcal mol^{-1} olarak belirlenirken bu ligantlardan 16 adetin dock skoru -40 ve -50 kcal mol^{-1} arasında ve iki adetin ise -50 altında bulundu. Mevcut sonuçlara göre taranan ligandlar içinden *M. tuberculosis* PDE enzimi için potansiyeli olan inhibitörlerin olabileceği ve dolayısıyla bu veriler kullanılarak tüberküloza karşı etkin yeni ilaçların tasarlanmasına yol açabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: c-di-GAMP, İkincil Haberci, Fosfodiesteraz, Tüberküloz, İnhibitör, Anti-TB, İlaç tasarımı, Docking.

ABSTRACT

DESIGN OF NEW DRUGS AGAINST TUBERCULOSIS; DEVELOPING INHIBITORS for PHOSPHODIESTERASE

Msc THESIS

Şükran DEMİRÇETİN

DEPARTMENT OF CHEMİSTRY
INSTITUE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2018

Tuberculosis is a bacterial and infectious disease. Mycobacterium tuberculosis microbe is the cause of this disease. New antituberculosis drugs are needed constantly while most of the bacteria are resistant to antibiotics nowadays. Therefore, instead of existing medicines, choosing mechanisms including adaptation, growth and survival of bacteria to the environment is a new drug target. Many bacteria use signal transmission to response external conditions for adaptation and grow. Most bacteria have this communication using secondary messenger signal transmission. Approaches targeting biologically active substances involved in this transmission are a good drug target. In this study, we investigated the identification of new anti-tuberculosis drugs targeting the phosphodiesterase (PDE) enzyme included in the secondary messenger process, which catalyses the opening reaction of cyclic dinucleotide monophosphate (c-di-AMP) by computer approach (Docking). A total of 59 ligands were docked to PDE whose x-ray structure was obtained from the potein data bank (5ceu), which also inolves the open form of c-di-AMP. A large number of ligands are already used as the inhibitors of human PDEs and some in the trearment of tuberculosis while some are from natural sources, mainly from Curcuma longa L. When the dock score of the original ligand was determined that the orignal ligand was docked to the protein with a dock score of -82.02 kcal mol^{-1}, the dock scores of 16 of the ligands was between -40 and -50 kcal mol^{-1} and two of them were below -50. The present results provide a detailed binding mode of ligands with Mtb PDE which could be used as a stand to develop new drugs against tuberculosis.

Key words: c-di-GAMP, Secondary Messenger, Phosphodiesterase, Tuberculosis, Inhibitor, Anti-TB, Drug design, Docking.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 1.	Literatürlerden Seçilen ve Tasarlanan Ligantlar	18
Çizelge 2.	Dock Skorlarının Karşılaştırılması	32

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Orijinal ligantın x-ray (mavi) ve dock edilmiş (mor) koordinatlarının üst-üste çakıştırılması	28
Şekil 2.	**L01, L02, L04, L06, L25, L26, L27, L31, L32** ve **L33**'ün proteine bağlama modları	29
Şekil 3.	**L12, L15, L16, L17, L19, L37, L39, L40 ve L41** proteine bağlanma modu	30
Şekil 4.	**L30**, **L44-50** bileşiklerinin proteine bağlanma modları	31
Şekil 5.	**001, 002, 005, 008, 010, 016, 027, 028** ve **029** ligantlarının protein bağlanma modları	31
Şekil 6.	**010** ligandının proteine bağlama modunun detaylı gösterimi	32
Şekil 7.	Dock ile Yüzey Belirleme	15

KISALTMA VE SİMGELER

AMP	:Adeninmonofosfat
CDN	:Siklik Dinükleotit
GMP	:Guaninmonofosfat
MIC	: Complete İnhibition of *M.Tuberculosis* (H37Rv)
Mtb	:Mycobacterium Tuberculosis
Pdb	:Protein Data Bank
PDE	:Fosfodiesteraz
TB	:Tüberküloz

1.GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *M. tuberculosis* bakteri enfeksiyonundan kaynaklanan bir hastalıktır. Uygun şekilde tedavi edilmezse, TB ölümcül olabilir (Centers for Disease Control and Prevention 2009). Hali hazırda Dünya Sağlık Örgütü, 13 milyondan fazla insanın TB'ye sahip olduğunu ve her yıl hastalıktan yaklaşık 1,5 milyon kişinin öldüğünü tahmin ediyor. Tüberküloz en sık akciğerleri (akciğer TB) etkiler. Aktif akciğer tüberkülozlu hastalar genellikle öksürük ve anormal bir göğüs röntgeni ile karakterize edilirler ve bulaşıcıdırlar. Tüberküloz akciğerlerin dışında (ekstrapulmoner), en çok da merkezi sinir, lenfatik veya genitoüriner sistemlerde veya kemiklerde ve eklemlerde (Centers for Disease Control and Prevention 2009) meydana gelebilir. Vücutta dağılmış olan tüberküloz, militan TB olarak adlandırılır. Ekstrapulmoner TB, bağışıklığı baskılanmış kişilerde ve küçük çocuklarda daha sık görülür (American Lung Association 2009).

Aktif akciğer TB'si olan bir kişi öksürdüğünde, hapşırdığında veya konuştuğunda, TB'ye neden olan bakteriler havaya yayılabilir. Başka bir kişi bu havayı alırsa, tüberkülozla enfekte olma şansı vardır. Enfeksiyon için tekrarlı temas genellikle gereklidir (Centers for Disease Control and Prevention 2009). Ancak, TB bakterileri ile enfekte olan herkes hasta olur. *M. Tuberculosis* ile enfekte kişilerin % 5'i aslında TB geliştirir. Enfekte olan fakat hasta olmayan kişilerde latent TB enfeksiyonu vardır. Gizli enfeksiyonları olanlar asemptomatiktir, hasta hissetmezler ve bulaşıcı olmazlar.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Tüberküloz

Belirtiler

Aktif akciğer tüberkülozunun erken belirtileri arasında kilo kaybı, ateş, gece terlemeleri ve iştah kaybı olabilir. (Centers for Disease Control and Prevention 2009) Tüberkülozun belirsiz başlangıç semptomları nedeniyle, enfekte olmuş bir kişi yanlış bir şey olduğunu hissetmeyebilir. Enfeksiyon ya remisyona girebilir ya da göğüs ağrısının başlangıcı ve kanlı balgam öksürüğü ile daha ciddi olabilir (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 2009). Ekstrapulmoner TB'nin kesin semptomları, vücuttaki enfeksiyon bölgesine göre değişir.

Yayılma

TB, bir kişiden diğerine hava yoluyla yayılır. Bakteri içeren mikroskobik damlacıklar, tüberkülozlu bir kişi öksürdüğünde veya hapşırdığında çıkarılabilir. Çevreye bağlı olarak birkaç saat havada kalabilirler. Bir kişi *M. tuberculosis'yi* nefesiyle aldığında, bakteriler akciğerlere yerleşebilir ve büyümeye başlar. Oradan, kan yoluyla vücudun diğer kısımlarına gidebilirler. Akciğerlerdeki tüberküloz bulaşıcı olabilir çünkü bakteriler diğer insanlara kolayca yayılır. Böbrek veya omurga gibi vücudun diğer bölgelerinde TB genellikle bulaşıcı değildir (Centers for Disease Control and Prevention 2009). Bir kişide TB doğrulandıysa veya tüberküloz olduğundan şüpheleniliyorsa, bulaşmayı durdurmanın en iyi yolu hemen izolasyon yapılarak gerçekleşir. Tedaviye hemen başlanmalıdır. Hastanın tedavi seyrine bağlı olması koşuluyla, standart bir tedavi rejimi başladıktan sonra bulaşıcılık hızla azalır.

Risk Grupları

Herkes TB alabilir. Bununla birlikte, bazı gruplar aktif TB hastalığı almak için daha yüksek risk altındadır. Şu grup kişiler yüksek risk altındaki kişiler olarak tanımlanır (American Lung Association 2009): 1. HIV enfeksiyonunu taşıyanlar, 2. TB ile enfekte olduğu bilinenlerle yakın temas halinde olanlar, 3. vücudu hastalığa karşı daha az koruyabilen tıbbi şartlara sahip olanlar (örneğin: diyabet veya uzun süre kortikosteroid kullanımı gibi bağışıklık sistemini baskılayabilen ilaçlarla tedavi gören kişiler), 4. Yüksek TB oranları olan ülkelerde yaşayanlar, 5. Uzun süreli bakım

tesislerinde (bakım evleri, hapishaneler, bazı hastaneler) çalışanlar, 6. Yetersiz beslenenler, 7. Alkolik veya damar içi uyuşturucu kullanıcısı olanlar.

Enfeksiyon

Enfeksiyon, bir kişi tüberküloz basilinde enfekte olmuş bir kişiden atılan damlacıklardan nefes aldığında gelişebilir. Damlacıklar, basillerin biriktirilebildiği akciğer alveollerine ulaşırlar (Kalia ve ark. 2013). Alveolar makrofajlar tüberkül basilini alıp çoğunu yok eder. Bazıları makrofaj içinde çoğalabilir ve makrofaj öldüğünde serbest bırakılabilir. Oradan, basiller, kan dolaşımından vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. TB'nin gelişmesi en muhtemel olan bölgeler şunlardır: Akciğerin üst kısmları, böbrekler, beyin, kemikler ve lenf düğümleri. Bu yayılma süreci bağışıklık sistemini bir reaksiyon için hazırlar (American Lung Association 2009).

Enfeksiyonu yüksek olan bazı kişilerde, bağışıklık sisteminden gelen yanıt, basillerin çoğunu öldürür. Bu aşamada, Mantoux tüberkülin deri testi kullanılarak saptanabilen bir latent TB enfeksiyonu yaratılmıştır. Enfeksiyondan haftalar sonra, bağışıklık sistemi genellikle daha fazla ilerlemeyi önleyerek, tüberkül basilinin çoğalmasını durdurabilir. Çoğu insan ilk enfeksiyondan tamamen iyileşir ve bakteriler sonunda ölür. (Harries ve Dye 2006, National Institute of Allergy and Infectious Diseases 2009).Bazı kişilerde, tüberküloz basili, bağışıklık sisteminin savunmasını yener ve çoğalmaya başlar ve bu da aktif TB hastalığına ilerlemeyle sonuçlanır. Bu süreç enfeksiyondan kısa süre sonra veya birkaç yıl sonra ortaya çıkabilir (Goodman ve Lipman 2008)..

Teşhis

TBD (saflaştırılmış protein türevi) testi olarak da bilinen Mantoux tüberkülin deri testi, TB enfeksiyonunu tespit etmek için kullanılır. Kolun derisine az miktarda tüberkülin, saflaştırılmış bir *M. tuberculosis* proteini kompleksi enjekte edilerek gerçekleştirilir. Kolda oluşan reaksiyon, testin sonucunu belirler. TB enfeksiyonu için pozitif bir reaksiyon, sadece bir kişinin TB bakterileri ile enfekte olduğunu bildirir. Kişinin aktif hastalığı olup olmadığını söylemez. Kişinin aktif hastalığı olup olmadığını belirlemek için bir göğüs röntgeni ve balgam örneğini içeren diğer testlere ihtiyaç vardır (Nahid ve ark. 2006) . Pulmoner TB'de, üst lobda veya alt lobun üst segmentlerinde

apikal segmentlerde sıklıkla röntgen lezyonları görülür. Bununla birlikte, lezyonlar, özellikle HIV pozitif ve diğer bağışıklığı baskılanmış kişilerde, akciğerlerde herhangi bir yerde görünebilir (Centers for Disease Control and Prevention 2009).

Anormal bir göğüs röntgeni, daha sonra ek testlerle doğrulanıp onaylanmayan TB enfeksiyonuna işaret edebilir. Göğüs röntgeni, tüberkülin deri testine pozitif bir reaksiyonu olan ve hiçbir hastalık belirtisi olmayan bir kişide akciğer tüberküloz olasılığını dışlamak için kullanılabilir. Pulmoner TBC olduğundan şüphelenilen kişiler genellikle aside dirençli basilli leke ve kültür ile incelenen balgam örneklerine sahip olacaktır. Mikroskopik olarak incelenmiş lekelerde aside dirençli basilin saptanması, *M. tuberculosis'in* varlığının ilk açık kanıtını sağlayabilir. TB tanısını doğrulamak için *M. tuberculosis* için pozitif kültürler kullanılır (Nahid ve ark. 2006).

2.1.1.Tüberküloza Karşı Geliştirilen İlaçlar

M. tuberculosis çok yavaş büyüyen, hücre içi bir organizmadır. Sonuç olarak, tedavi birkaç ay boyunca birden fazla ilacın kullanımını gerektirir (Goodman ve Lipman 2008). Uygun antibiyotik tedavisi ile, TB çoğu insanda tedavi edilebilir. Tedavi genellikle en az 6 ay boyunca, bazen de 12 ay boyunca verilen birkaç farklı antibiyotik ilacını birleştirir. Bununla birlikte, birçok *M. tuberculosis* suşu tedaviyi büyük ölçüde karmaşıklaştıran standart TB ilaçlarının bir veya daha fazlasına dirençlidir (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 2009).

Şu anda, TB tedavisi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmış 10 ilaç vardır. Onaylanmış ilaçlardan isoniazid (INH), rifampin (RIF), ethambutol (EMB) ve pirazinamid (PZA) ilk basamak antitüberküloz ajanlar olarak kabul edilmektedir. Bu dört ilaç başlangıç terapisinin temelini oluştururlar.

İlaca dirençli TB hastalığını tedavi etmek büyük bir sorundur. Çoklu ilaç dirençliliğine sahip TB(Multiple Drug Resistance-TB), en güçlü iki TBC ilacı olan izoniazid ve rifampisine dirençli TB basilinin neden olduğu hastalık olarak tanımlanmaktadır (World Health Organization 2009) . MDR-TB, ilaçlara karşı kendiliğinden dirençlidir, ancak dirençli veya kısmi tedaviyle direncini arttırır. Hastalar gerekli ilaçları düzenli olarak almazlar çünkü daha iyi hissetmeye başlarlar, ilaca dirençli bakteriler ortaya çıkabilir. İlaca dirençli TB genellikle tedavi edilebilir iken, ikinci sıra anti-TB ilaçları ile geniş kemoterapi (iki yıllık tedaviye kadar) gerektirir. Bu

ikinci sıradaki ilaçlar, tercih edilen ilk ilaçlardan daha sık olumsuz ilaç reaksiyonları üretirler. TB tedavisinde kullanılan ikinci sınıf ilaçların altı sınıfı vardır. Bunlar; aminoglikozitler, fluorokinolonlar, polipeptitler, tiyoamidler, sikloserin ve p-aminosalisilik asit.

Son birkaç yıl içinde, yaygın olarak ilaca dirençli TB (XDR-TB) şeklinde yeni bir TB ortaya çıkmıştır. Düzenli TB ve hatta MDR TB nispeten yavaş ilerlerken, XDR TB çok daha hızlı ilerler ve aylar hatta birkaç hafta içinde ölümcül olabilir. XDR-TB, en az rifampisin ve izoniazid ile aynı zamanda fluorokinolon familyasının herhangi bir üyesine ve aminoglikozidlerin veya polipeptitlerin en az birine direnç geliştirmiş TB olarak tanımlanır. XDR-TB'nin ortaya çıkması, özellikle birçok TB hastasının da HIV ile enfekte olduğu ortamlarda, TB kontrolü için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (World Health Organization 2009).

