T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROTEİN KİNAZ G'NİN SİNYAL İLETİMİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA ARAŞTIRILMASI

Gülistan Sema ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran – 2019

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Sema Gülistan ÇAKIR tarafından yapılan "Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinaz G'nin Sinyal İletimindeki Rolünün Moleküler Modelleme Yaklaşımlarıyla Araştırılması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYA Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan:Prof. Dr. Ebru İnce Bostancı

Üye : Prof. Dr. Necmettin Pirinççioğlu

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selami Ercan

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/06/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Prof.Dr.Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Danışmanım olduğu günden beri sonsuz sabrı, özverisi ve her daim gülen yüzüyle bu meşakatli yolda benden desteğini bir an olsun esirgemeyen, özellikle Tema vakfıyla yürüttüğü sosyal sorumluluk projeleri ile bir bilim insanı olmanın çok yönlülüğünü ve örnek kişiliğini yansıtan sayın Prof. Dr. Necmettin Pirinççoğlu'na çalışmama sunduğu katkılardan ötürü sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca TUBİTAK'a TR-GRID olanaklarını sunduğu ve Prof. Dr. Casel'e AMBER lisansı için şükranlarımı bildirmek istiyorum.

Hayat arkadaşım ve sevgili kızlarım, tezimi hazırlarken sevginizle en zor anlarda bile en büyük destekçim oldunuz. Dilerim gelecekteki ilim hayatınızda ben de sizlere ilham olurum.

Haziran 2019
Gülistan Sema ÇAKIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR……. **I**

İÇİNDEKİLER……..... **II**

ÖZET……..... **III**

ABSTRACT……..... **IV**

ŞEKİL LİSTESİ……..... **V**

KISALTMALAR LİSTESİ……. **VI**

1. GİRİŞ……..... 1

1.1. Tüberküloz Hastalığı…… 2

1.2. Tüberkülozun Tedavisi……. 2

2. KAYNAK ÖZETLERİ……. 5

2.1. Protein Kinazlar……... 5

2.2. Protein Kinaz G…… 5

2.3. PknG'nin Substratı olarak GarA…….. 7

2.4. Hesaplamalı Kimya ile Moleküler Modülleme…… 9

3. MATERYAL VE METOT…… **11**

4. BULGULAR VE TARTIŞMA…… **13**

5. SONUÇ VE ÖNERİLER……..... **21**

6. KAYNAKLAR……..... **23**

ÖZGEÇMİŞ……... 27

ÖZET

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSİS'TE PROTEİN KİNAZ G'NİN SİNYAL İLETİMİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülistan Sema ÇAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2019

Mycobacterium Tuberculosis (Mtb)'nin neden olduğu tüberküloz hastalığı günümüzün en öldürücü hastalıklarından biridir. Dolayısıyla, bu bacteriye karşı ilaç tasarlamak stratejik bir hedeftir. Bu bacteri büyüme ve çoğalma gibi işlemlerinde sinyal iletim mekanizmasına başvurmakta olup bunun için başlıca 11 adet (A-K) okaryotik benzeri serin/treonin kinazlar kullanırlar. Bu kinazlarının rollerinin bilinmesi ve bunların hedef alınması önemli ilaç tasarım hedefleridir. Biz de bu çalışmada Mtb'sin sinyal iletiminde yer aldığı bilinen Protein Kinaz G (PknG)'nin bu sinyal iletimindeki rollünü bilgisayar destekli yaklaşımlarla araştırılmasını hedefledik. Bu kinazın mevuct x-ray yapısında eksik olan kısımlar model çalışmalarla tamamlandı ve ilgili treoninler fosforlanarak bunların proteinin konformasyonunda gösterdiği değişiklşikler gözlemlendi. Bu değişimlerin PknG'nin sübstratı olarak düşünülen glycogen accumulation regulator (GarA) ile yaptığı komplekslere etkisi araştırıldı. Sonuçlar PknG'nin fosforlandığı zaman anlamlı olarak konformasyonal değişikliğe uğradığını ve bunun GarA ile etkileşiminde önemli bir rol aldığını gösterdi. Bütün hesaplamalar AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) paket programları kullanılarak yapılırken protein-protein etkileşimleri Z-DOCK vasıtasıyla yapıldı.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, ökaryötik benzeri ser/thr proteinkinazlar, PknG, GarA, sinyal iletimi, Docking, Moleküler Dinamik Simülasyonları

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROTEIN KINAZ G IN SIGNAL TRANSDUCTION BY MOLECULER MODELLING APPROACHES

MASTER THESIS

Gülistan Sema ÇAKIR

DEPARTMENT OF CHEMISTRY OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
UNIVERSITY OF DICLE

2019

Tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is one of the most lethal diseases. Therefore, it is a strategic goal to design drugs against this bacterium, which emploes 11 (A-K) eukaryotic-like ser/thr kinases in the signal transduction mechanism in the growth and proliferation processes. Knowing the roles of these kinases and targeting them are important drug design targets. In this study, we aimed to investigate the role of protein kinase G (PknG) in signal transduction by using computer assisted approaches. The missing part of the protein was completed by molecular modelling calculations. The corresponding threonines were phosphorylated and the effect of the phosphorylation on the conformation of the protein was observed by molecular dynamic calculations. The conformational changes in phsophorylated PknG were found to be very significant in its ability to bind to glycogen accumulation regulator (GarA). All calculations were performed by AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) and protein-protien interactions were studied by Z-DOCK.

KeyWords: *Mycobacterium tuberculosis*, eukaryotic-like ser / thr protein kinases, PknG, GarA, signal transduction, Docking, Molecular Dynamic Simulations

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	GarA tarafından TCA ve glutamat sentezinin düzenlenmesinin model gösterimi	8
Şekil 4.1.	PknG'nin 2.5 ns süreyle vakumda 325 K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) orijinal yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.	13
Şekil 4.2.	PknG'nin vakumda 2.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri.	14
Şekil 4.3.	PknG'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde moleküler dinamik hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) vakumdaki yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü	14
Şekil 4.4.	PknG'nin periyodik kutu içinde 20 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).	15
Şekil 4.5.	GarA'nın 15 ns süreyle periyodik kutu içinde 300 ^{o}K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) orijinal yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.	15
Şekil 4.6.	GarA'nın periyodik kutu içinde 15 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).	16
Şekil 4.7.	T63P-PknG'nın 20 ns süreyle periyodik kutu içinde 300 ^{o}K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) posforlanmamış yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.	17
Şekil 4.8.	T63P-PknG'nın periyodik kutu içinde 20 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).	17
Şekil 4.9.	T63P-PknG'nın periyodik kutu içinde 20 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların kümeleme analizlerinden elde edilen ve en kalabalık 5 kümeyi temsil eden konformerlerin üst-üste çakıştırılmış görüntüsü.	18
Şekil 4.10.	T21P-GarA'nın 15 ns süreyle periyodik kutu içinde 300 ^{o}K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) fosforlanmamış yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.	19
Şekil 4.11.	T21P-GarA'nın periyodik kutu içinde 15 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı enerji değişimleri (*sol*).	19
Şekil 4.12.	PknG-T63 ile GarA Z-DOCK sonucu oluşan kompleksin yapısı. Komplekste yakınlaşmayı göstermek için ilgili artıklar (ARG111, THX63, GLU32 ve ARG62) minimize edilmiştir. Bu görüntü Discovery Studio (http://www.accelrys.com, 2012) ile alınmıştır.	20

KISALTMALAR LİSTESİ

Mtb : Mycobacteriumtuberculosis

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

TB : Tüberküloz

INH : İzoniazid

RIF : Rifampisin

PZA : Pirazinamid

EMB : Etambutol

STR : Streptomisin

STPK : Serin Treonin Protein Kinaz

Pkn : Protein Kinaz

1. GİRİŞ

Tüberküloz Mycobacterium tübercülosisin neden olduğu genellikle akciğerleri tutan öldürücü fakat önlenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalıktır. Dünyada hastalıkların neden olduğu en yaygın ölümcül sebeplerden biridir. 2017'de dünyada 10 milyona yakın insanın enfekte olduğu bunların 5,8 milyon erkek, 3,2 milyon kadın ve 1 milyonunun çocuk olduğu bildirilmektedir. (Global Tuberculosis Report, 2018).