2.1.2. Önleme

TB büyük ölçüde önlenebilir bir hastalıktır. Hastaların izolasyonu ve yeterli havalandırma toplumda bulaşmasını önlemek için en yaygın önlemlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, sağlık hizmeti sağlayıcıları, aktif tüberküloz geliştirmeden önce mümkün olan en erken zamanda *M. tuberculosis* ile enfekte olmuş insanları tanımlamaya çalışırlar. Dünyada hastalıkların daha sık görüldüğü bölgelerinde, Dünya Sağlık Örgütü, bebeklere ve çocuklara BCG (Bacille Calmette Guerin) adı verilen bir aşıyı önermektedir. BCG, *M. tuberculosis* ile ilgili bir bakteri olan canlı zayıflatılmış *Mycobacterium bovis*'den yapılır. BCG aşısı M. tuberculosis'in vücutta yayılmasını önler ve böylece TB gelişmesini engeller. BCG'nin dezavantajları var. Çocuklarda aktif hastalığın gelişmesini önlemede makul derecede etkilidir. Bununla birlikte, erişkinlerde TB'ye karşı koruma sağlamaz. Ek olarak, BCG, TB (PPD) cilt testine müdahale edebilir ve aşıyı alan kişilerde pozitif bir cilt testi reaksiyonu sergileyebilir. BCG, endemik olan ülkelerde çocuklarda kullanılır. Sonuç olarak, popülasyonun büyük bir kısmı, aşıdan bağımsız olarak pozitif bir TB testine sahip olacaktır. Bununla birlikte, BCG aşısının kullanıldığı birçok ülke sınırlı bir altyapıya ve halk sağlığı sistemine sahiptir. Sonuç olarak, bu sorun, endemik TB olmayan ülkelerde olduğu kadar önemli değildir (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 2009).

2.1.3.Tanımı ve önemi

M. tuberculosis, bazı arilmetan boyaları eklendiğinde asit-kararlı kompleksler oluşturabilen bir asit dirençli bakteridir (Kalia ve ark. 2013). Mikobakterilerin tüm türleri, bir aside diençli bakterinin özelliklerini verebilecek şekilde düzenlenmiş, peptidoglikanın şerit benzeri (ropelike) yapılarına sahiptir. (Kalia ve ark. 2013) Mikobakteriler toprakta ve suda bol miktarda bulunur, ancak *Mycobacterium tuberculosis* esas olarak konakçıda yaşayan bir patojen olarak tanımlanır. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksindeki bazı türler, genetik yapılarını özellikle insan popülasyonlarını enfekte etmek için uyarlamıştır.

M. tuberculosis laboratuarlarda izole edilebilir ve yoğun olarak çalışılması için -80 derecede saklanabilir ve en yaygın olarak kullanılan *M. tuberculosis* suşu *H37R*v suşudur. *M. tuberculosis'i* kültürde incelemenin bir yolu, sağlıklı bir insan donöründen alınan periferik kan numunelerindeki mononükleer hücrelerin örneklerini toplamaktır. *M. tuberculosis* çok basit büyüme gereksinimlerine sahiptir ve sert koşullarda yavaş yavaş büyüyebilir. Onların aside dirençli özelliği etrafında gliserol olduğunda en güçlü olanıdır. Bununla birlikte, glikoz ana besin kaynağı olduğunda, *M. tuberculosis* ile gliserol kullanımı inhibe edilir. Bu nedenle, glikoz yerine glutatmatın aslında büyümeyi başlatan ana besin kaynağı olduğu gösterilmiştir.(Kalia ve ark. 2013).

İnsan popülasyonunun % 32 kadarı tüberkülozdan (TB) etkilendiği için, *M. tuberculosis* enfeksiyonunun bir şekilde ya da başka bir şekilde neden olduğu hava kaynaklı bir hastalıktır ve bunların yaklaşık % 10'u hastalanır (Romling ve ark. 2005). *M. tuberculosis'in* gen ürünlerini hedef alan spesifik ilaçlar geliştirerek tedavi stratejileri geliştirmek ve geliştirmek için patojenin genomunu anlamadaki önemi hayal etmek zor değildir.

2.1.4.Genom yapısı

Mycobacterium tuberculosis, yaklaşık 4.200.000 nükleotit uzunluğunda dairesel kromozomlara sahiptir. G + C içeriği yaklaşık % 65'tir (Oppenheinmer ve ark. 2011). *M. tuberculosis genomu*, genel olarak *M. tuberculosis* H37Rv suşu kullanılarak çalışılmıştır. Genom yaklaşık 4000 gen içerir. Lipit metabolizmasını kodlayan genler, bakteriyel genomun çok önemli bir kısmıdır ve genomun % 8'i bu aktivitede yer alır (Hengge 2009). *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin farklı türleri, DNA homolojisi çalışmalarına dayanan % 95-100 DNA ile ilişkilidir ve 16S rRNA geninin

dizisi, tüm türler için tam olarak aynıdır. Bu nedenle bazı bilim adamları tek bir tür olarak gruplandırılmaları gerektiğini öne sürerken, diğerleri *M. tuberculosis'in* çeşitleri veya alt türleri olarak gruplandırılmaları gerektiğini savunurlar (Watson ve ark. 2012). *M. tuberculosis'deki* plazmidler, virulansın aktarılmasında önemlidir, çünkü plasmidlerdeki genler, kromozom üzerinde bulunan genlere göre daha kolay transfer edilir. *M. tuberculosis H37Rv* suşunda böyle bir 18kb plazmidinin gen transferleri gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır.

Hücre yapısı ve metabolizması

M. tuberculosis, besin maddelerinin hücreden içeri girmesini ve atılmasını engelleyen sert bir hücre çeperine sahiptir, bu nedenle ona yavaş büyüme oranının karakteristiğini verir. Patojenin hücre duvarı, bir gram-pozitif hücre duvarı gibi görünür. Hücre zarfı bir polipeptit tabakası, bir peptidoglikan tabakası ve serbest lipitler içerir. Ayrıca, parlak görünen mikolik asitler gibi yağlı asitlerin karmaşık bir yapısı da vardır (Van der Geize 2007). *M. tuberculosis* hücre duvarı üç sınıf mikolik asit içerir: alfa-, keto- ve metoksimikoller. Hücre duvarı ayrıca, açil gloklipidler ve serbest lipitler ve sülfolipidler gibi başka kompleksleri içeren lipid komplekslerini de içerir. Membranda nakil işlemini kolaylaştırmak için porinler bulunmaktadır. Hücre duvarının altında, plazma zarının hemen üzerinde bulunan arabinogalaktan ve peptidoglikan tabakaları vardır (Thomas ve ark. 2011).

M. tuberculosis genomu, 13 sigma faktörü, 11 iki bileşenli sistem ve 140'dan fazla transkripsiyon düzenleyici de dahil olmak üzere 190 transkripsiyon regülatörünü kodlar. Aşırı soğuk ya da ısı, demir açlığı ve oksidatif stres gibi çevresel regülatörlere yanıt veren birçok düzenleyici bulunmuştur (Yang ve ark 2007). Bu zorlu koşullarda konakta uzun süre kalmak için, *M. tuberculosis* çevresi ile transkripsiyona izin vererek veya onu inhibe ederek çevreye uyum sağlamayı öğrenmiştir (Jayachandran ve ark. 2013).

Mikrobiyal patojenler ve bunların konakçıları arasındaki benzersiz çapraz iletişim, konakçının ve patojenin hayatta kalmalarını sağlamak için ulaşması gereken ortak evrimsel dengeyi yansıtır. *Mycobacterium tuberculosis* - bir hücre içi ve esas olarak vakuolar bir patojen – vücudun hiç de rağbet görmeyen hücrelerden biri olan makrofajda basilin yayılmasını sağlamak için bir dizi konakçı fizyolojik tepkiyi bozan

çok sayıda virülans faktörleri geliştirmiştir. Bununla birlikte, *M. tuberculosis'in* makrofajlarla bu etkileşimi hiçbir şekilde tek yönlü değildir; Bunlar, konakçı hücre sitoplazmasına bakteriyel molekülleri ihraç eden özel proteinler, küçük moleküller ve sekresyon sistemleri üzerinde dönen gerçek iki yönlü biyokimyasal etkileşime girerler. Bu patojen ile ilişkili moleküler modellerin (PAMP), bakteriyel içselleştirme sırasında ve ayrıca *M. tuberculosis*, ya zar bağlı bir fagozomal bölme içinde yer aldığında ya da sitoplazmaya translokasyon yaparken, sinyalleme kaskadlarının sayısız aktivitesini aktive eden konakçı model tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından tanınmaktadır. PAMP ve PRR etkileşimi ile başlatılan sinyal olayları, konakçı savunma cephaneliğinin kritik bileşenleridir ve konağın *M. tuberculosis'e* karşı immünoresanları monte etmesine izin verir (Manzanillo 2012, Watson ve ark. 2012, Jayachandran ve ark. 2013, Stenley ve Cox 2013).

Öğrenilmesi gereken çok şey olmasına rağmen, geçtiğimiz birkaç on yıl boyunca yapılan araştırmalar, *M. tuberculosis'in* makrofajlar içindeki düşmanca ortamlara nasıl uyum sağladığını ya da çoğalmasını ve sürdürülmesini sağlamak için konak yanıtlarını nasıl manipüle ettiğini ortaya koymaya başlıdılar. Bu stratejilerin birçoğu, patojenik mikobakteriler tarafından, diğer hücre içi patojenlere kıyasla (son zamanlarda (Jayachandran ve ark. 2013) gözden geçirilmiştir. Bazı örtüşmeler var olmakla birlikte, çoğu patojen, konakçı immün yanıtlarını engellemek için spesifik yollar geliştirmiştir; Bu, farklı patojenlerin işgal ettiği farklı hücre içi nişler veya fizyolojik gereksinimlerine göre çeşitli patojenlerin münhasırlığına bağlı olabilir.

Sonuçta, Bir bakteri enfeksiyonunun başarılı bir şekilde kurulması ve sürdürülmesi, patojenin konak hücrenin savunma yanıtını bozma yeteneğine ve enfekte olmuş hücrede başarılı bir şekilde hayatta kalmaya, çoğalmaya veya devam ettirilmesine bağlıdır. Konakçı savunma sistemlerini aşmak için, bakteriyel patojenler, bakteriyel yapışmayı ve invazyonu artıran ve hücre içi mikrobiyal hayatta kalma ve trafiğini düzenleyen konakçı hücre sinyal kaskadlarını ele geçiren çeşitli virülans faktörleri üretir. Muhtemelen yeryüzündeki en başarılı patojenlerden biri olan *Mycobacterium tuberculosis*, yüzyıllardır insanlıkla birlikte var olmuştur ve bu iki organizma arasındaki bu yakın ve kalıcı bağlantı, patojenin, insan bağışıklık sistemini birden çok düzeyde atlatmak için geniş mekanizmaları geliştirdiğini düşündürmektedir. Bu mekanizmaların bir kısmı *M. tuberculosis* tarafından salgılanan faktörler tarafından aracılık edilirken,

diğerleri, konakçı hücre içinde *M. tuberculosis*'in hayatta kalmasını sağlamak için etkili bir bağışıklık tepkisinin oluşmasını engellemek için elegeçirilen konakçı bileşenlere güvenmektedir. Burada, birden fazla ikincil mekanizma olmasına rağmen biz kısaca siklik di-nükleotid sinyal mekanizmasına değineceğiz.

2.2.Siklik di-nükleotid sinyal iletimi

Meyvelerin bozunmasında rol alan bakterinin *Gluconacetobacter xylinus* , selüloz sentezinin bir allosterik aktivatörü olarak yaklaşık 30 sene önce önce keşfedilen c-di-GMP (siklik dinükleotid guanin monofosfat) haricinde, hem c-di-AMP (siklik dinükleotid adenin monofosfat) hem de siklik AMP - GMP hibrid dinükleotid c-GAMP (hem bakteriyel hem de ökaryotik), konakçı-patojen çapraz-iletişiminde yer alan ikinci haberci moleküllerin büyüyen listesine en yeni üyeler olarak kayıt edildirler (bunlarla ilgili son derlemeler için bkz. (Romiling 2008, Romling ve ark. 2013, Corrigan 2013, Chai ve ark. 2014,). c-di-GMP ve c-di-AMP sentezleyen ve parçalayan enzimler bir dizi bakteri türünde bulunurken (Hengge 2009, Corrigan 2013), bugüne kadar bu tür enzimler memeli hücrelerinde rastlanılmamıştır. Dolayısıyla bu enzimleri hedef alan stratejiler yeni ilaçların keşfinde önemli bir yer tutar

Bu iki sinyal ileticiler, siklik dinükleotitler (CDN'ler), birkaç ortak özelliği paylaşırlar. Hem c-di-AMP ve c-di-GMP, genellikle birden fazla bölge içeren proteinlerin bir parçası olan bölgeler tarafından sentezlenir, böylece birden fazla giriş sinyali enzimatik aktivitelerini etkileyebilir. Her iki molekül de hücre duvarı metabolizması, antibiyotik direnci, biyofilm oluşumu, hücre farklılaşması, morfoloji ve motilite gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer alırlar . Ve bu iki CDN tarafından uygulanan düzenleyici işlevlerin birkaçı, bakteriyel virülans mekanizmaları üzerinde doğrudan etkilere sahiptirler (Hengge 2009, Corrigan 2013). Örneğin, c-di-GMP, çeşitli bakteriyel patojenlerde çok hücreli biyofilmler içindeki hareketli durumdan tutulmuş duruma geçişte merkezi bir rol oynar (Ryan 2013). Benzer şekilde, bu CDN'lerin her biri için siklaz geninin veya gen domeynlerin silinmesi sonucu oluşan mutantlar, bu patojenlerin virülans faktörlerini ortadan kaldırmaktadır (Smith ve Strobel 2011, Corrıgan 2013, Ryan 2013)

Bakterilerdeki c-di-AMP'nin aracılık ettiği düzenlemenin kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, temel sinyal modülleri c-di-AMP ve c-di-GMP için benzerdir. Harici veya dahili bir sinyali takiben, iki nükleotid trifosfatın (GTP veya ATP) CDN

siklazlar tarafından kondenzasyonu, ya c-di-GMP'ı veya c-di-AMP'ı üretir. CDNler daha sonra hedef proteinlere bağlanır ve efektör protein fonksiyonunu değiştiren ve böylece spesifik hücresel yolakları düzenleyen allosterik değişiklikleri ortaya çıkarır (Hengge 2009). Son olarak, CDN'ler belirli CDN-PDE'ler tarafından parçalanırlar. Bu CDN'lerin her ikisinin de aşağı yönde dizilerin transkripsiyonunu ve translasyonunu düzenlediği bilinen özel riboanahtarlara (riboswitches) bağlandığı gösterilmiştir (Smith ve ark. 2011, Nelson 2013). Bakteriyel orijinli hibrid CDN, 3'-5'-c-GMP-AMP (cGAMP), di-AMP ve c-di-GMP de de olduğu gibi, guanosin ve adenosin artıkları arasındaki 3'-5 'bağları ile oluşturulmuş bir kanonik nükleotiddir (Zhang 2013). Bugüne kadar, 3'-5'-cGAMP'nın sadece *Vibrio cholera*e'de etkili bağırsak kolonizasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Davies 2012). Memeli cGAMP, sitoplazmada çift sarmalı DNA'ya yanıt olarak memeli hücrelerinde cGAMP senteaz (cGAS) tarafından üretilen bir 2'3'-CDN'dir (Gao 2013, Wu 2013, Chai ve ark.2014). 2'3'-cGAMP ayrıca nükleotid kalıntıları arasındaki atipik 2'-3 'fosfodiester bağlarının mevcudiyetine bağlı olarak "kanonik olmayan" cGAMP olarak adlandırılır. Büyüleyici bir olgu, bakteriyel ve konakçıdan türetilen CDN'ler arasındaki yapısal ve kaynak farklılıklarına rağmen, hem bakteriyel kökenli 3'5'-cGAMP hem de memeli kökenli 2'3'-cGAMP (ayrıca c-di-AMP ve c-di-GMP), konakçı hücre sitoplazmasında yaygın olarak bulunan detektör proteini olan, interferon gen sinyal uyarıcısı (STING) bir protein tarafından algılanır. STING, IFN-ß üretimine yol açan TBK1-IRF3 bağımlı Tip-I IFN sinyal yolağını aktive eder (Sun 2013, Wu 2013, Zhang 2013). STING kanonik olan veya olamayan cGAMP'yi bir birinden ayırt edebilme kapasitesine sahiptir (Diner 2013, Yi 2013). Bununla birlikte, yakın zamandaki çalışmalar bu iki CDN grubunu ayırt edebilen mekanizmaları ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, cGAMP STING'i de bağlayan bakteriyel türevli siklik dinükleotitlere c-di-AMP veya c-di-GMP göre, Tip I IFN cevabını aktive etmede daha etkilidir (Burdette ve Vance 2013).

2.3.Fosfodiesteraz

M. Tüberculosis insan hücresine girdiğinde DNA' sının varlığı ve ürettiği c-di-AMP (siklik diadonezin monofosfat) molekülü aracılığıyla hücreyi bakterilerin varlığına karşı alarma sevketmektedir. Bunun üzerine insan hücresi tüberküloz bakterilerini öldürmek için bağışıklık tepkisi oluşturmak amacıyla yakınındaki hücrelere işaret eden bir mesajcı molekül olan c-GAMP (siklil guanozin-adenozin monofosfat)

oluşturuyor. İnsan hücresi ayrıca c-GAMP yi parçalayan başka bir molekül olan ENPP1 (*Ectonucleotide pyrophosphatase*/phosphodiesterase family member 1) üretiyor. Bu anahtar adım ile bağışıklık cevap tepkisi kapatılıyor. Mtb bunu cdNP (siklik dinükleotit fosfodiesteraz) adı verilen bir molekül ile yapıyor. cdNP c-GAMP yi hidroliz ederek konsantrasyonu düşürüyor. Ve böylelikle, bağışıklık sistemine cevap oluşturacak konsantrasyona ulaşamıyor. Burada nükleik asitleri parçalayan bir enzim olan insan PDE (fosfodiesteraz), ENPP1 salgısının etkisini önceden yapılmış c-GAMP yi çabucak indirgeyerek ve bağışıklık tepkisini erkenden kapatma yoluna etki ederek çalışır. Fosfodiesteraz inhibitörü ise bağışıklık cevap çağrısının geri dönüşümünü sağlayarak Mtb ye karşı savaşmış olur. Böylelile, ENPP1 c-GAMP yi parçalayarak bağışıklık sisteminde cevap oluşmasını engellemiş oluyor.

Hücresel c-di-AMP, ATP veya ADP'nin iki molekülünden c-di-AMP üreten DisA_N domeynini (Pfam katılım PF02457) içeren diadenil siklazlar tarafından üretilir. DHH-DHHA1 veya HD domeyn ile ilişkili spesifik fosfodiesterazlar (PDE), c-di-AMP'yi pApA veya AMP'ye hidroliz eder (Bai ve ark. 2013, Manikandan ve ark. 2014,Huynh ve ark. 2015). Son zamanlarda, PDE aktivitesi olan birçok protein tanımlanmıştır. Gruplardan biri genellikle bir tandem PAS domeyni, bozulmuş bir GGDEF domeyni ve bir katalitik DHH-DHHA1 domeynini içeren GdpP benzeri protein ailesidir (Rao ve ark 2010). Diğer grup yakın bir zamanda bir hücre dışı 7TM reseptör benzeri domeyn ve bir sitoplazmik HD domeyni (Huynh ve ark. 2015) içeren PgpH protein ailesi olan diğer bir grup yakın zamanda keşfedildi. Hepsi c-di-AMP'yi doğrusal dinükleotid 5-pApA'ya hidrolize ederler. Ayrıca, tek başına bir DHH-DHHA1 domeyni ihtiva eden bir PDE ailesi vardır ve bunlar c-di-AMP ‘yi iki adimda hidroliz ederler; önce lineer 5-pApA, ki daha sonra iki 5-AMP molekülüne (Bai ve ark. 2013, Mankandan ve ark. 2014,Ye ve ark. 2014). Her türlü PDE enzimi katalitik aktivite için iyon gerektirir. HD alanının parçalanma mekanizması iyi incelenmiştir, ancak DHH-DHHA1 alanının c-di-AMP'yi nasıl parçaladığı açıklığa kavuşmamıştır. *M. tuberculosis* sadece bağımsız bir DHH-DHHA1 alanı içeren tek bir sitosolik c-di-AMP *fosfodiesteraz Rv2837c* barındırır. GdpP homolog proteinleri veya HD domain proteinlerini kodlamaz. Rv2837c, iki fonksiyonlu 3-5 eksonukleaz ve CysQ benzeri fosfataz (pAp) aktivitesi sergiler (Postic ve ark. 2012). Farklı RNA substratlarını veya tek sicimli DNA'yı 3-5 yönünde hidroliz eder. 2-mer oligonükleotidler Rv2837c'nin

(Postic ve ark. 2012, Srivastav ve ark. 2014) tercih edilen substratlarıdır. Rv2837c'nin silinmesinin M. tuberculosis enfeksiyonlarında virülansın azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (Dey ve Bishai 2014)). Rv2837c c-di-AMP'yi in vitro etkili bir şekilde hidrolize eder, ancak c-di-GMP üzerinde düşük aktiviteye sahiptir (Yang ve ark. 2014). Rv2837c'nin c-di-AMP homeostazının korunmasında önemli bir rol oynadığı açıktır. M. tuberculosis, c-di-GMP metabolizması için çok az enzime sahip olduğu için (Kumar ve Chatterji 2008), Rv2837c'nin c-di-GMP homeostazında da rol oynama olasılığı vardır.

Bu çalışmanın amacı da bu ölümcül bakterinin yaşamsal faaliyetleri için önemli olan ikincil haberci sinyal iletim mekanizmasında yer alan fosfodiesteraz enzimini hedef alan yeni ilaçları bilgisayar destekli yaklaşımla tasarlamaktır.

2.4.Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

Bilgisayarlı kimya son yıllarda teknolojik gelişmelere paralel olarak gelişen, kimyasal işlem ve reaksiyonları anlayabilmek ve geliştirmek için kullanılan bilim dalıdır. Bu sayede makrobiyolojik sistemlerin moleküler düzeyde incelenmesi, kimyasal sistemlerin kararlılığının ve yapılarının tahmin edilip karakterize edilmesi, atomik seviyedeki mekanizmalar ve izlenen reaksiyonların hangi yolla yürüdüğünü tespit etmek hedeflenmektedir.

Hesaplamalı kimya özel kimyasal sorunlar için metotlar ve var olan basit bilgisayar programlarının kullanıldığı alandır. Yeterince bilinmeyen moleküllerin bilinebilirliğini sağlamada veya deneysel yolla çalışılması zor olan reaksiyonların mekanizmalarının araştırılmasında kullanılır.Bileşiklerin verimli sentezine yardımcı olur.Deneysel kimyacılara yardımcı olur yada yeni bilgiler keşfetmeye teşvik eder. Kimyasal yapı ile özellikleri (QSPR ve QSAR) arasında korelasyonu kurmak için kullanılır ve en önemlisi de diğer moleküllerle spesifik etkileşen moleküllerin tasarlanmasına olanak verir.

Son yıllarda ilerleme gösteren Bilgisayarlı kimya, kimyasal reaksiyon ve yöntemleri araştırırken yeni kimyasal bilgileri açığa çıkarmak amacına yönelik bir alternatif oluşturmaktadır. Matematiksel bir yöntemin geliştirilip bilgisayarda kullanılabilecek duruma gelmesi söz konusu olduğunda kullanılmaktadır. Hedefi kimyasal sistemlerde kararlılık ve yapı tahmininde bulunulurken fiziksel hallerin değişimi durumunda enerjinin de değiştiği konusunda sonuçlara ulaşmaktır. Genel

olarak Bilgisayarlı kimya alanında izlenen yolun doğruluğundan emin olmak için diğer araştırmacıların üretebildiği ve sonuçları analiz edilebilen konular çalışılmaktadır.

Bu alanda çalışan bilimciler göreceli olmayan Schrödinger denklemini çözmeye yönelik çalışmalar yapmaktadır. Bu amaçla sürekli relativistic düzeltmeler eklenmektedir. Schrödinger denklemi prensip olarak ya zamana bağlı yada zamandan bağımsız olarak var olan problemleri uygun bir yolla çözmek için kullanılabilir olsa da uygulamaya geçilince sadece çok küçük sistemler için geçerli olduğu görülmüştür. Büyük moleküller daha çok yarı ampirik yöntemlerle çalışılırken, daha büyük olanlar ise moleküler mekanik metotlarla çalışılabilmektedir.

2.4.1.Ligand Temelli İlaç Tasarımı

Ligant temelli metotlar yapı temelli metotlara göre daha çok kullanılmaktadır. Hesaplamalı kimyacılar ellerinde yapısal bilgi bulunmadığında aktifliği bilinen ligantlardan oluşan bir seri ligandı hedef karşısına yerleştirip yapısal ve kimyasal özellikler üzerine araştırmalar yapmaktadırlar. Bu yaklaşımda hedef yapısı bilinmemekle beraber bunun yerine deneylerden elde edilen veriler ilaç tasarlarken kullanılmaktadır.

Ligant temelli ilaç tasarımı metodu aktiviteden sorumlu yapısal özellikleri sistematik bir çözüme ulaştırmaya dayanırken bu amaçla oluşturulmuş kütüphaneler kullanılıp deneysel bilgilere dayalı tasarımların geliştirilmesi esasına göre çalışılmaktadır. Her bir molekülün şekli dizayn edilir ve karakterize edildikten sonra yapısında farmakofor grupların olup olmadığının araştırılması ile büyük veri tabanlarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu yaklaşımla çalışılırken araştırılan yöntemler incelendiğinde ulaşılan İstatistiksel Yöntemler, Kemoinformatikler, Farmakoforlar bu yaklaşımın temelini oluşturmaktadır.

2.4.2.Yapı Temelli İlaç Tasarımı

Yapı temelli ilaç tasarımında hedef molekülün 3 boyutlu yapısının bilinmesi esastır. Hedef molekülün 3 boyutlu yapısı X-ray'den elde edilmektedir. Bu metotla ilaç hedefinin ligand-bağlanma bölgesinin şekil ve özelliklerinin bilinmesi sayesinde geleneksel ilaç tasarımına üstünlük sağlamaktadır. Küçük moleküller için çeşitli hesaplama araçları kullanılırken hedef için iyileştirilmiş ligantların tasarımına olanak

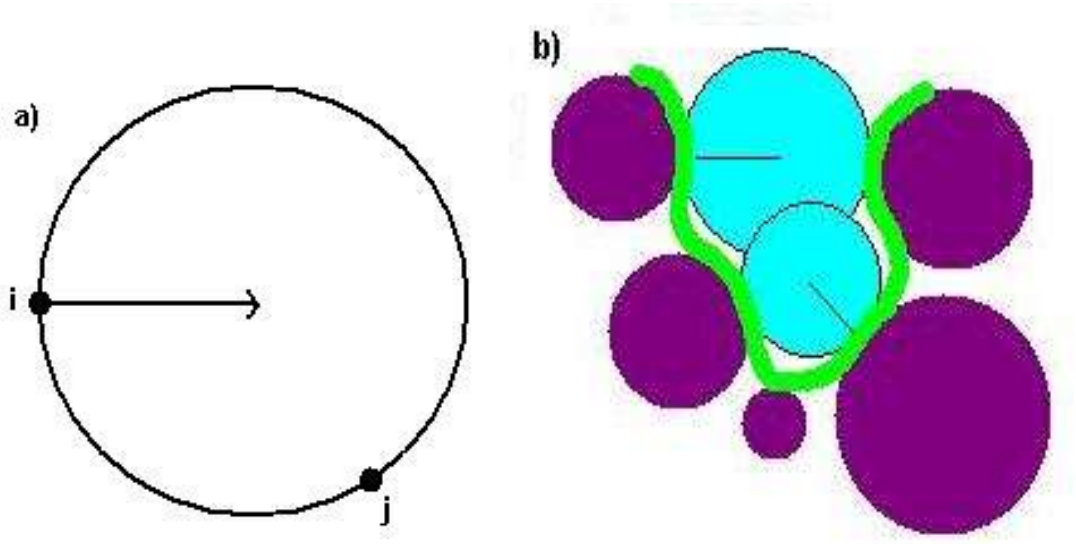
vermektedir.

Yapı temelli ilaç tasarımında kullanılan metotlar sayesinde proteinin yapısı, Homoloji Modelleme, Katlanma Bölgelerinin Tanınması, Ab İnitio Protein Modellemesi, Aktif Bölge Belirlenmesi alt adımları ile sağlanabilmektedir. Bir proteinin yapısal özelliklerinin belirlenmesinin laboratuar deneyleri ile gerçekleştirilmesinin çok uzun zaman ve emek gerektirdiği de göz önüne alındığında yapı temelli ilaç tasarımı yeni ilaç geliştirmeyi hedefleyen çalışmalar için çok avantajlı metotlardan oluşmaktadır.

2.4.2.1.Dock

Yapı Temelli ilaç tasarımında kullanılan metotlardan biri olan Dock metodu çok önemli bir yer tutmaktadır. Ligantın hedef moleküle ne konumda ve nasıl bağlanacağını öngörme olanağı sunmaktadır. Docking işleminin bir yaklaşımı vardır ve genetik algoritma kullanarak çalışır. Çalışma prensibi temel olarak yüklü bir oyuğa yüklü bir taneciğin optimum şekilde yerleşmesi esasına dayanır.