Türkiye'de 2005 yılından beri Verem Savaş Dispanserlerinde tüberkülozlu hastaların kayıtları tutulmaktadır. Bu kayıtlar Dünya Sağlık Örgütü'ne aktarılarak Küresel Tüberküloz Raporuna yansıtılmıştır. Türkiye'de 12,417 kayıtlı tüberküloz hastası vardır. Bu hastalarda yeni olgu oranı %92,1 (11,442) iken önceden tedavi görmüş olguların oranı %7,9 (975) dur. Türkiye'nin, 2015 yılı yeni+nüks olgularda tedavi başarısı %87 ve önceden tedavi görmüş olgularda tedavi başarısı %46'dır. Türkiye'de 2016 yılında kayıtlara giren 12.417 tüberkülozlu hastadan 8.704'üne (%70,1) HIV testi yapılmıştır. Küresel Tüberküloz 2017 Raporunda Türkiye'de 2016 yılında HIV durumu bilinen yeni ve nüks TB hasta oranı %50-74 aralığında verilmiştir. Bu durum HIV-AIDS ile seyreden tüberküloz olgularında çoklu ilaç direnci açısından düşünülmesi gereken önemli bir sorundur. 2017 raporuna göre Türkiye yüksek hastalık potansiyeline sahip 27 ülke arasında değildir (Türkiye Verem Savaşı, 2018).

Tüberkülozun 50 yıldan beridir tedavi edilebilir olmasına rağmen, hastalığa ilişkin HIV-AIDS ile birlikte enfeksiyon (Tufariello ve ark., 2003) ve M. tuberculosis'in çoklu ilaca dirençli suşlarının ortaya çıkması tedaviyi zora sokan iki etmendir (Zvi ve ark., 2008). Bir diğer sorun da hastalığın tedavisinin uzun sürmesi ve hastaların tedaviye gösterdiği uyumluluğun az olmasıdır. Dirençli bakteriye karşı mevcut ilaçların yetersiz kalması (Zhang, 2005) tüberküloza karşı çoklu ilaç direnci gösteren hastaların sayısını arttırmaktadır. Bu durum özellikle dirençli suşları da kapsayacak şekilde yeni ilaçların keşfini zorunlu kılmaktadır.

1.1. Tüberküloz Hastalığı

Hastanın öyküsü, fiziki bulguları, akciğer filmi ile hastalıktan şüphelenilir. Akciğer tüberkülozunun kesin tanısı hastadan alınan balgam örneğine yapılan bakteriyolojik testle konulur. İki haftadan uzun süren öksürük,göğüs ve sırt ağrısı, nefes darlığı,halsizlik yorgunluk gibi temel belirtileri vardır.Hastalık vücutta latent enfeksiyon olarak kalır.Herkeste aktif primer tüberküloza dönüşmez.Tüberküloz enfeksiyonunun aktif tüberküloz hastalığına dönüşmesinde,HIV enfeksiyonu olan kişiler (Wood ve ark., 2000) , 5 yaş altındaki çocuklar (Comstock ve ark., 1974) ,bağışıklık baskılayıcı tedavi alan kişiler yüksek risk grubunu oluşturur (Brassard ve ark., 2006).

1.2. Tüberkülozun Tedavisi

Tüberküloz tedavisinde kullanınlan ilaçlar ikiye ayrılır. Birinci grup ilaçlar izoniazid (INH) , rifampin (RİF) ,pirazinamid (PZA), etambutol (EMB) ve streptomisin (STR) dir. İkinci grup ilaçlar Aminoglikozidler (Kanamisin, Amikasin, Kapreomisin), paraaminosalisilikasit, sikloserin, tioamidler, florokinolonlar (siprofloksasin, ofloksasin, moksifloksasin…), rifabutin, klofazimin ve tiasetazodur (Silva ve Ainsa, 2007).

Türkiye'deki standart tüberküloz tedavisinde ilk iki ay INH+RIF+PZA+STR/EMB, sonraki 4 ay INH+RIF kullanılır. Tüberküloz tedavisi başlangıç ve idame tedavi olarak ikiye ayrılır. Başlangıç döneminde hızlı üreyen basiller vücuttan uzaklaştırılır ve bu dönemde 4 ilaç kullanılır. Tedavi bakterisidal etkiye ve direnç gelişimini önlemeye yöneliktir. Yeni olgularda 2 ay, nükslerde bu süre 3 ay sürer. Bu dönemde tedavi bırakılırsa ilaç direnci gelişmesi çok olasıdır. İdame dönemindeyse daha çok zaman zaman aktivasyon gösteren ve aralıklı üreyen basiller temizlenir. Yeni olgularda 4 ay nükslerde 5 ay sürer. Bu dönemde tedavi bırakılırsa nüks görülebilir (WHO, 2003; British Thoracic Society, 1998; Behr ve ark., 1999; Jindani ve ark., 1980; Comstock, 1975).

Tüberkülozun tek ilaçla tedavi edilmesi basillerin direnç kazanmasına neden olduğundan mümkün değildir. Özellikle başlangıç tedavisindeki 4'lü ilaç kombinasyonu oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Fakat tedavinin yarıda kesilmesi, HIV-TB enfeksiyonu, tedavilerin yanlış planlanması gibi sorunlar çoklu ilaç direncine sebep

olmaktadır. Tüm bu nedenlerden ötürü WHO tüberkülozda yeni mekanizmalarla basili yok edecek yeni ilaçların keşfini tavsiye etmektedir (WHO, 2003; British Thoracic Society, 1998; Özkara ve ark., 2003). Bunların başında bakterinin gelişmesi, üremesi ve bölünmesinde önemli rolü olan ve ökaryötik benzeri sinyal iletim işlemlerinde yer alan kinazların hedef alınması önem arz etmektedir (Av-Gay ve Everett, 2000).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Protein Kinazlar

Tüm canlı sistemlerde reseptör protein kinazlar ekstrasellüler cevaba karşı hücre fizyolojini düzenleyen önemli rollere sahiptir. Bazı canlılarda histidin ve asparjin fosforilasyonuyla bu durum gerçekleşirken diğer bazı canlılarda daha kalıcı serin-thereonin ve tyrozin kinazlar bu rolü üstlenmektedir. Bu kinazlar en kalabalık protein ailesi olup sayıları 10000'i bulmaktadır (Cheek ve ark., 2005). Daha önce sadece ökaryotlarda varlıkları düşünülen serin-treonin protein kinazlar (STPKs) son 17 yılda çoğu patojeni içeren bakterilerde de olduğu tespit edildi. Bu ökaryot benzeri STPKs'lar bakteri hücreleri içinde sinyal iletimi ile büyüme virülans dayanıklık ve reaktivasyon işlemlerinde önemli rol alırlar. Mtb'da da bilinen ökaryötik benzeri 11 adet STPKs mevcuttur (PknA-PknL). Bunlardan 9'u membran bağımlı reseptör olup 2'si hücre içidir (PknG ve PknK) (Av-Gay ve Everett, 2000). Bu kinazların çoğu önemli düzenleyici fonksiyonlarda rol alır (Greenstein ve ark., 2005; Thakur ve Chakraborti, 2006).Dahası bu kinazların konak kinazlarla çapraz iletişimde yer aldığı düşünülmektedir. Çoğu çalışmalar bu kinazlardan ikisi olan PknA ve PknB nin hücre büyümesinde ve hücre şeklinin düzenlenmesinde yer aldığı düşünülmektedir (Chaba ve ark., 2002; Kang ve ark., 2005). PknF, PknH, PknD, PknK transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek gen ekspresyonunu düzenler (Kumar ve ark., 2009; Gopalaswam ve ark., 2008)

M.tuberculosis uzun süre makrofajlarda yaşayabilir ve belirli aralıklarla enfeksiyonlara neden olur. PknG bu süreçte önemli bir rol oynar. PknG bakterinin akciğerde oluşturduğu fagosomların makrofajlar içinde bozulmadan kalmasını sağlar. Fagosom lisosom füzyonunu inhibe eder. PknG nin inhibisyonu ile, fagosom lisosom füzyonu gerçekleşir ve mikobakteri bozulur. Böylelikle PknG özellikle yeni bir ilaç keşfi için önemli bir odak haline gelir (Szekely ve ark.,2008).