Dock çalışma prensibi olarak önce bir proteinin yüzeyi belirlenir. Bunu çapı belli bir bilyeyi protein üzerinde gezdirip mevcut oyukları tespit ederek yapmaktadır. Tespit edilen oyuklardaki yüzeyler yüklü hale gelirken ligant optimum enerji verecek şekilde yerleşmektedir. Her bir konformasyon ve yerleşme belli bir enerjiye tekabül ederken sonsuz sayıda konformasyon elde edilebilmektedir. Bu da hedef molekülün aktif merkezini bilmesekde bir ligantın moleküle nasıl yerleştiğini öngörme olanağı vermektedir.



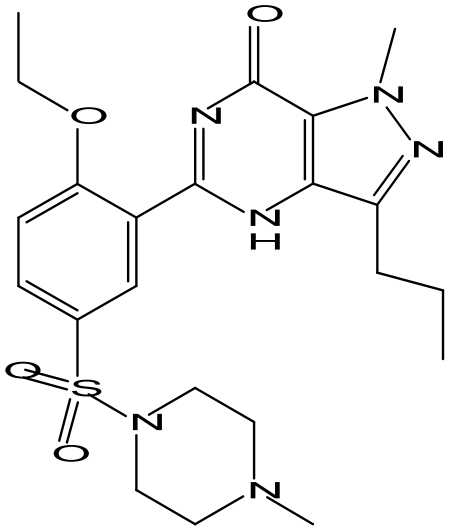
Şekil 7) : Dock ile yüzey belirleme

3.MATERYAL VE METOT

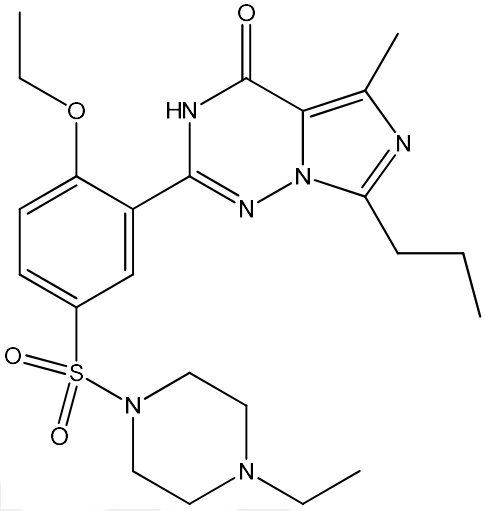
Çalışılan protein Protein Data Bank'tan (http://www.pdb.org) alındı (PDB code: 5ceu) temin edildi. Bu yap aynı zamanda halka açılma reaksiyonun uğramış c-di-AMP'in lineer formu ile kompleks halinde idi. Bunlar birbirlerinden ayrıldı. Reseptör için metaller hariç aminoasit olmayan artıklar silindi ve yapı rec.pdb olarak kaydedildi. Aynı yapıdan yalnız ligant seçilerek ve hidrojenler eklenerek yapı lig.pdb olarak kaydedildi. Tablo 1'de yer alan ligantlar Gaussian View 03 (Frish ve ark. 2004) paket programı kullanılarak üç boyutlu yapıları çizildi ve bunlar AM1 (Dwar ve ark.) seviyesinde Gaussian 03 programı (Frish ve ark. 2004) kullanılarak optimize edildi ve bu verilerden faydalanarak antechamber programı yardımı ile atomların yükleri AM1-BCC (Wang ve ark. 2006) ile hesaplandı. Reseptörün yükü Chimera ile hesaplandı.

Bu çalışmada, Dock 6.5 kullanılarak yerleştirme çalışmaları yapıldı (Lang ve ark. 2000). Yerleştirme (Docking) ligandların bağlanma yerine olası uyum ve oryantasyon popülasyonunu elde etmek için varsayılan ayarlarla uygulandı. Bağlama bölgesini belirlemek için bir küre tanımlandı. Bu küreninin minimum ve maksimum yarıçapları 1,4 ve 4.0 Å olarak alındı. Bağlanma işlemi sırasında ligantlardaki bütün dihedral açıların dönmesine izin verildi.

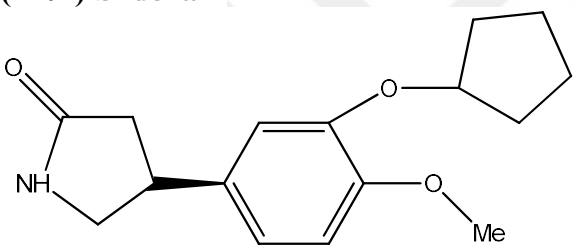
Tablo 1. Literatürlerden Seçilen ve Tasarlanan Ligantlar



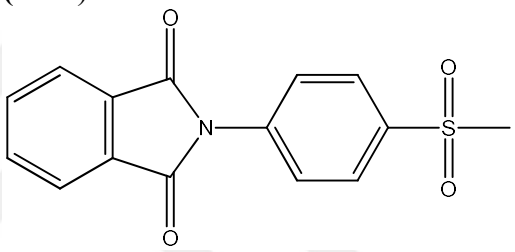
(L-01)-Sildenafil



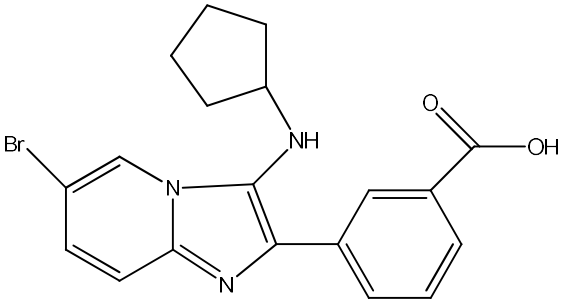
(L-02)- Vardenafil



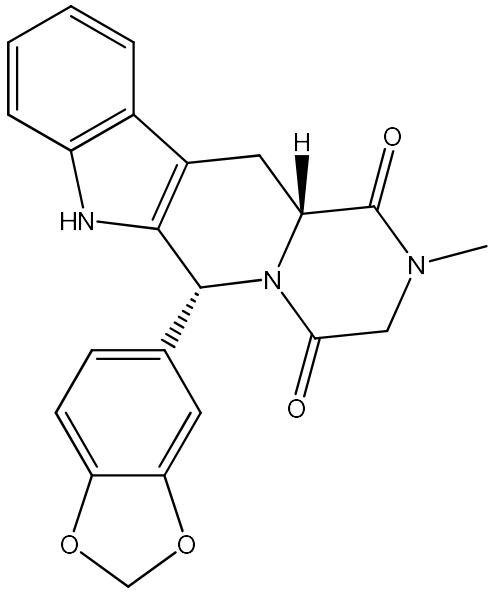
(L-03)- (R)-Rolipram
(4*R*)-4-[3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl]pyrrolidin-2-one



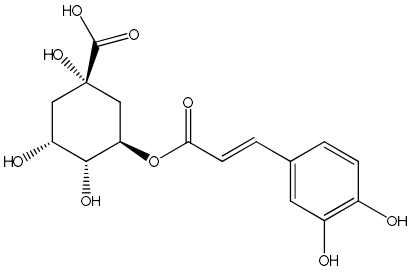
(L-04)-



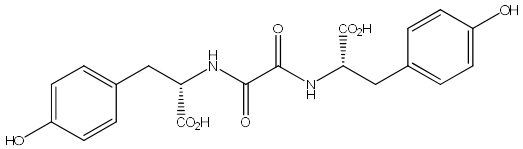
(L-05)-
3-[6-bromo-3-(cyclopentylamino)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl]benzoic acid



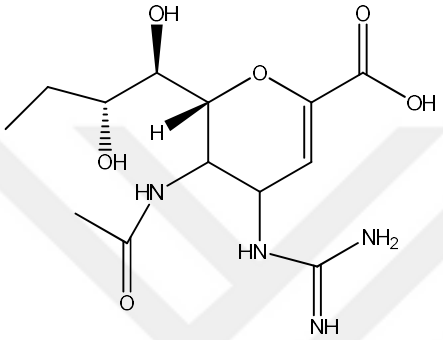
(L-06)-Tadalafil (Cialis)



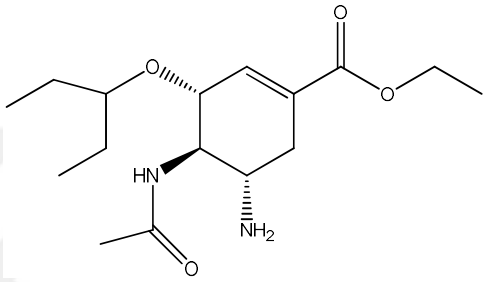
L-07-(-)-5-Caffeoyl quinic acid
Cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[(2*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]oxy]-1,4,5-trihydroxy-, (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-



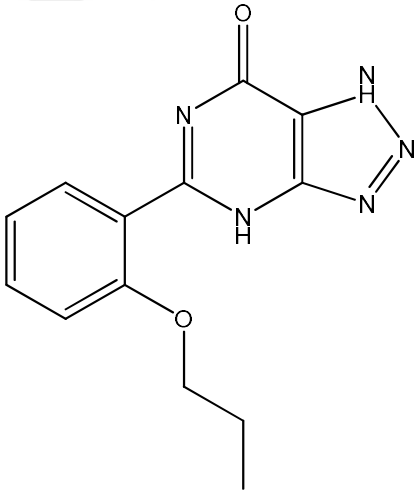
L-08-*N*,*N*'-(1,2-dioxo-1,2-ethanediyl)bis- L-tyrosine



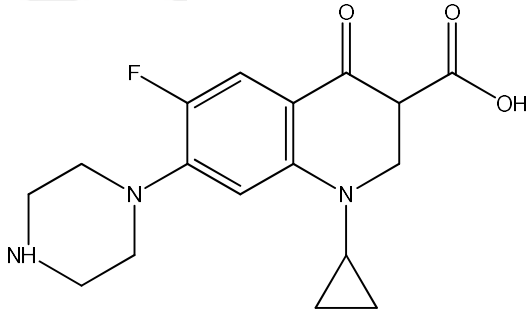
(**L-09**)-
5-(acetylamino)-4-[(aminoiminomethyl)amino]-2,6- anhydro-3,4,5,9,10-pentadeoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-Dec-2-enonic acid



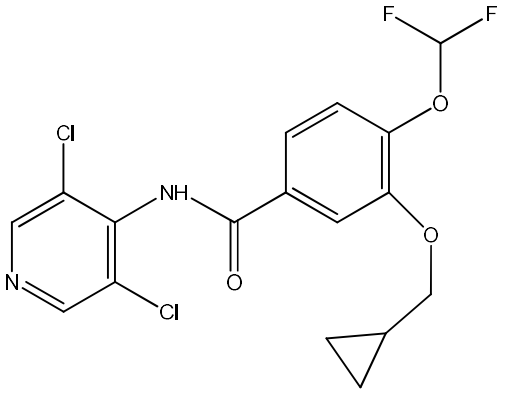
(L-10)-(-)-Oseltamivir
ethyl (3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-pentan-3-yloxycyclohexene-1-carboxylate



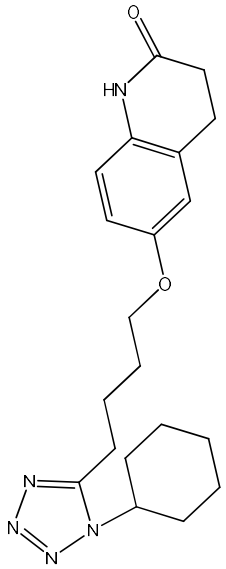
(**L-11**)-Zaprinast
3,6-dihydro-5-(2-propoxyphenyl)-7*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pyrimidin-7-one



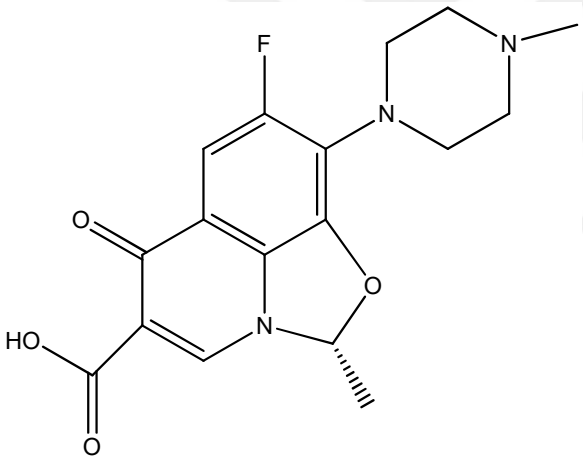
(**L-12**)
1-cyclopropyl-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid



(**L-13**)-Daliresp
3-(cyclopropylmethoxy)-*N*-(3,5-dichloro-4-pyridinyl)-4-(difluoromethoxy)benzamide

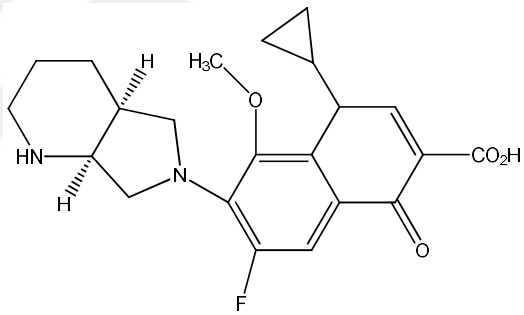


(L-14)-Cilostazole
6-[4-(1-cyclohexyl-1*H*-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2(1*H*)-quinolinone

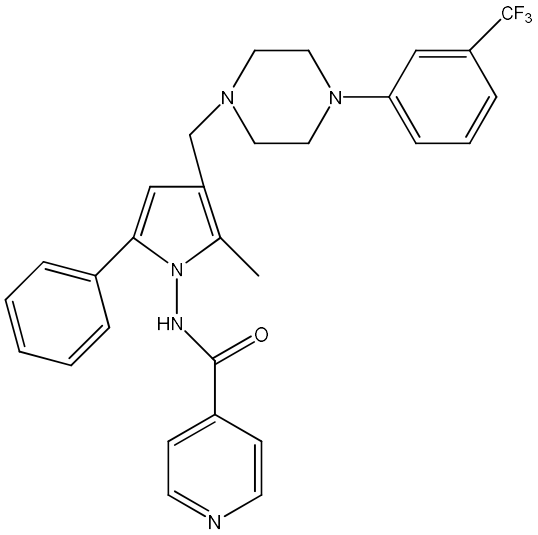


(L-15)-
8-fluoro-2-methyl-9-(4-methyl-1-piperazinyl)-6-oxo-2*H*,6*H*-oxazolo[5,4,3-*ij*]quinoline-5-carboxylic acid

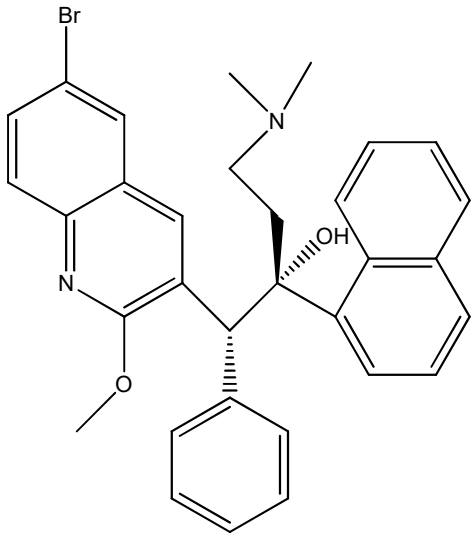
,



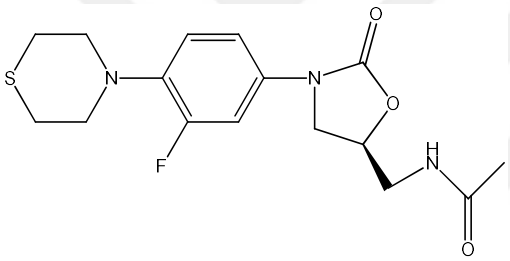
(L-16) CAS Registry Number 1835182-71-2**)**