2.2. Protein Kinaz G

Otofosforilasyon aktivitesi gösteren PknG (82 kDa), kinaz bölgesinden önce gelen genişletilmiş bir N-terminal bölgesine sahip olması bakımından diğer

mikobakteriyel kinazlardan farklıdır. Ayrıca, PknK gibi bu proteinin sitoplazmada bulunduğunu düşündüren bir transmembran alanı içermez. PknG'nin N-terminal alanı içinde iki CXXC motifi varken, C-terminalinde bir tetratricopeptid (TPR) benzeri bölge mevcuttur. CXXC motifleri redoks reaksiyonlarının katalizinde esastır, çünkü sisteinler disülfit bağlarını tersine çevirebilirler (Laboissire ve ark., 1995; Walker ve ark., 1996). CXXC motifleri, proteinlerin doğru katlanmasının veya peroksitlerin çıkarılmasının kontrolü gibi strese karşı korumayı temel alan birçok işlevi yerine getirmesini sağlar (Tinsley ve ark., 2004). TPR benzeri bölgeler, genellikle 3-16 kez tekrarlanan 34 amino asidin motifleridir. Bu motifler ağırlıklı olarak protein-protein etkileşimlerine aracılık ettikleri ökaryotik proteinlerde bulunur.

PknG gen lokusunun, mikobakteriyel genus boyunca mevcut olduğu ve korunduğu gösterilmiştir (Narayan ve ark., 2007). İlginçtir ki, PknG, M. smegmatis gibi patojenik olmayan mikobakterilerde eksprese edilmez (Walburger ve ark., 2004). PknG patojenik mikobakterilerde silindiğinde, in vitro yetiştirilen mutant suşlarda mutasyona uğramamış mikobakterilere kıyasla belirgin bir fenotip gözlenmemiştir (Nguyen ve ark., 2005). Bununla birlikte, makrofajların enfeksiyonu üzerine, PknG içermeyen basil hızlı bir şekilde lizozomlara aktarılır ve öldürülür, oysa mutasyona uğramamış mikobakteriler lizozomal olmayan fagozomlar içinde hayatta kalabilir (Walburger ve ark., 2004). Bu noktada, fagozom-lizozom füzyonunun önlenmesinin veya geciktirilmesinin, patojenik mikobakterilerin hayatta kalmalarını sağlamak için kullandıkları önemli bir strateji olduğu unutulmamalıdır (Hart, 1975; Nguyen ve Pieters, 2005; Pieters, 2001). PknG'nin lizozomal iletimi önleme kapasitesinin kinaz aktivitesiyle ilişkili olup olmadığını analiz etmek için, kinaz-ölü bir molekül, mutasyona uğramamış M bovis BCG'de aşırı eksprese edildi. Bu mutant PknG-K / M'nin aşırı ekspresyonu, lizozomlara hızlı transfer ve bu bakterilerin hücre içi öldürülmesi ile sonuçlandı; bu, protein kinaz G'nin kinaz aktivitesinin, fagozom-lizozom transferini modüle etme ve içindeki mikobakteriyel hayatta kalma kabiliyetini sağlama kabiliyeti için gerekli olduğunu ortaya koydu. (Şekil 1.6).(Walburger ve ark., 2004).

Muhtemelen bunu makrofaj sitozolunda bulunan substratları fosforlayarak gerçekleştirir. Önemli olarak, PknG mikobakteriyel membrandan sekonder-bağımlı bir şekilde sekresyona izin verecek klasik bir sinyal iletimine sahip değildir. Bu nedenle, PknG'nin şimdiye kadar tanımlanmamış bir salgı sistemi tarafından salgılanması

muhtemeldir. Ek olarak, PknG'nin fagozomlardan sitozole nasıl taşındığı tespit edilmelidir. PknG eksikliği olan patojenik mikobakterilerin fagozomlardan lizozomlara taşınması, mikobakteriyel öldürme ile sonuçlanan bu kinazı umut verici bir ilaç hedefi haline getirir.

2.3. PknG'nin substratı olarak GarA

Mycobacterium tuberculosis, muhtemelen karbon kaynağı olarak konakçı yağ asitleri ve kolesterolü kullanan zorunlu bir patojendir (Lee ve ark., 2013). *in vitro* M. tuberculosis, glikoliz, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, pentoz fosfat yolu, glikoksilat döngüsü ve metil sitrat döngüsü (Beste et al., 2007) için tam yollara sahip olduğu için çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilir. *in vivo* olarak büyüme ve kalıcılık için etkin karbon metabolizması gereklidir, çünkü glukoneogenez, glikoksilat döngüsü ve metil sitrat döngüsünün bozulmasının her birinin farelerde M. tuberculosis'in virülansını azalttığı bulunmuştur (McKinney ark., 2000; Munoz - Elias ve ark., 2006; Marrero ve ark., 2010).

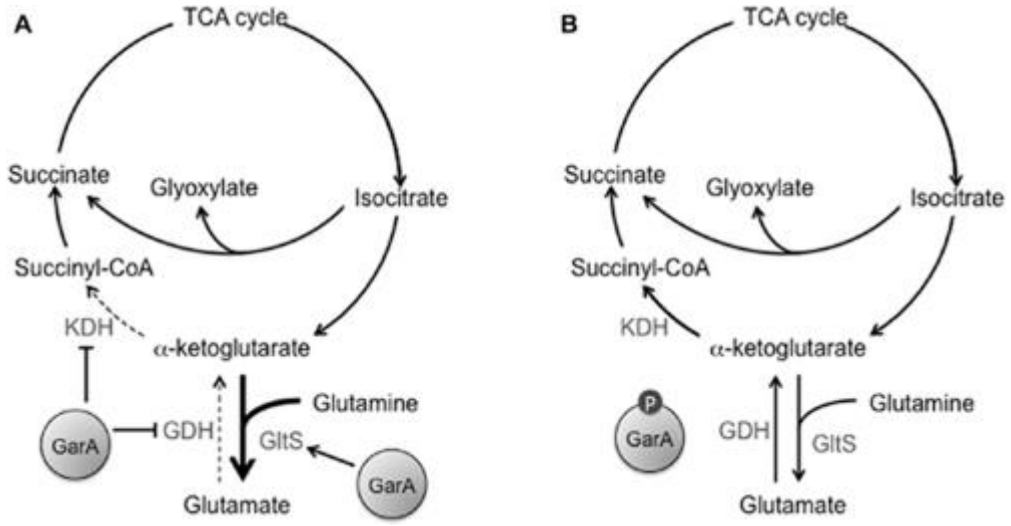
TCA döngüsü aerobik organizmalardaki başlıca enerji üreten yoldur,