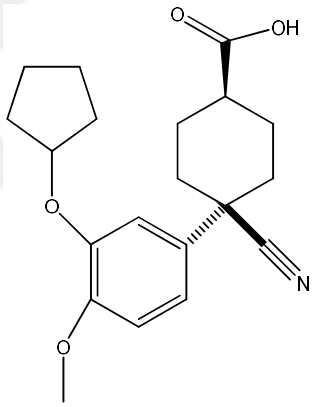
(**L-17**)-Sudoterb
N-[2-methyl-5-phenyl-3-[[4-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1-piperazinyl]methyl]-1*H*-pyrrol-1-yl]-4-pyridinecarboxamide



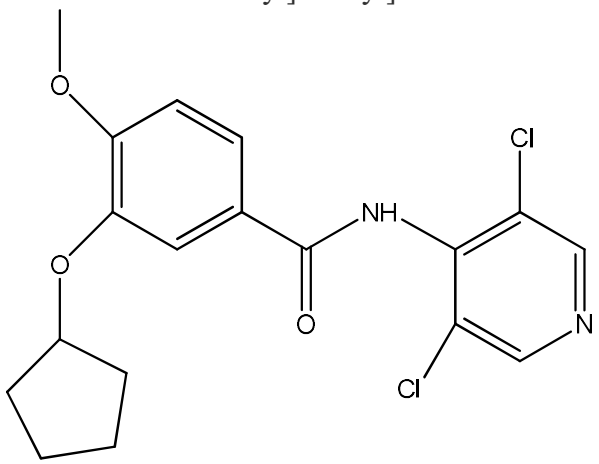
(L-18)-Bedaquiline
(1R,2S)**-1-(6-Bromo**-2-**methoxy-3**-quinolinyl**)**-4-(dimethylamino**)**-2-(**1-naphthyl)-1-phenyl**-2-butanol



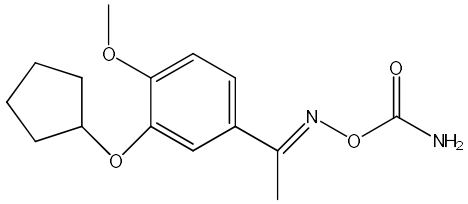
(**L-19**)-Sutezolid
N-[[(5*S*)-3-[3-fluoro-4-(4-thiomorpholinyl)phenyl]-2-oxo-5-oxazolidinyl]methyl]acetamide



(L-20)- Cilomilast
4-cyano-4-[3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl]cyclohexanecarboxylic acid



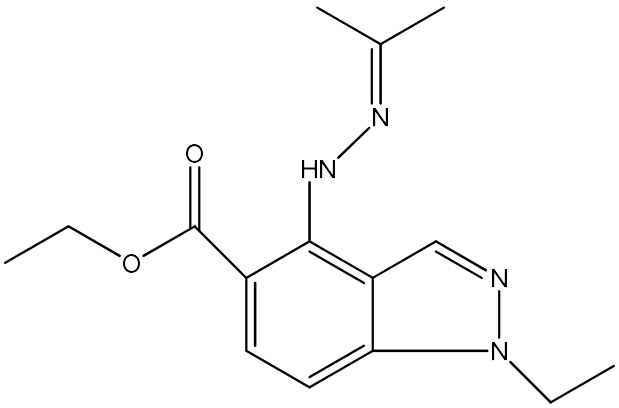
(L-21)- Piclamilast

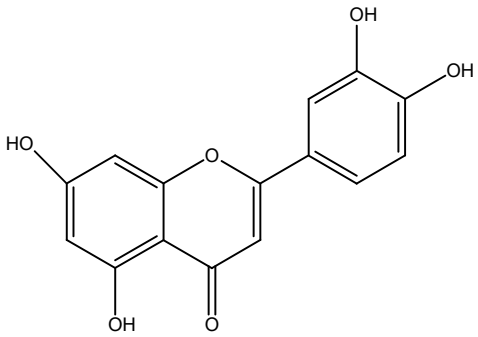


(L-22)-Filaminas (PDA 641)

3-(cyclopentyloxy)-*N*-(3,5-dichloro-4-pyridinyl)-4-methoxybenzamide

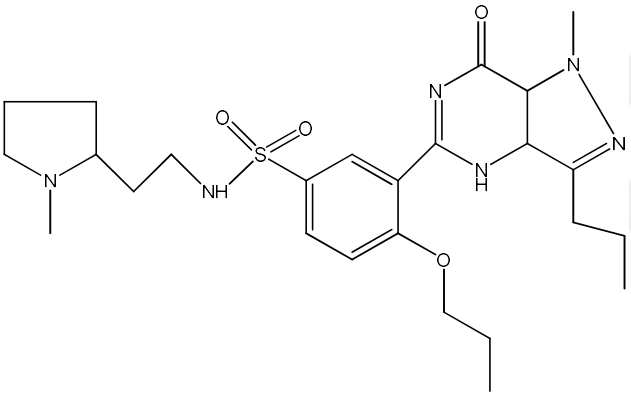
(1*E*)-1-[3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl]-*O*-(aminocarbonyl)oximeethanone

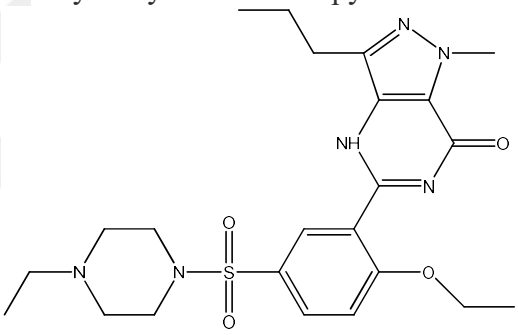




(L-23)-Etazolate
1-ethyl-4-[2-(1-methylethylidene)hydrazinyl] ethyl ester

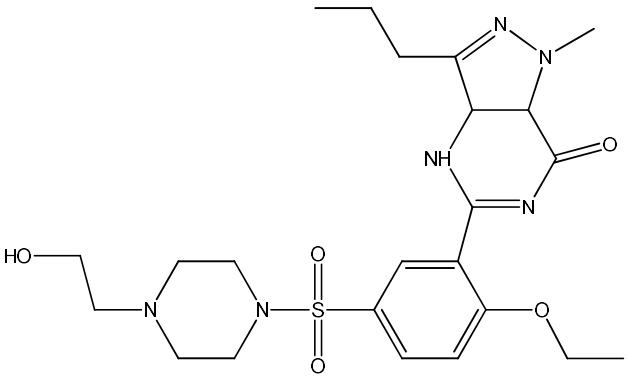
(L-24)- Cyanidenon
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-1-Benzopyran-4-one

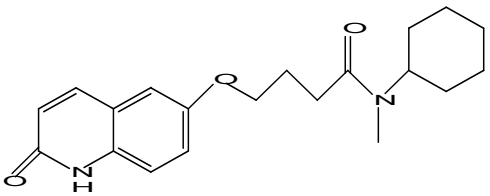




(L-25)

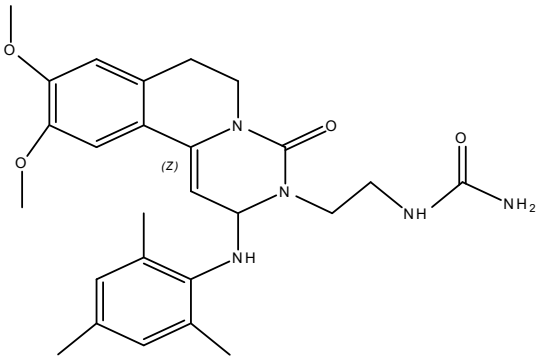
(L-26)



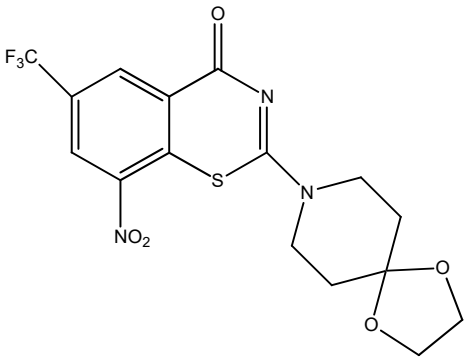


(L-27)

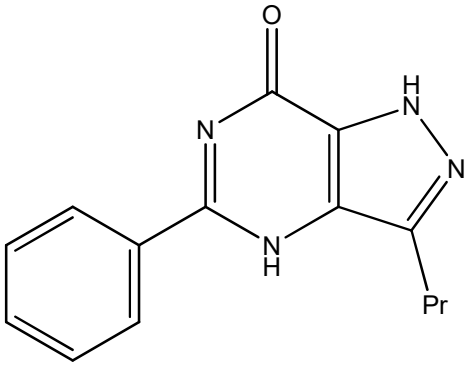
(L-28)-Cilostamide
N-cyclohexyl-4-[(1,2-dihydro-2-oxo-6-quinolinyl)oxy]-*N*-methylbutanamide



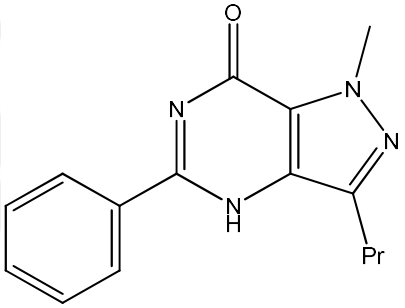
(**L-29)**



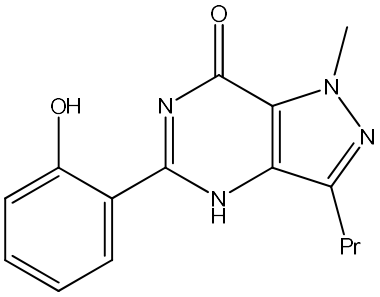
(L-30)-BTZ038
2-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]dec-8-yl)-8-nitro-6-(trifluoromethyl)-4*H*-1,3-benzothiazin-4-one



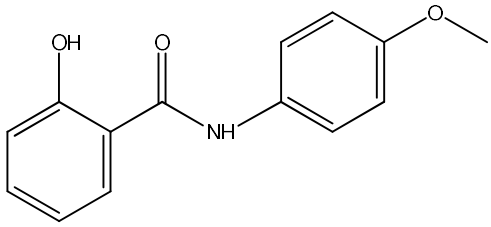
(L-31)



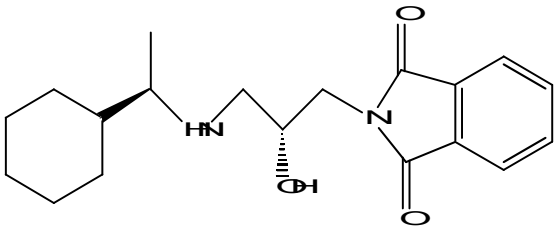
(L-32)
1,6-dihydro-1-methyl-5-phenyl-3-propyl-7*H*-Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one



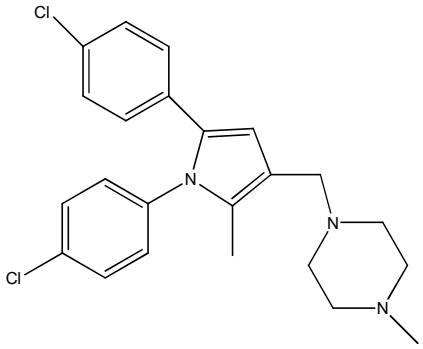
(L-33)
1,6-dihydro-5-(2-hydroxyphenyl)-1-methyl-3-propyl-7*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one



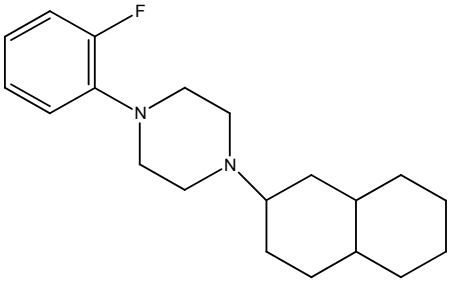
(L-34)
2-hydroxy-*N*-(4-methoxyphenyl)-benzamide



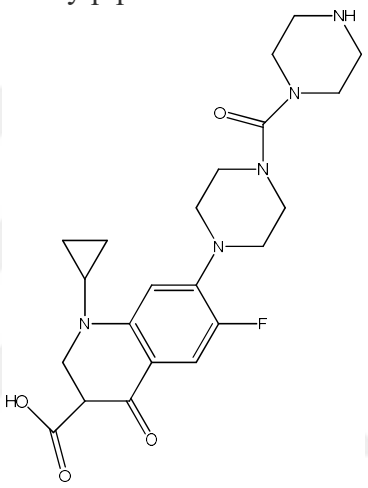
(L-35)
2-[(2*S*)-3-[[(1*S*)-1-cyclohexylethyl]amino]-2-hydroxypropyl]1*H*-isoindole-3(2*H*)-dione



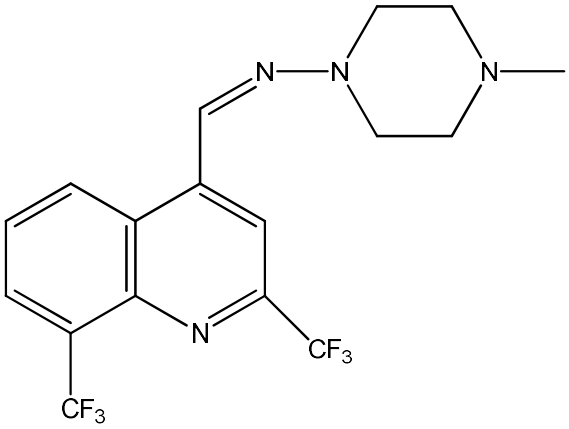
(L-36)- BM 212
1-[[1,5-bis(4-chlorophenyl)-2-methyl-1*H*-pyrrol-3-yl]methyl]-4-methylpiperazine



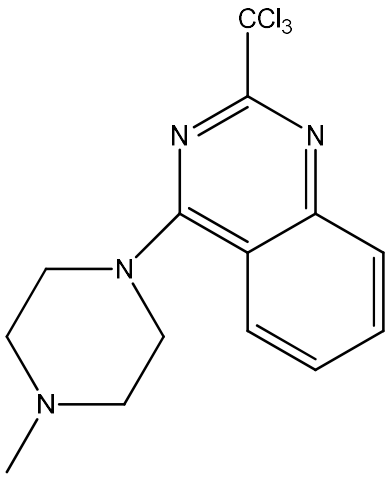
(L-37)
1-(Decahydro-2-naphthalenyl)-4-(2-fluorophenyl)piperazine