α-ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi (KDH), döngü boyunca akı kontrolünün ana kontrol noktasıdır (Bunik ve Fernie, 2009). Çoğu aerobik organizmada KDH, gen ekspresyonu düzeyinde ve ayrıca allosterik aktivatörler veya inhibitörler olan anahtar metabolitler tarafından düzenlenir (Bunik ve Fernie, 2009). M. tuberculosis'in KDH'si, Rv1248c (α-ketoglutarat dekarboksilaz, Kgd), Rv2215 [dihidrolipoamid asiltransferaz, (DlaT) (Tian ve ark, 2005)] ve Rv0462 [dihidrolipoamid dehidro AruGeLeDUUG, 2010, DvDO2A] Wagner ve ark., 2011). Corynebacterium glutamicum ve diğer actinobacteria gruplarının çoğunda olduğu gibi M. tuberculosis'in Kgd alt birimi, aynı DlaT alt ünitesinin hem KDH'de hem de piruvat dehidrojenaz kompleksinde işlev görmesini sağlayan ek bir asiltransferaz alanına sahiptir (Niebisch ve ark., 2006; Wagner ve ark., 2011). KDH kompleksi, M. tuberculosis'te kilit bir kontrol noktası gibi görünmektedir. Asetil - koenzim A ile allosterik aktivasyona ek olarak, M. tuberculosis KDH, GarA olarak adlandırılan bir inhibitör proteine bağlanarak da düzenlenir (O'Hare ve ark., 2008; Wagner ve ark., 2011). Bu geleneksel olmayan regülatör ilk olarak C.

glutamicum'da tanımlanmıştır (Niebisch ve ark., 2006) ve GarA homologları 96Actinobacteria'da yaygın olduğu için birçok başka organizmada da çalışabilir.

GarA, N- ve C- terminal uzantılarına sahip bir çatal ucu ile ilişkili (FHA) alandan oluşan küçük bir proteindir. Bir FHA bölgesinin tipik işlevi, fosforlanmış treonin artıklarının spesifik olarak tanınmasına aracılık eden protein-protein etkileşimidir (Durocher ve ark., 1999) ve gerçekten GarA, N terminalinde fosforlandığında, FHA bölgesi KDH'ye bağlanmayı bloke eden, inhibisyonu hafifleten bir oto-tanıma yoluyla fosforotreonine bağlanabilir.(Barthe ve ark., 2009; England ve ark., 2009; Nott ve ark., 2009). Bu nedenle GarA-KDH kompleksi, metabolizmayı kontrol etmek için kinaz sinyal yolunun son noktasıdır.

KDH'nin α-ketoglutarat substratı, aynı zamanda transaminasyon veya amonyak kullanarak glutamat sentezi için bir substrat olduğu için karbon ve azot metabolizmasının kavşağında bulunur. GarA, TCA döngüsünün düzenlenmesine ek olarak, glutamatın parçalanması, sentezinin aktive edilmesini ve glutamate sentezini sağlayan glutamat dehidrogenazı inhibe ederek, TCA döngüsü ve glutamat metabolizması arasındaki dengeyi düzenler(Nott ve ark., 2009). Neticede fosforlanmamış GarA'nın glutamat sentezini arttırdığı tahmin edilmektedir (Şekil 1).



Şekil 2.1. GarA tarafından TCA ve glutamat sentezinin düzenlenmesinin model gösterimi (Ventura ve ark., 2013)

GarA fosfoslanmadığında α-ketoglutarat dehidrogenaz (KDH)'a bağlanır ve inhibe eder. Fosforlanmamış GarA glutamat sentetaza bağlanır ve aktive eder. Bunun net sonucu TCA döngüsünün inhibe edilmesi ve glutamat sentezinin ilerlemesidir (Şekil 2.1.A). PknG GarA'yı fosforladığında, GarA artık KDH'ya bağlanmaz dolayısıyla TCA döngüsü devam eder (Şekil 2.1.B).

Glutamat, anabolizmada en çok bulunan amino grup donörü ve en bol bulunan hücresel metabolitlerden biridir. Bu haliyle, glutamat biyosentezi ve bozulması, karmaşık düzenlemelere tabidir. Bakterilerde glutamat, glutamat dehidrojenaz ile veya azot sınırlaması sırasında, glutamat sentaz ve ATP'ye bağlı glutamin sentetazın koordine edilmiş aktivitesi ile sentezlenir. Bu son yolun M. tuberculosis'te glutamat sentezinin ana yolu olduğu tahmin edilmektedir, çünkü genom tarafından kodlanan tek GDH'nin NADH'ye bağımlı ve katabolik olduğu tahmin edilmektedir. M. smegmatis'in genomu, aksine, iki ek öngörülen NADPH'ye bağımlı anabolik GDH enzimini kodlar.

Sonuç olarak, PknG'nin fagozom-lizozom füzyonunu önleyerek mikobakterilerin makrofajlarda hayatta kalmasını teşvik ettiği ve bu nedenle önemli bir virülans faktörü olduğu düşünülmektedir. PknG substratlarının (GarA gibi) ve salgılama makinelerinin tanımlanması ve PknG'nin yapısının açıklanması, PknG'nin fonksiyon modunun doğrulanmasına yardımcı olabilir.

2.4. Hesaplamalı Kimya ile Moleküler Modelleme

Hücrede gerçekleşen biyokimyasal olayların deneysel olarak araştırılması oldukça komplike ve zahmetli süreçler gerektirir. Bunun yerine bu işlemlerin son zamanlarda çok geliştirilmiş simülasyon yaklaşımlarıyla yapmak popüler hale gelmiştir. Bunların başında proteinlerin konformasyon değişikliğini öngörmek için moleküler dinamik hesaplamalar çok yaygın olarak başvurulan yaklaşımlardan bir tanesidir. Bu tür hesaplamalarda alan kuvvet yaklaşımı (force-field) kullanılmaktadır. Protein fosforilasyonun konformasyon değişikliği üzerindeki etkisinin moleküler dinamik hesaplamalarla anlaşılması PknG'nin sinyal iletimindeki rolünün anlaşılmasında önemli bir araçtır. Literatürde bu proteinle ilgili bilgisayarlı kimya yaklaşımları sınırlı olup (aşağıdaki literatürü ekle) fosforilasyonun konformasyona etkisi ve bunun GarA ile ilişkisine dair bulgulara bilgimiz dahilinde rastlanmamıştır. Bu çalışmada PknG'nin