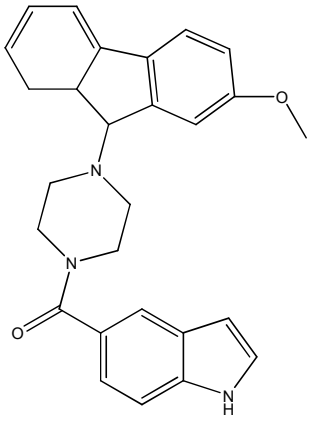
(L-38)
1-Cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-[4-[(piperazin-1-yl)carbonyl]piperazino]-1,4-dihydro-3-quinolinecarboxylic acid



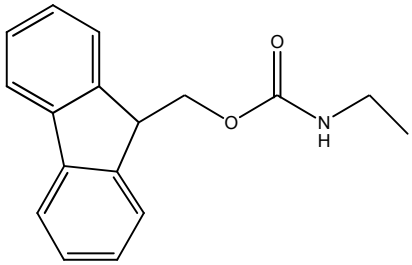
(L-39)
N-[[2,8-bis(trifluoromethyl)-4-quinolinyl]methylene]-4-methyl-1-piperazinamine



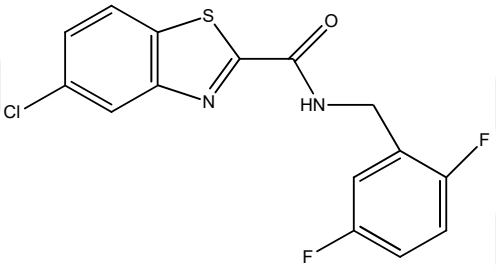
(L-40)
4-(4-Methyl-1-piperazinyl)-2-(trichloromethyl)quinazoline



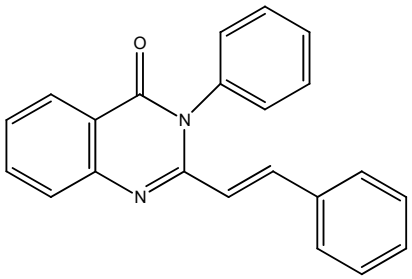
(L-41)
1H-Indol-5-yl[4-(2-methoxy-9H-fluoren-9-yl)-1-piperazinyl]methanone



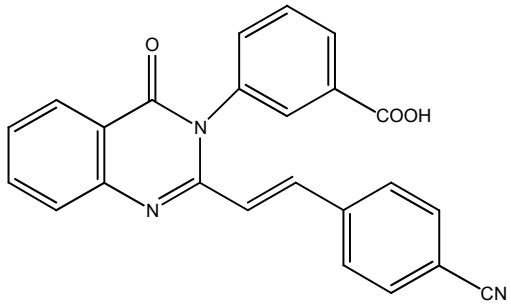
(L-42)
Carbamic acid, *N*-ethyl-, 9*H*-fluoren-9-ylmethyl ester



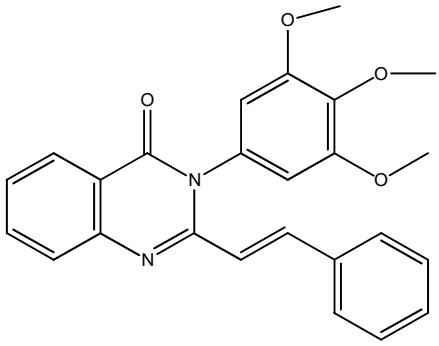
(L-43)
5-chloro-*N*-[(2,5-difluorophenyl)methyl]-2-Benzothiazolecarboxamide



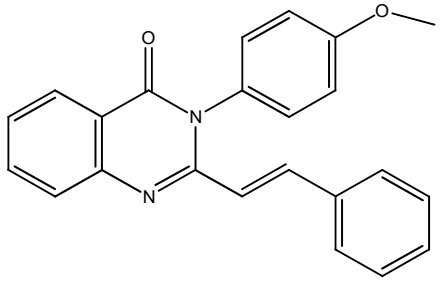
(L-44)
3-Phenyl-2-[(1E)-2-phenylethenyl]-4(3H)-quinazolinone



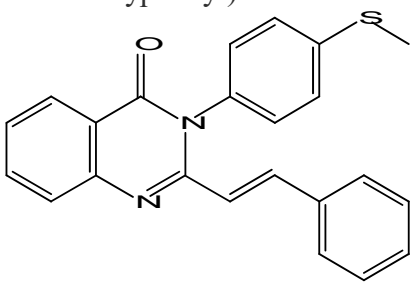
(L-45)
3-[2-[(1E)-2-(4-Cyanophenyl)ethenyl]-4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]benzoic acid



(L-46)
4(3*H*)-Quinazolinone, 2-[(1*E*)-2-phenylethenyl]-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-

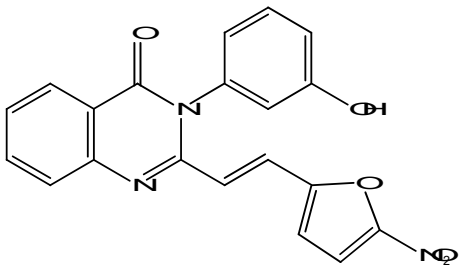


(L-47)
4(3*H*)-Quinazolinone, 2-[(1*E*)-2-phenylethenyl]-



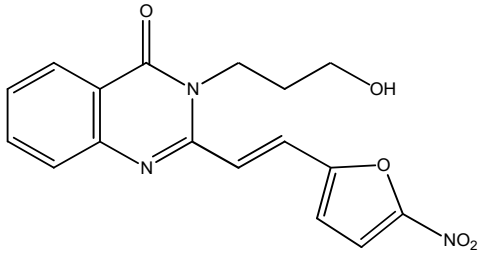
(L-48)
4(3*H*)-Quinazolinone, 3-[4-

3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-

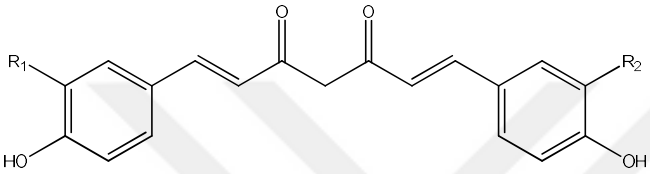


(L-49)
4(3*H*)-Quinazolinone, 3-(3-hydroxyphenyl)-2-[2-(5-nitro-2-furanyl)ethenyl]-

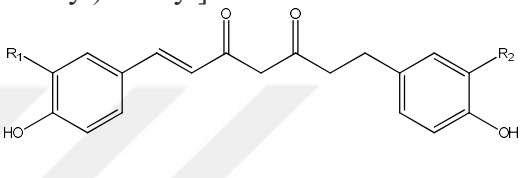
(methylthio)phenyl]-2-[(1*E*)-2-phenylethenyl]-



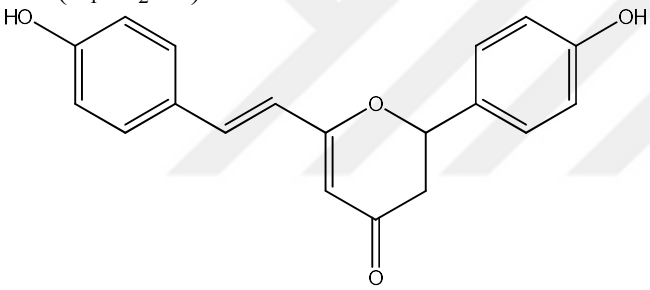
(L-50)
4(3*H*)-Quinazolinone, 3-(3-hydroxypropyl)-2-[(1*E*)-2-(5-nitro-2-furanyl)ethenyl]-



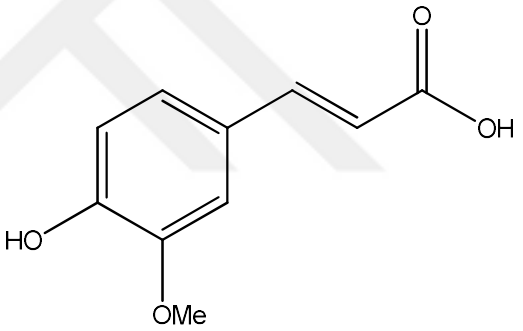
001 (R_1=R_2=OMe)
002 (R_1=OMe, R_2=H)
005 (R_1=R_2=H)



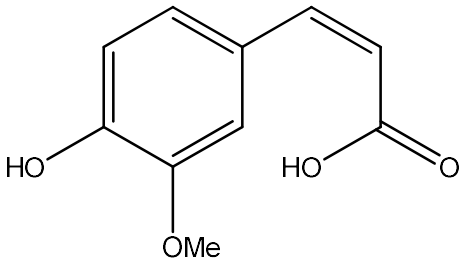
008 (R_1=R_2=OMe)
010 (R_1=H, R_2=OMe)



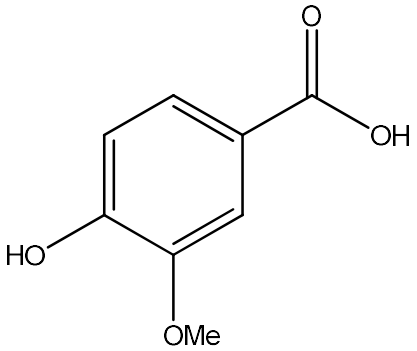
016



027



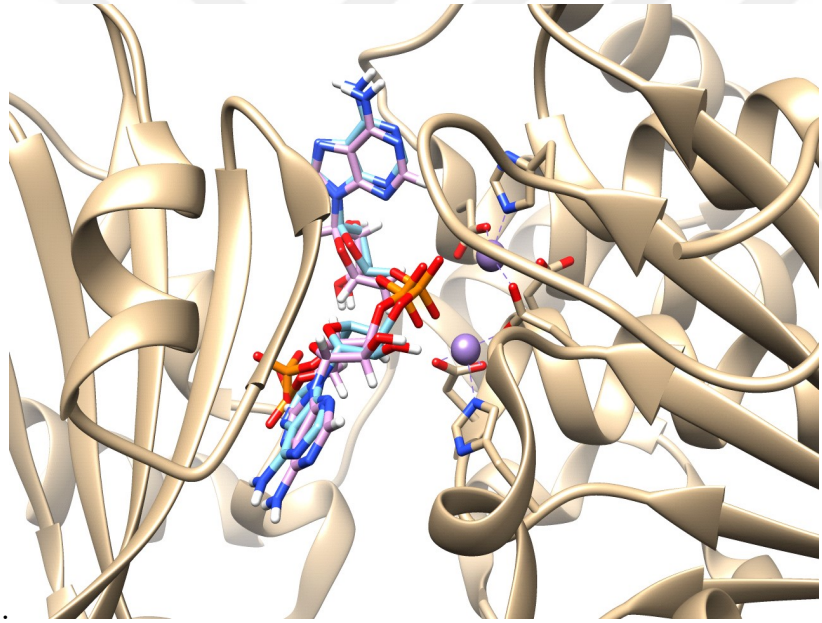
028



029

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

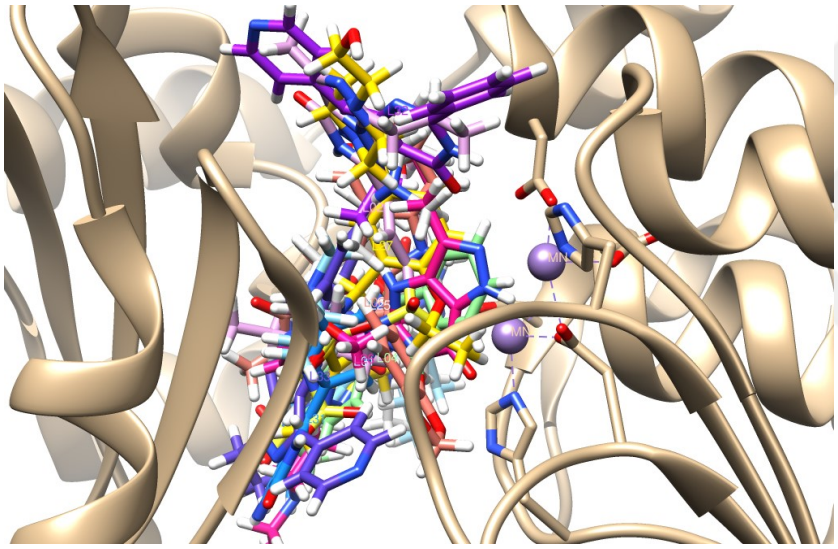
Kullandığımız dock programının validasyonunu sağlamak için protein data bank tan aldığımız hedef proteinin hazırda bulunan inhibitörü ile 3 boyutlu yapısı alındı. Bu inhibitör proteinin aktif merkezinden çıkarıldı. Protein ve ligant ayrı ayrı kaydedilirken mevcut yapısı belli ligantın orjinale göre bağlanıp bağlanmadığı test edildi (**Şekil 1).** Burada görüldüğü gibi yerleştirilen ligant orijinal koordinatlara göre neredeyse tıpatıp aktif merkeze yerleştirilmiştir. Dolayısıyla bundan yola çıkılarak mevcut diğer inhibitörler için de bu yaklaşımın güvenilir sonuçlara vereceğine karar verildi ve bütün ligantlat benzer bir yaklaşımla proteine yerleştirildi (**Şekil 2**). Ligantların büyük bir çoğunluğu aktif merkeze veya aktif merkezi bloke edecek periferiye yerleştiği görüldü (**Şekil 2**). Ligantların Dock Skorları Çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil 1. Orijinal ligantın x-ray (mavi) ve dock edilmiş (mor) koordinatlarının üst-üste çakıştırılması.

Bu ligantlar içinde **L01-L50** olanlardan bazıları anti tüberküloz ilacı bazıları da fosfodiesteraz inhibitörü olarak halı hazırda kullanılmaktadır. Diğer bazıları (**001, 002, 005, 008, 0016, 027, 028** ve **029**) zencefilin (*Curcuma longa L.*) yapısında bulunan doğal bileşiklerdir (Shiyou ve ark. 2011). Orijinal ligantın dock skoru -82.02 kcal mol^{-1} olarak belirlendi. Cinsel fonksiyon bozukluğu tedavisinde kullanılan, sildenafil (**L01**) (Terrett ve ark. 1996), vardenafil (**L02**) (Kloner ve Robert 2005) bunlara alterntif olarak geliştirilen **L25-L27** (Bujang ve ark. 2017.) ve bunların (**L01** ve **L02**) türevi olan **L31-**

L33 (Antunes, ve ark. 2008) ligantları yanı sıra aynı amaçla kullanılan cialisin (**L06**) (Daugan ve ark. 2003) ve fotoaktif polimerlerin sentezinde kullanılan **L04**.(Kim ve ark. 2001.) proteinin aktif merkezine (**Şekil 2**) sırasıyla -46.30, 44.30, -48.85, -46.60, -42.57, -32.72, -45.38, -36.01, -39.79, -31.81 kcal mol^{-1} dock skorlarları (Tablo 2) ile yerleştiği görülmekedir. **L01**, **L02** ve **L06**'nın proteinle etkileşimlerinde Arg112, 294 ve His41, 132 ve 312 artıkların rol aldığı belirlendi (**Şekil 2**). Ligantların çoğunun dock skorları -30 kcal mol^{-1} 'nın üstünde değelere (>-30) sahipken bunlardan **L01, L02** ve **L31** yanısıra **L15, L16, L17, L26, L27, L30, L45** ve **L46**'nın dock skorları -40 kcal mol^{-1}'in altında dock skorlarına sahiptir.

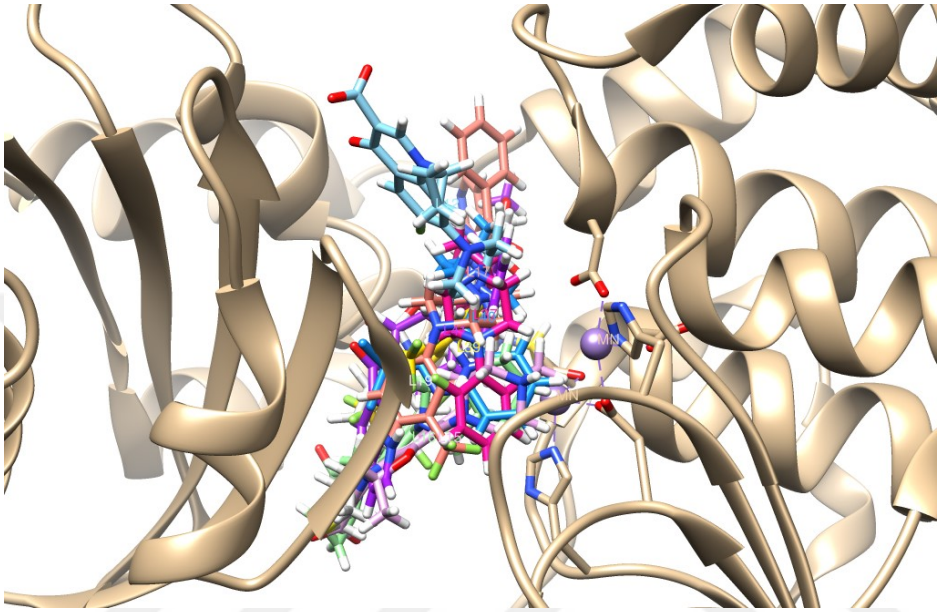


Şekil 2. L01, L02, L04, L06, L25, L26, L27, L31, L32 ve **L33**'ün proteine bağlama modları.

Kinolin türevi olan ve antitüberküloz etkisi gösteren **L12** (Foroumadi ve ark. 2003), antibakteriyal aktivite gösteren **L15** (Kokai 1982), L16 (Sturini ve ark. 2014) ile piperazin türevi olan **L17** (Hardik ve ark. 2017), yine antitüberküloz etki gösteren **L19** (Makafe ve ark. 2016), **L37** (Bogatcheva ve ark. 2006), L39 (Jayaprakash ve ark.2006), **L40** (Srivastav,ve ark. 2013) ve **L41** (Kuove ark. 2003) sırasıyla -39.74, -49.50, -46.42, -44.62, -33.29, -31.74, -33.54, -28.87 ve -36.60 kcal mol-1 dock skorları ile proteine yerleştiği görüldü (Tablo 2). Bunlardan **L15** ile **L16**'nın benzer bir mode aktif merkeze bağlandığını ve **L15**'in tanınmasında yükarıdaki ligantlara (**L01** ve **L02**) benzer olarak Arg112 ve His43 artıklarının rol oynadıkları **L12** ve **L16**'in tanınmalarında ise sırasıyla Arg270 ve Lys282 artıklarının rol aldığı görüldü (**Şekil 3**). Bu üç ligandın da göreceli

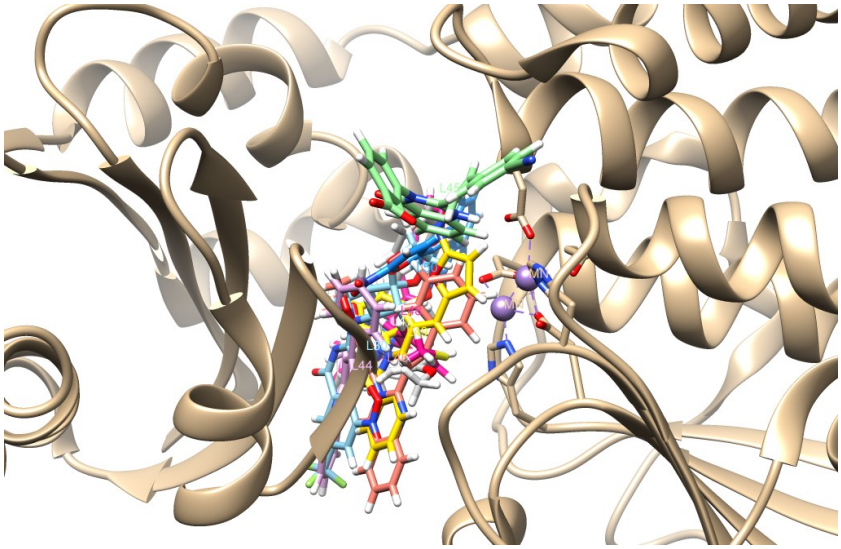
olarak **L17** ile birlikte bu grupta diğer kalan ligantlardan daha etkili bir şekilde (daha düşük dock skorları) proteine bağlandığı bulundu

.



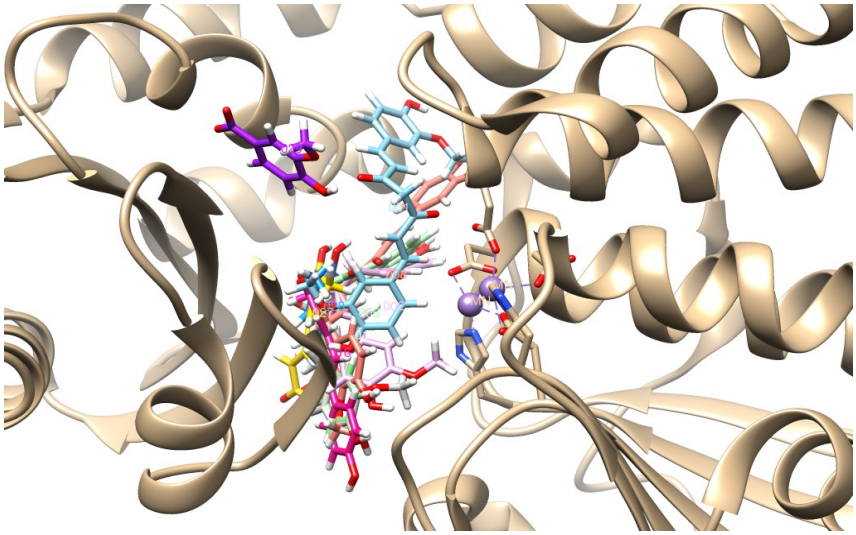
Şekil 3. L12, L15, L16, L17, L19, L37, L39, L40 ve **L41** proteine bağlanma modları.

Antimikrobiyal etki gösteren ve **L30** (Makarov ve ark. 2007) ve antitüberküloz aktivite gösteren kuinazolinon türevleri olan **L44-L50** (Jadhavar ve ark. 2016) sırasıyla -42.40, -35.27, -46.14, -45.89, -36.72, -38.30, -38.55 ve -37.62 kcal mol^{-1} dock skorlarıyla enzimin aktif bölgesine yerleştiği görüldü (Tablo 2). **L30**'nün aktif merkezine bağlanmasında Arg112 ve 294 artıkları yer alırken **L44**'ün aktif merkezde tanınmasında His43 ve Arg112 yer almaktadır. **L45** için ise Trp187 önemli bir rol oynamaktadır. **L46**'nin proteine tutunmasında His132 ve 312 artıkları öne çıkarkan **L47**'nınkinde His41 ve 43, Arg112 ve Glu263 artıkları aktif rol almaktalar. **L48** ve **L49**'a gelince bunların aktif merkeze bağlanmasında His41, 43 ve 132, Arg112 ve Glu263 **L48** için öne çıkarken Arg112, His132 ve 312 **L48** için öne çıktığı görülmektedir. **L50** içinse His43 için önemli bir kalıntı olduğu ortaya çıktı. Bu ligantların protein ile verdikleri kompleksler **Şekil 4**'te görülmektedir.

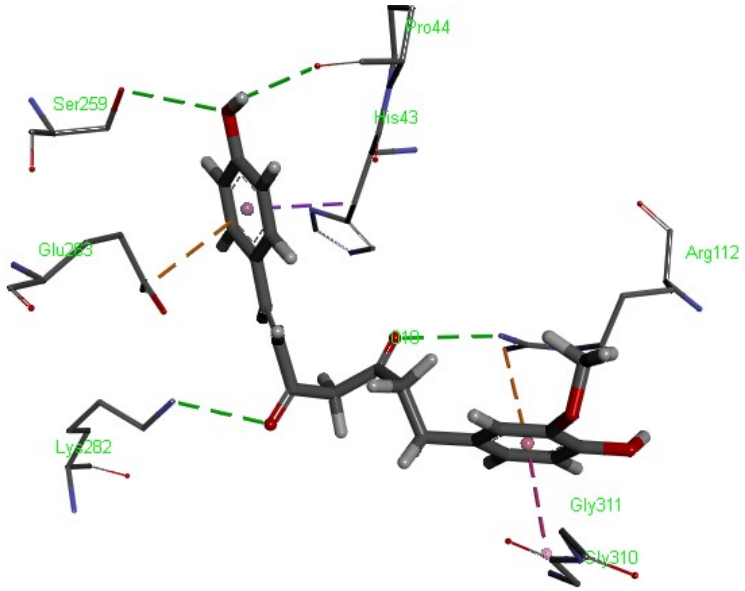


Şekil 4. L30, **L44-50** bileşiklerinin proteine bağlanma modları.

Zencefilde bulunan bileşiklerin (**001, 002, 005, 008, 010, 016, 027, 028, 029**) (Shiyou ve ark. 2011) proteinle verdiği komplekslerin dock skorları Tablo 2'de görülmektedir. Bunlardan 029 hariç diğerlerin aktif merkeze benzer mod ile bağlandıkları görülmektedir (**Şekil 5**). Taranan bütün ligantlar içinde zencefilde bulunan **010** bileşiği ve **L25** ile **L38** (Chen ve ark. 2013)'nın iyi dock skorları verdikleri (sırasıyla -50.55, -65.30 ve -60.37 kcal mol^{-1}) görüldü. **001**'in proteine bağlanmasında His43, Arg112 ve Lys282 artıklarının etkili olduğu ortaya çıkarken (**Şekil 6**).



Şekil 5. 001, 002, 005, 008, 010, 016, 027, 028 ve **029** ligantlarının protein bağlanma modları.



Şekil 6. 010 ligandının proteine bağlama modunun detaylı gösterimi.

Çizelge 2. Ligandların Dock Skorları

Ligandlar	**Dock Skorları (kcal/mol)**		
	Toplam	**vdW**	**Elektrostatik**
Orijinal	-82.02	-66.31	-15.71
L-01	-46.30	-47.88	1.58
L-02	-44.74	-44.35	-0.39
L-03	-30.41	-30.85	0.44
L-04	-31.81	-25.26	-6.55
L-05	-38.42	-26.61	-11.81
L-06	-39.79	-36.82	-2.96
L-07	-32.52	-26.86	-5.66
L-08	-33.26	-32.80	-0.46

L-09	-38.28	-32.88	-5.41
L-10	-33.21	-25.77	-7.44
L-11	-35.19	34.56	-0.626
L-12	-39.74	-31.28	-8.46
L-13	-36.03	-34.97	-1.06
L-14	-35.39	-34.41	-0.98
L-15	-49.50	-31.09	-18.41
L-16	-46.42	-38.90	-7.52
L-17	-44.62	-43.53	-1.09
L-18	-33.64	-32.60	-1.03
L-19	-33.29	-29.13	-4.16
L-20	-34.29	-32.15	-2.14
L-21	-34.54	-33.91	-0.63
L-22	-32.49	-29.99	-2.49
L-23	-32.04	-32.43	0.39
L-24	-34.30	-28.34	-5.96
L-25	-65.30	-61.26	-4.04
L-26	-46.60	-46.00	-0.60
L-27	-42.57	-41.77	-0.79
L-28	-25.01	-18.13	-6.88
L-29	-33.52	-32.33	-1.19
L-30	-42.40	-42.31	-0.10
L-31	-39.14	-37.10	-2.04
L-32	-41.02	-37.96	-3.05
L-33	-40.82	-35.12	-5.70
L-34	-34.87	-32.39	-2.48
L-35	-26.69	-29.34	2.66
L-36	-34.68	-34.43	-0.25
L-37	-31.74	-28.39	-3.35
L-38	-60.37	-44.87	-15.49
L-39	-33.54	-30.98	-2.56

L-40	-28.87	-24.50	-4.37
L-41	-36.60	-33.30	-3.30
L-42	-33.21	-29.79	-3.41
L-43	-34.10	-29.17	-4.93
L-44	-35.27	-35.91	0.64
L-45	-46.14	-37.76	-8.38
L-46	-45.89	-45.32	-0.57
L47	-36.72	-33.27	-3.45
L48	-38.30	-33.99	-4.31
L49	-38.55	-35.85	-2.70
L50	-37.62	-35.001	-2.62
001	-35.31	-31.29	-4.03
002	-34.75	-30.51	-4.24
005	-32.13	-31.60	-0.53
008	-39.31	-36.37	-2.94
010	-50.55	-44.78	-5.77
016	-44.92	-38.99	-5.92
027	-30.21	-21.50	-8.71
028	-25.02	-18.13	-6.88
029	-24.77	-21.16	-3.61

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Orijinal ligant ile birlikte toplamda 59 ligant c-dNMP'ı siklik fomdan lineer forma dönüştüren enzim olan Mbt fosfodiesteraz enzimine dock edildi. Elde edilen sonuçlar ligantların bağlanma modlarını ortaya çıkardığını ve bunlardan faydalanarak bu ölümcül bakteriye karşı yeni ilaçların keşfine yönelik çabalara ışık tutabilecek bilgi sağladığını söyleyebiliriz. Ligantların protein bağlanmalarında His41, 43 ve Arg112 artıklarının temel olarak etkili olduğu görüldü. Daha detaylı bilgi sağlamak için bu komplekslerden en az dock skoru -40 kcal mol-1'den daha düşük olanlar için moleküler dinamik hesaplamalar yapılarak bağlanma modları hakında hem daha detaylı bilgi hem de daha güvenilir bağlanma enerjileri elde edilebilir.

6.KAYNAKLAR

Antunes, Joao., Freitas,E., Matheus, P., Elaine, F., Ramalho,F., Teodorico, C., Rittner, Roberto.2008. In silico prediction of novel phosphodiesterase type-5 inhibitors derived from Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil. Bioorganic & Medicinal Chemistry.16(16), 7599-7606.

Bai, Y., Yang, J., Eisele, L. E., Underwood, A. J., Koestler, B. J., Waters, C. M., Metzger, D. W., and Bai, G. 2013 .Two DHH subfamily 1 proteins in Streptococcus pneumoniae possess cyclic di-AMP phosphodiesterase activity and affect bacterial growth and virulence***. J. Bacteriol***. 195:5123–5132

Bejerano-Sagie, M., Oppenheimer-Shaanan, Y., Berlatzky, I., Rouvinski, A., Meyerovich, M., and Ben-Yehuda, S. 2006 A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in Bacillus subtilis Cell, 125: 679–690

Bogatcheva, Elena., Hanrahan, Colleen., Nikonenko, Boris., Samala, Rowena., Chen, Ping., Gearhart, Jacqueline., Barbosa, Francis., Einck, Leo.,Nacy, Carol A.2006.