fosforlanması (Thr63) ve bunun GarA ile ilişkisi moleküler dinamik hesaplamalarla araştırılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER v.12) (Case ve ark., 2012) paket programı kullanılarak moleküler dinamik hesaplamalar yapıldı. Proteinlerin similasyonu için ff99SB kuvvet alan kütüphanesi kullanıldı (Hornak ve ark., 2006). *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine-protein kinaz PknG'nin X-ray yapısı protein data bank **(**https://www.rcsb.org)'tan alındı (pdb kodu: 2PZI). Eksik olan kısımlar tamamlandı. Eksik olan kısımlar özellikle 1-68 amino asit kısmının üç boyutlu (katlanmış) yapısı moleküler modelleme yaklaşımı ile tasarlandı (Simmerling ve ark., 2002). Benzer bir şekilde glycogen accumulation regulator GarA yapısı protein data bank **(**https://www.rcsb.org)'tan alındı (pdb kodu: 2KB4) ve katlanmamış 143-162 kısmı moleküler dinamik yaklaşımı ile modellendi (Simmerling ve ark., 2002). Vakumda yapılan hesaplamalar için nonbonding cutoff değeri=999 ve genellenmiş Born çözücü modeli (igb = 0) seçildi. Bu aşamada yapılan moleküler dinamik hesaplamalarda minimizasyon ve ısıtma esnasında sabit tutulan kısımlara 500 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ lik bir kuvvet uygulandı. Sistem toplamda 1000 adımda minimize edildi. Önce 500 adımda steepest descent yaklaşımı ile diğer 500 adımda conjugate gradient yaklaşımı ile minimizasyon yapıldı. Sistemin ısıtılması 230 ps süreyle 7 adımda 0 K'den 325 K'e gerçekleştirildi. Daha sonra sabit tutulan kısımlara uygulanan kuvvet 10 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ e indirildi ve sistem 325 K'de 2.5 ns süreyle simüle edildi. Bu süre zarfında hesaplamalardan elde edilen moleküler dinamik koordinatlardan kümelendirilme yapıldı. Bu işlem için CHIMERA (Pettersen ve ark.,2004) kullanıldı. Kümeleme işlemlerinden elde edilen en kalabalık kümeden yapı seçildi. Bu yapı XLEAP yardımı ile nötrleştirdi ve periyodik kutu şartlarında simülasyonlarını yapmak için kutu boyutu 10.0 Å olacak TIP3PBOX (Jorgensen ve ark.,1983) çözücü ilave edildikten sonra topoloji/parametre ve koordinat dosyaları kaydedildi. PknG için aktif merkezdeki metallerin (çinko ve magnezyum) koordinatları protein data bank **(**https://www.rcsb.org)'tan alındı (pdb kodu: 4Y12). Çinko-sistein için kuvvet alan kütüphanesi literatürden alındı. PknG ve GarA için yapılan hesaplamalar esnasında önce protein kısmı 500 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ lik bir kuvvet uygulanarak sabit tutuldu ve 1000 adımda minimiz edildi. Daha sonra uygulanan kuvvet kaldırılarak bütün sistem 2500 adımda minimize edildikten sonra sistem 200 ps süreyle 0^{o}K'den 300^{o}K'e kadar protein

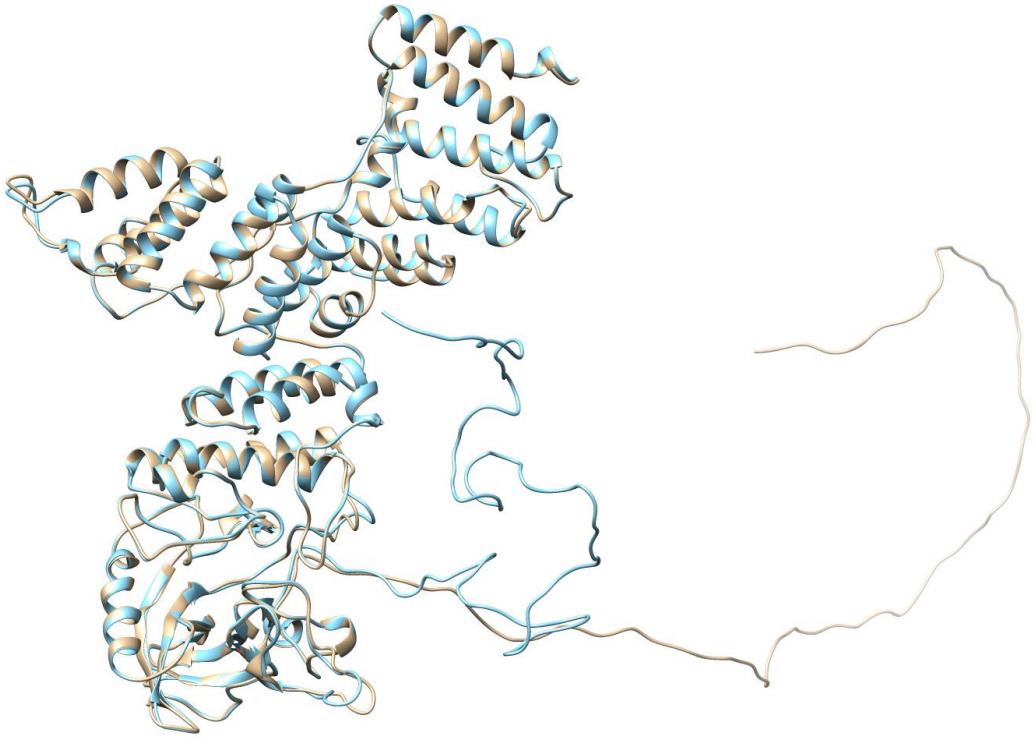
kısmına 10 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ lik bir kuvvet uygulanarak ısıtıldı. Daha sonra uygulanan kuvvet kaldırılarak bütün sistem GarA ve T21GarA için 15 ns ve PknG ile T63P-PknG için 15.0 ns süreyle canonical ensemble içinde 300 K sıcaklıkta ve 1 atmosferde MD hesaplamalarına tabi tutuldu. Bütün hesaplamalarda adım büyüklüğü 2 fs olarak seçildi. Sıcaklık ve basınç ayarları Langevin termostat ve barostat kullanılarak yapıldı. Hidrojen içeren atomların bütün bağların kısıtlanması *SHAKE* algoritması ile yapıldı (Cornell ve ark., 1995). Periyodik kutu içinde yapılan hesaplamalarda bağ yapmayan cutoff değeri 10 Å olarak seçildi ve uzun-mesafe elektrostatik etkileşimler yaklaşık 0.1 nm mesafeli bir hızlı Fourier tranform gridli Particle Mesh Ewald (PME) (Darden ve ark., 1993) metododu kullanılarak muamele edildi. Trajektörü anlık görüntüleri her 0.2 ps'de bir alındı ve bunlar daha sonra analizde kullanıldı.

GarA için periyodik kutu içinde elde edilen moleküler dinamik koordinatlardan kümeleme analizi ile en kalabalık kümeden bir yapı seçildi. Bu yapının 21. artığındaki treonin XLEAP kullanılarak fosforlandı. Fosfotlanmış treonin için litaratürdeki kuvvet alan kütüphanesi kullanıldı (Homeyer ve ark.,2006). Benzer bir şekilde PknG'nin de THR63 artığı fosforlandı. Fosforlanan yapılar da yukarıda belirtildiği gibi periyodik kutu şartlarında T21P-GarA için 12.ns ve T63P-PknG için 20 ns süreyle moleküler dinamik hesaplamaya maruz bırakıldı. Sistemlerin Root Mean Square Deviation (RMSD) değerleri moleküler dinamik hesaplamalar sonucu elde edilen moleküler dinamik koordinatlar yardımı ile CPPTRAJ vasıtasıyla hesaplandı. Hem RMSD ve hem de MD hesaplamalar boyunca zamana karşı enerji değişimleri Graph Prism 4 ile yapıldı. Yapıların gösterilmesi CHIMERA ile yapıldı (Pettersen ve ark., 2004).

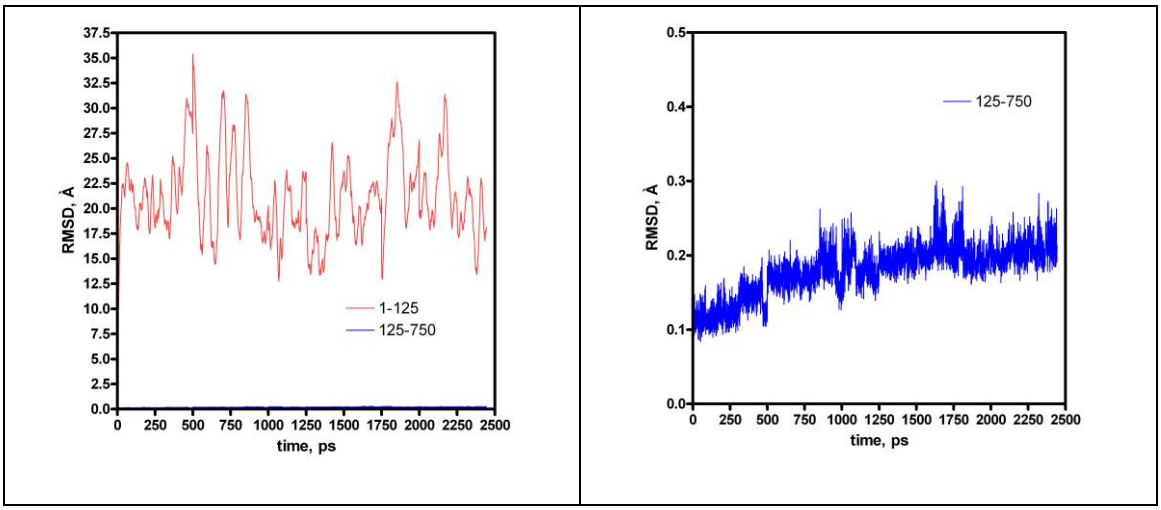
On-line olarak hizmet veren Z-DOCK (http://zdock.umassmed.edu) (Pierce ve ark.,2014) yardımı ile protien-protein docking işlemleri yapıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

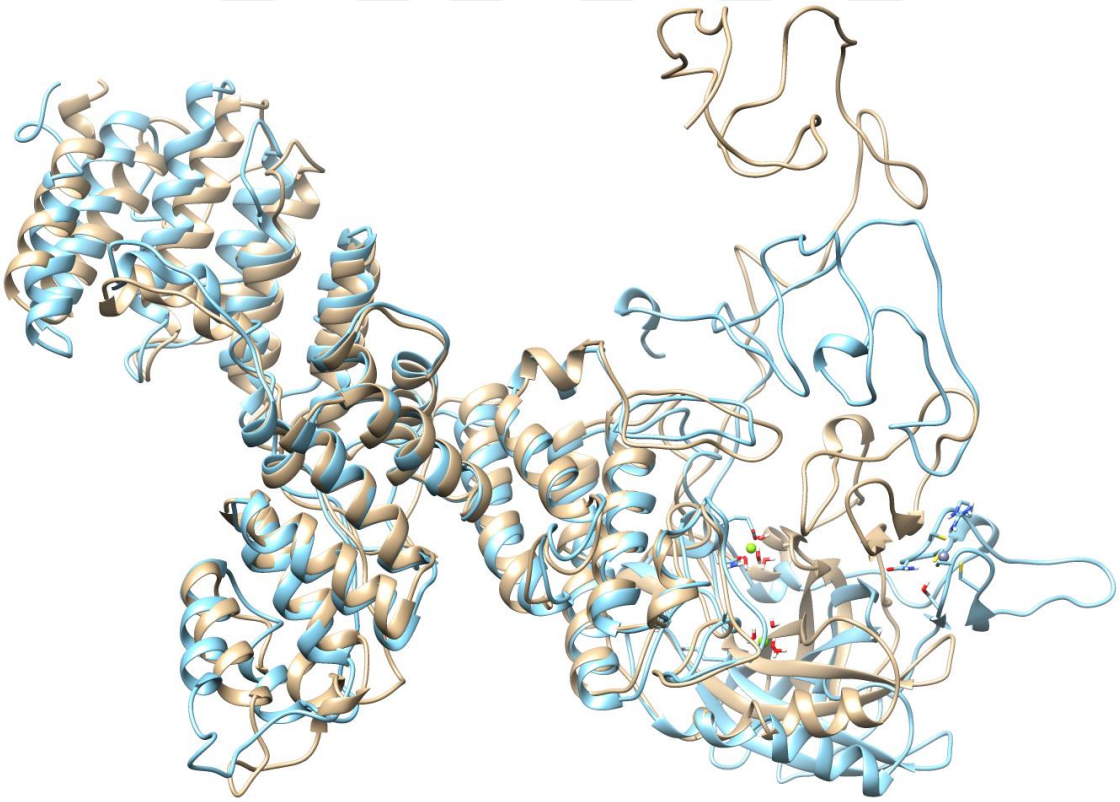
PknG için eklemeler yapılan kısımlar hariç diğer yerler 10 kcal $Å^{-2}$ kuvvet ile sabit tutularak 325 K'de 2.5 ns süreyle simüle edilen ve yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen yapı Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Burada görüldüğü gibi özelikle 1-69 kısımlar uygun bir şekilde katlanmıştır. Bu MD hesaplamalardan elde edilen trajektörilerin zamana bağlı RMSD değişimleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Burada 1-125 artıklar arasında yapının çok dinamik olduğu görülmektedir. Bu MD koordinatların kümeleme işleminden elde edilen ve en kalabalık kümeye tekabül edilen yapı periyodik kutu içinde 20 ns süreyle MD hesaplamalara tabii tutuldu. Bu hesaplamalardan elde edilen trajektörlerin kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeyi temsil eden yapı Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Bu MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğradığı ve 8 ns'tan sonra dengeye ulaştığı görülmektedir.



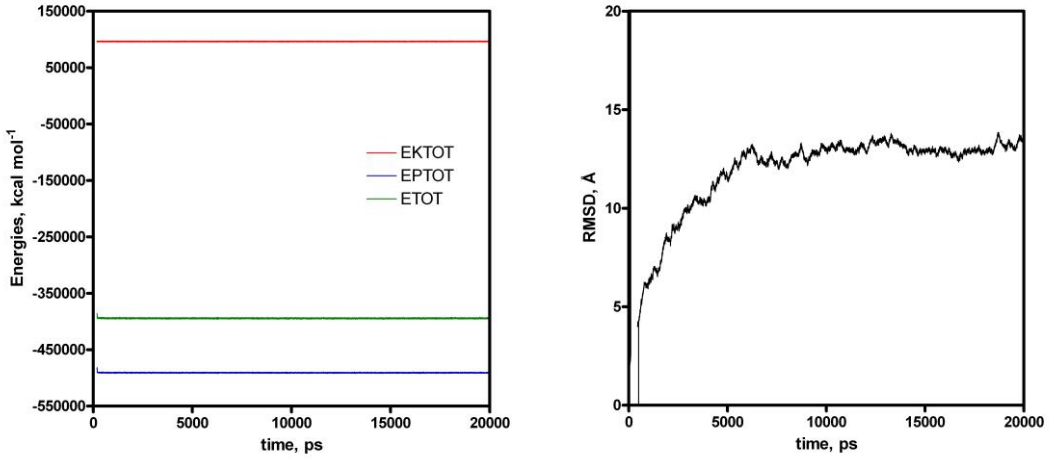
Şekil 4.1. PknG'nin 2.5 ns süreyle vakumda 325 K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) orijinal yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.



Şekil 4.2. PknG'nin vakumda 2.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri.

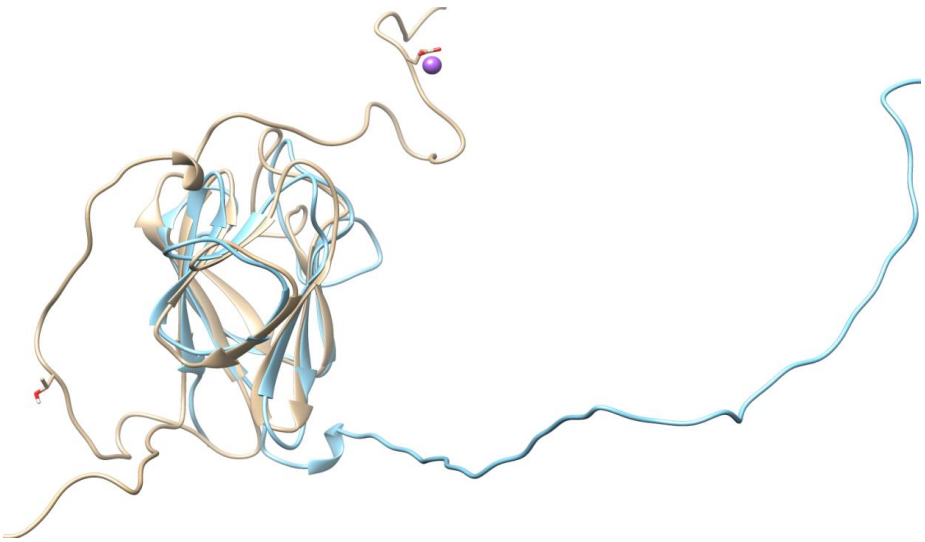


Şekil 4.3. PknG'nin 20 ns süreyle periyodik kutu içinde moleküler dinamik hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) vakumdaki yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.