Protopopova, Marina. Identification of New Diamine Scaffolds with Activity against Mycobacterium tuberculosis. ***Journal of Medicinal Chemistry*** , 49(11): 3045-3048

Bujang, Nur Baizura., Chee, Chin Fei., Heh, Choon, Han., Rahman,A., Noorsaadah, B., Michael, J. C. 2017. Food Additives & Contaminants, Part A , 34(7), 1101-1109

Burdette, D. L., Monroe, K. M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J. S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Vance, R. E. 2011.STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature 478, 515–518

Burdette, DL., 2013. Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. Nat Immunol; 14(1):19–26.

Cai, X., Chiu, YH., Chen ZJ.2014. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. Mol Cell. 54(2):289–96.

Chang, J. C. et al.2009. Genes and Mycobacterium tuberculosis cholesterol metabolism. J. Bacteriol. 191, 5232-5239 .

Chen, Po-Ting; Lin, Wen-Po; Lee, An-Rong; Hu, Ming-Kuan. 2013. Molecules. 18, 7557-7569

Chiang, Y. R. et al.2008. Cholest-4-en-3-one-delta 1-dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 74, 107-113 .

Corrigan, R. M., Campeotto, I., Jeganathan, T., Roelofs, K. G., Lee, V. T., and Gru¨ndling, A. 2013. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 9084–9089

Corrigan, RM., 2011. et al. c-di-AMP is a new second messenger in Staphylococcus aureus with a role in controlling cell size and envelope stress. PLoS Pathog; 7(9):e1002217

Corrigan, RM., Grundling, A 2013.. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. Nat Rev Microbiol. ; 11(8):513–24.

Daugan, A., Grondin, P., Ruault, C., Le Monnier de Gouville, AC., Coste, H., Kirilovsky, J., Hyafil, F., Labaudinière, R., 2003. "The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 1: 5,6,11,11a-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,3(2H)-dione analogues**". *Journal of Medicinal Chemistry*.** 46 (21): 4525–32.

Davies, BW.,2012. et al. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for V. cholerae virulence. Cell.; 149(2):358–70.

Dewar, MJS., Zoebisch, EG., Healy, EA., Stewart, JJP., .1985. The development and use of quantum-mechanical molecular-models. 76. AM1—a new general-purpose quantum-mechanical molecular model. J Am Chem Soc 107:3902–3909

Dey, B., and Bishai, W. R. 2014. Crosstalk between Mycobacterium tuberculosis and the host cell. Semin. Immunol. 26, 486–496

Diner, EJ.,2013. et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. Cell Rep; 3(5):1355–61.

Foroumadi, A., Soltani, F., Asadipour, A.2003. Antituberculosis agents VII. Synthesis and in vitro evaluation of antimycobacterial activity and cytotoxicity of some N-piperazinyl quinolone derivatives. Bollettino Chimico Farmaceutico 142(3): 130-134.

Gao D, et al.2013. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. Science. 341(6148):903–6.

Gao, J., Tao, J., Liang, W., Zhao, M., Du, X., Cui, S., Duan, H., Kan, B., Su, X., and Jiang, Z. 2015 Identification and characterization of phosphodiesterases that specifically degrade 33-cyclic GMP-AMP. Cell Res. 25, 539–550

Gomelsky, M. 2011 cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all Mol. Microbiol. 79, 562–565

Griffin, J. E. et al. 2011. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. PLoS pathogens 7, e1002251.

Hardik, H., Jardosh, Nileshkumar D., Manish, V., Patel, P.2017. Library design, synthesis and biological exploration of novel 3,4′-bicarbostyril derivatives as potent antimicrobial, antitubercular and antimalarial agents. ***Medicinal Chemistry Research*** 26(5):881–899.

Hengge ,R,. 2009 . Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nat Rev Microbiol.; 7(4):263–73

Hengge, R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 7, 263–273

Huynh, T. N., Luo, S., Pensinger, D., Sauer, J. D., Tong, L., and Woodward, J. J. 2015.An HD-domain phosphodiesterase mediates cooperative hydrolysis of c-di-AMP to affect bacterial growth and virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, E747–E756

Jadhavar, Pradeep S., Dhameliya, Tejas M., Vaja, Maulikkumar D., Kumar, D.,Sridevi, J., Yogeeswari, P., Sriram, D., Chakraborti, A. 2016. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship of 2-styrylquinazolones as anti-tubercular agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters , 26(11): 2663-2669.

Jakalian, A., Jack, DB., Bayly, CI., .2002. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. J Comput Chem 23:1623–1641

Jayachandran, R., BoseDasgupta, S., Pieters, J. 2013. Surviving the macrophage: tools and tricks employed by Mycobacterium tuberculosis. Curr Top Microbiol Immunol. 374:189–209.

Jayaprakash, Sarva., Iso, Yasuyoshi., Wan, Baojie., Franzblau, Scott G.,Kozikowski, Alan P.2006. Design, synthesis, and SAR studies of mefloquine-based ligands as potential antituberculosis agents. ***ChemMedChem*** 1(6): 593-597

Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B. T., and Sintim, H. O. 2013 Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis.Chem. Soc. Rev. 42, 305–341

Kendall, S. L. et al. 2007. A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol. 65, 684-699.

Kim, Seung Ju., Kim, Beom Jun., Jang, Dong Wook., Kim, Se Hun., Park, Soo Young., Lee, Ju-Hyun., Lee, Sin-Doo., Choi, Dong Hoon.2001. Photoactive polyamideimides synthesized by the polycondensation of azo-dye diamines and rosin derivative. ***Journal of Applied Polymer Science*** ,79(4), 687-695.

Kloner, Robert A. 2005. "Pharmacology and drug interaction effects of the phosphodiesterase 5 inhibitors: focus on alpha-blocker interactions". ***The American Journal of Cardiology.*** 96

Kumar, M., and Chatterji, D. 2008. Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in Mycobacterium smegmatis . Microbiology 154, 2942–2955128.

Kuo, Mack R.,Morbidoni, Hector R., Alland, D., Scott, F., Gourlie, Brian B., Staveski, Mark M., Leonard, M., Jill, S.,Janjigian, Andrew, D.,Yee, C. 2003. Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of Enoyl Reductase: Compound Activity and Structural Data. ***Journal of Biological Chemistry*** ,278(23): 20851-20859

Lakshmi Devi, M., Lakshmi Reddy, P.,Yogeeswari, P., Sriram, D., Veera Reddy, B., Subba Reddy, V., Narender, R.2017. Design and synthesis of novel triazole linked pyrrole derivatives as potent *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. ***Medicinal Chemistry Research*** , 26(11): 2985–2999

Lang, PT., Moustakas, D., Brozell, S., Carrasca, N., Mukherjee, S., Balius, T., Pegg, S., Raha, K., Shivakumar, D., Rizzo, R., Case, DA., Shoichet, B., Kuntz, I., 2012. DOCK 6.5. University of California, San Francisco, http://dock.compbio.ucsf.eduss

Makafe, GG., Cao, Y., Tan, Y., Julius, M., Liu, Z., Wang, C., Njire, MM., Cai, X., Liu, T., Wang, B., Pang, W., Tan, S., Zhang, B., Yew, WW., Lamichhane, G., Guo, J., Zhang, T. 2016. Role of the Cys154Arg Substitution in Ribosomal Protein L3 in Oxazolidinone Resistance in Mycobacterium tuberculosis Antimicrob Agents Chemother, 60(5):3202-6.

Makarov, Vadim A., Cole, Stewart T., Moellmann, Ute.2007. Preparation of piperidinylbenzothiazinones as antibacterials. PCT Int.
Appl. WO 2007134625 A1 20071129.

Manikandan, K., Sabareesh, V., Singh, N., Saigal, K., Mechold, U., and Sinha, K. M. 2014. Two-step synthesis and hydrolysis of cyclic di-AMP in Mycobacterium tuberculosis. PLoS One 9, e86096

Manzanillo, PS. 2012. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. Cell Host Microbe. 11(5):469–80.

Nelson, JW.,2013. et al. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. Nat Chem Biol.; 9(12):834–9

Oppenheimer-Shaanan, Y., Wexselblatt, E., Katzhendler, J., Yavin, E., and Ben-Yehuda, S.2011. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in Bacillus subtilis . EMBO Rep. 12, 594–601

Ouellet, H. et al. 2010.Mycobacterium tuberculosis CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. Mol. Microbiol. 77, 730.

Pettersen, EF., Goddard, TD., Huang, CC., Couch, GS., Greenblatt, DM., Meng, EC., Ferin, TE .,.2004.UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem 25:1605–1612

Postic, G., Danchin, A., and Mechold, U. 2012. Characterization of NrnA homologs from Mycobacterium tuberculosis and Mycoplasma pneumoniae . RNA 18, 155–165

Ramos, J. L. et al.2005. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiology

and molecular biology reviews : MMBR 69, 326-356 .

Rao, F., See, R. Y., Zhang, D., Toh, D. C., Ji, Q., and Liang, Z.-X. 2010. YybT is a signaling protein that contains a cyclic dinucleotide phosphodiesterase domain and a GGDEF domain with ATPase activity. J. Biol. Chem. 285, 473–482.

Romling, U., Galperin, M. Y., and Gomelsky, M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 1–52.

Romling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M. Y. 2005. c-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. Mol. Microbiol, 57: 629–639.

Ross P.,1987. et al. Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid. Nature,325(6101):279–81.

Ross, P, et al. Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid. Nature. 1987; 325(6101):279–81.

Ryan, RP., 2013.Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. Microbiology; 159(Pt 7):1286–97.

Shiyou, Li., Wei, Yuan., Guangrui, Deng., Ping, Wang., Peiying, Yang. 2011.Chemical composition and product quality control of turmeric (Curcuma longa L.). Pharmaceutical Crops,2, 28-54.

Smith, KD., 2009. et al. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. Nat Struct Mol Biol; 16(12):1218–23 .

Smith, KD., Strobel, SA.,2011. Interactions of the c-di-GMP riboswitch with its second messenger ligand. Biochem Soc Trans.; 39(2):647–51.

Srivastav, M., Shantakumar, S. 2013. Design and synthesis of novel 2-trichloromethyl-4-substituted quinazoline derivatives as antitubercular agents. Chemical Science Transactions , 2(3): 1056-1062

Srivastav, R., Kumar, D., Grover, A., Singh, A., Manjasetty, B. A., Sharma, R., and Taneja, B. 2014. Unique subunit packing in mycobacterial nano RNase leads to alternate substrate recognitions in DHH phosphodiesterases. Nucleic Acids Res. 42, 7894–7910

Stanley ,SA. Cox JS. 2013. Host-pathogen interactions during Mycobacterium tuberculosis infections. Curr Top Microbiol Immunol.374:211–41

Sturini, Michela., Speltini, Andrea., Maraschi, Federica., Pretali, Luca., Profumo, Antonella., Fasani, Elisa., Albini, Angelo.2014. Environmental photochemistry of fluoroquinolones in soil and in aqueous soil suspensions under solar light environmental.***Science and Pollution Research*** , 21(23):13215-13221

Sun, L., et al.2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science. 339(6121):786–91.

Terrett, NK., Bell, AS., Brown, D., Elllis, P. 1996. "Sildenafil (Viagra), a potent and selective inhibitor of Type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction". ***Bioorg Med Chem Lett.*** 6 (15): 1819–24.

Thomas, S. T., VanderVen, B. C., Sherman, D. R., Russell, D. G. & Sampson, N. S. 2011. Pathway profiling in Mycobacterium tuberculosis: elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism. The Journal of biological chemistry 286, 43668-43678.

Uhía, I., Galán, B., Medrano, F. J. & García, J. L. 2011. Characterization of the KstR-dependent promoter of the gene for the first step of the cholesterol degradative pathway in Mycobacterium smegmatis***. Microbiology***, 157, 2670 .

Van der Geize, R. et al. A Gene Cluster Encoding Cholesterol Catabolism in a Soil Actinomycete Provides Insight into Mycobacterium tuberculosis Survival in Macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 1947-19.

Watson, RO. Manzanillo,PS, Cox. JS.2012. Extracellular ***M. tuberculosis*** DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. Cell. 150(4):803–15.

William, W., Mohn, et al.2008. The Actinobacterial mce4 Locus Encodes a Steroid Transporter. J. Biol. Chem. 283: 35368-35374 .

Witte, C. E., Whiteley, A. T., Burke, T. P., Sauer, J.-D., Portnoy, D. A., and Woodward, J. J. 2013. Cyclic di-AMP is critical for Listeria monocytogenes growth, cell wall homeostasis, and establishment of infection. Mbio 4, e00282–00213

Wu J, et al.2013. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science, 339(6121):826–30.

Yang, J., Bai, Y., Zhang, Y., Gabrielle, V. D., Jin, L., and Bai, G. 2014. Deletion of the cyclic di-AMP phosphodiesterase gene (cnpB) in Mycobacterium tuberculosis leads to reduced virulence in a mouse model of infection. Mol. Microbiol. 93, 65–79.

Yang, X., Dubnau, E., Smith, I. & Sampson, N. S. Rv1106c from Mycobacterium tuberculosis is a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Biochemistry (N. Y.) 46, 9058.

Ye, M., Zhang, J. J., Fang, X., Lawlis, G. B., Troxell, B., Zhou, Y., Gomelsky, M., Lou, Y., and Yang, X. F. 2014. DhhP, a cyclic di-AMP phosphodiesterase of *Borrelia burgdorferi* , is essential for cell growth and virulence. Infect. Immun. 82, 1840–1849

Yi, G., 2013 et al. Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. PLoS One. 2013; 8(10):e77846.

Zhang, L., Li, W., and He, Z.-G. 2013. DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a

cyclic di-AMP-responsive repressor in Mycobacterium smegmatis. J. Biol. Chem. 288, 3085–3096

Zhang, X. 2013. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. Mol Cell. 51(2):226–35.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad:Şükran DEMİRÇETİN

Doğum Yeri:Diyarbakır

Doğum Tarihi:05.07.1988

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Fatih Lisesi /Diyarbakır 2003-2006

Lisans: Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü 2008-2013

Yüksek Lisans: Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D. 2013-2018

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Şükran DEMİRÇETİN
ÖĞRENCİ NO	13803007
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	KİMYA
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Tüberküloza Karşı Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı; Fosfodiesteraz İçin İnhibitör Geliştirilmesi
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	…45.
BENZERLİK ORANI	%.8.
RAPORLAMA TARİHİ	25/06/2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam …45…… sayfalık kısmına ilişkin, …25…/…06…/…2018….. tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından .....*turnitin*..... adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % …8.. 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)

(Öğrencinin Adı Soyadı)
Şükran Demir Çetin

(İmza)	(İmza)
29/06/2018	29/06/2018
Prof. Dr. Necmettin Pirinççioğlu	Prof. Dr. Haluk Aydın
Tez Danışmanı	**Anabilim Dalı Başkanı**