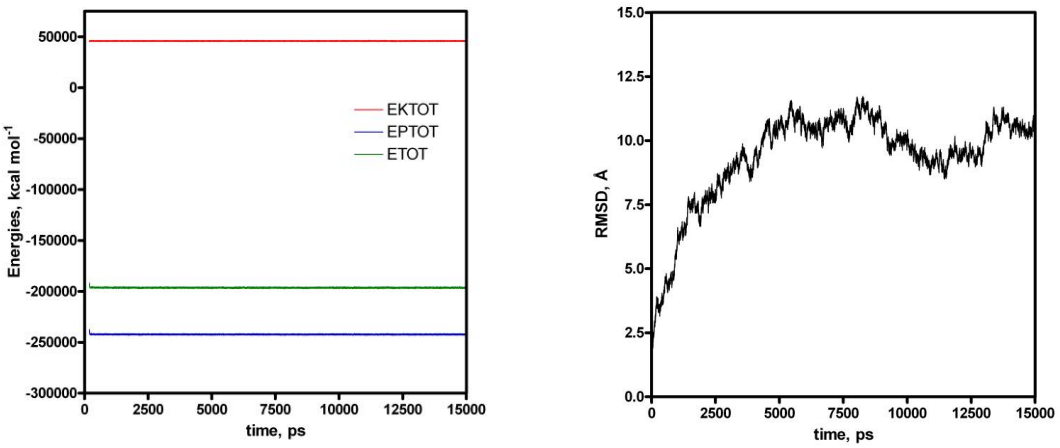


Şekil 4.4. PknG'nin periyodik kutu içinde 20 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).

GarA'nın NMR yapısı periyodik kutu içinde 15 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen yapı Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Burada görüldüğü gibi özellikle 1-44 artıklarını oluşturan kısımda önemli derecede konformasyonal değişikliğe uğradığı görülmektedir. Bu MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.6'de verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistem kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğradığı ve 7.5 ns'tan sonra dengeye ulaştığı görülmektedir.

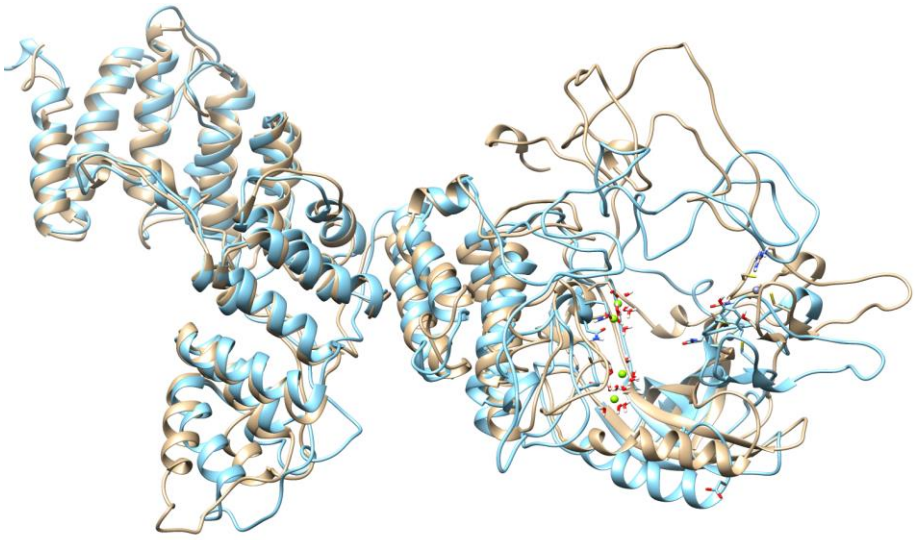


Şekil 4.5. GarA'nın 15 ns süreyle periyodik kutu içinde 300 ^{o}K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) orijinal yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.

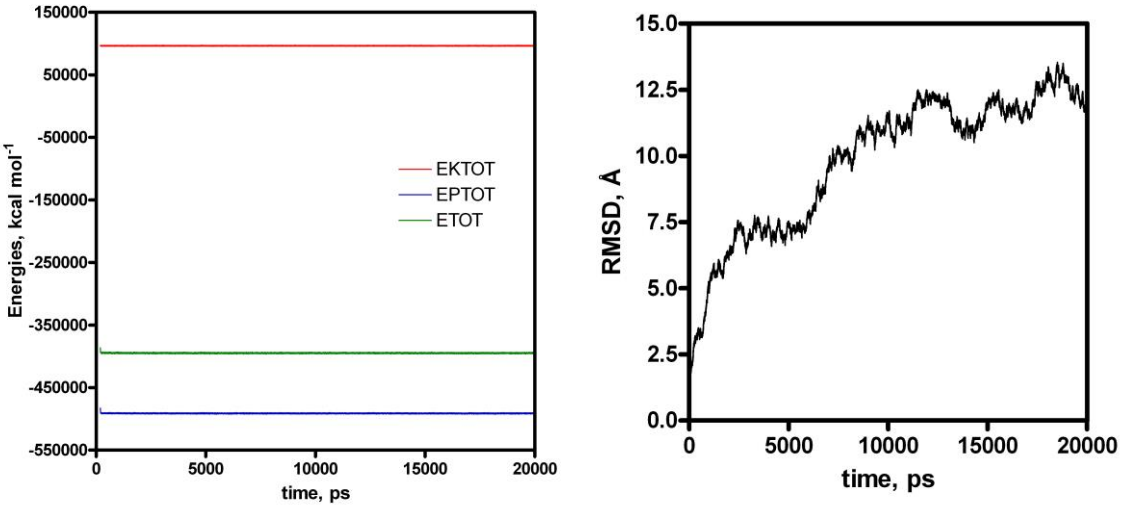


Şekil 4.6. GarA'nın periyodik kutu içinde 15 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).

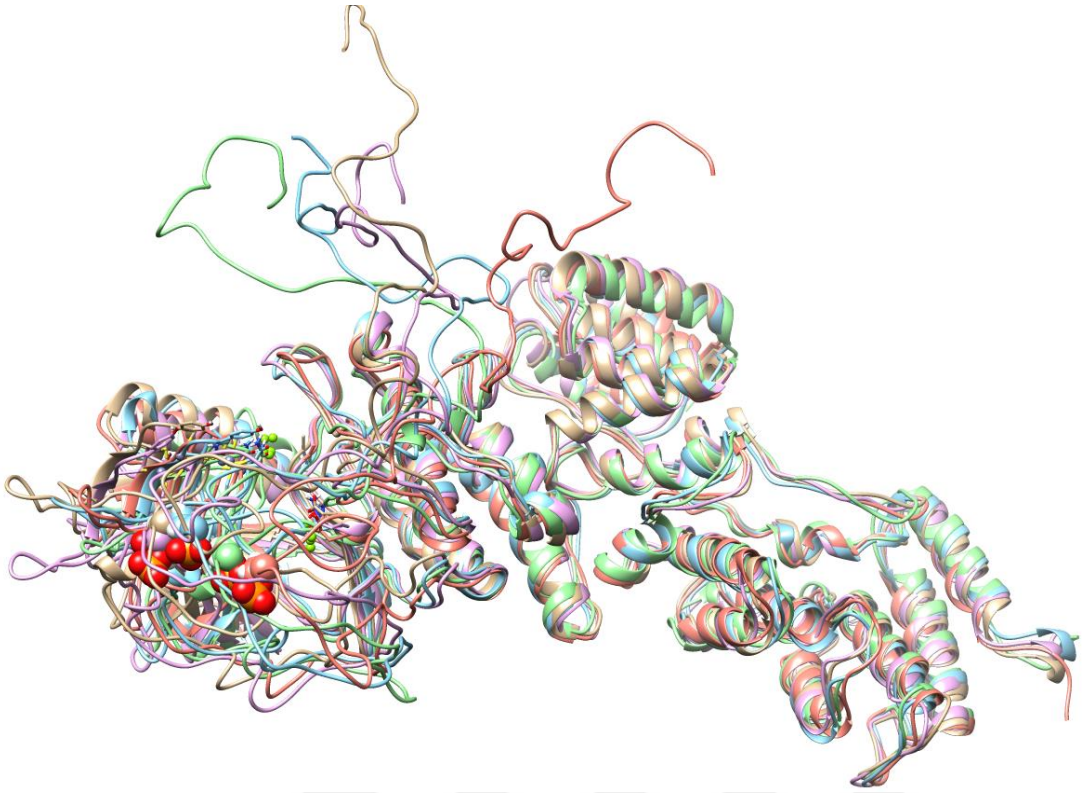
Her ne kadar PknG'nin in vitro otofosforilasyonunda, 5 artıkta (THR23, THR32 ve THR63 ve/veya THR64 ve/veya SER65, THR73) fosforilasyon gözlenmişse de in vivo sadece THR63 artığının fosoforlandığı bulunmuştur (Tiwari ve ark. 2009). Fosforlanmış PknG (T63P-PknG) yapısının periyodik kutu içinde 20 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen konformasyonu seçildi. Bu yapının fosforlanmamış yapıyla üst-üste çakıştırılmış görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış yapı özellikle 497-504 artıkları arasındaki ilmikte kısmen, fakat 1-223 artıklarının oluşturduğu bölgede çok ciddi konformasyonal değişikliğe uğradığı görülmüştür. Bu fosforlanmış yapının MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.8'de verilmiştir. Buradan sistemin dönüşüme uğradığı ve 15 ns'tan sonra dengeye ulaştığı anlaşılmaktadır. RMSD'nın yüksek olması 1-123 arasındaki ilmiğin dinamik özelliğine bağlandı. Gerçekten fosforlanmış PknG'nin kümeleme analizlerine bakıldığında özellikle 1-125 artıklarının bulunduğu ilmikte dinamik değişikler olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). Bu dinamik özelliğin hem proteinin otofosforilasyonunda hem de GarA'yı bağlamada rol aldığı düşünülmektedir.



Şekil 4.7. T63P-PknG'nın 20 ns süreyle periyodik kutu içinde 300 ^{o}K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) posforlanmamış yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.

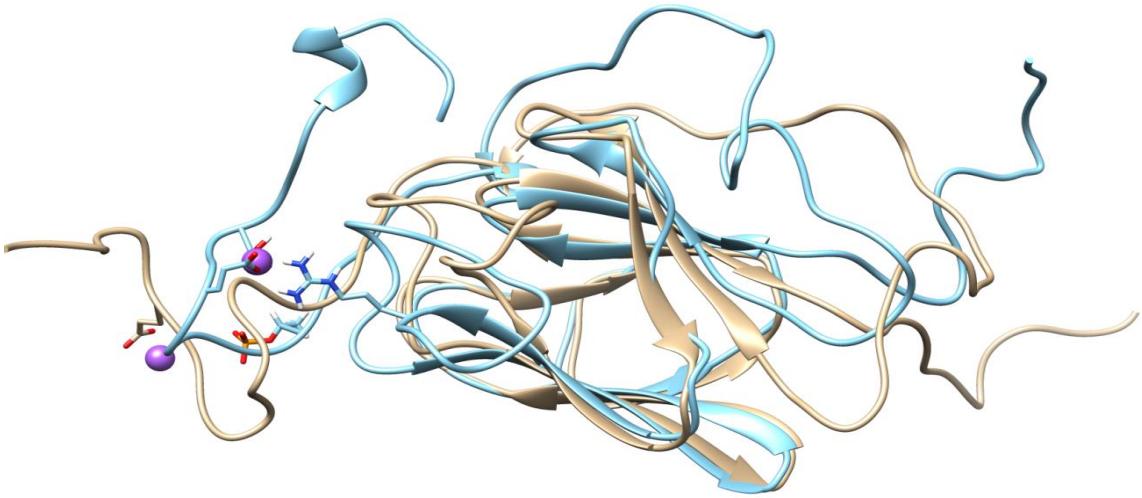


Şekil 4.8. T63P-PknG'nın periyodik kutu içinde 20 ns süreyle 300 ^{o}K^de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).

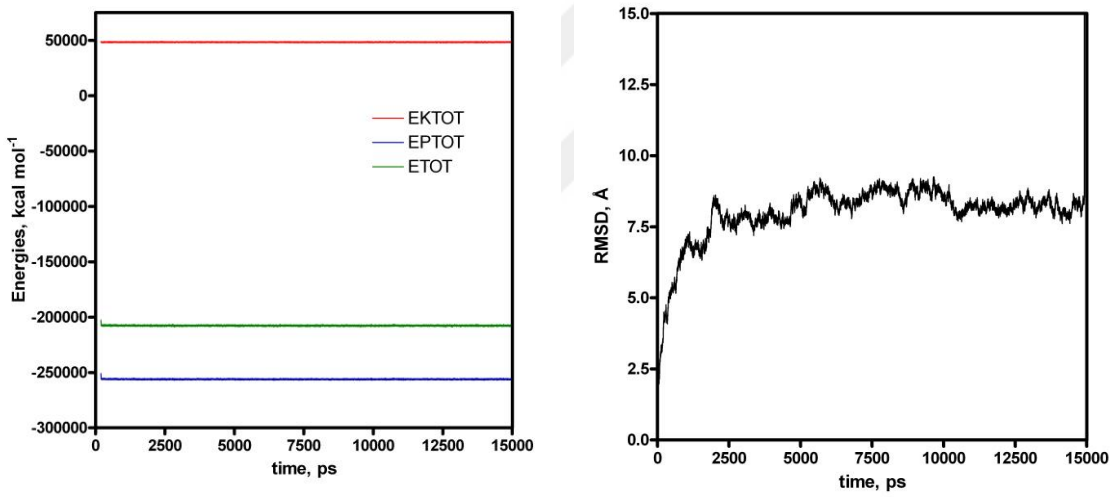


Şekil 4.9. T63P-PknG'nın periyodik kutu içinde 20 ns süreyle 300 ^{o}K^de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların kümeleme analizlerinden elde edilen ve en kalabalık 5 kümeyi temsil eden konformerlerin üst-üste çakıştırılmış görüntüsü.

Benzer bir şekilde fosforlanmış GarA (T21P-GarA) yapısının periyodik kutu içinde 15 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen yapısı Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış yapıdaki fosforlanmış ilmikte anlamlı bir şekilde konformasyonal değişikliğe uğradığı görülmektedir. Bu fosoforlanmış yapının MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.11'da verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistem kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğradığı ve 2.5 ns'tan sonra dengeye ulaştığı anlaşılmaktadır.



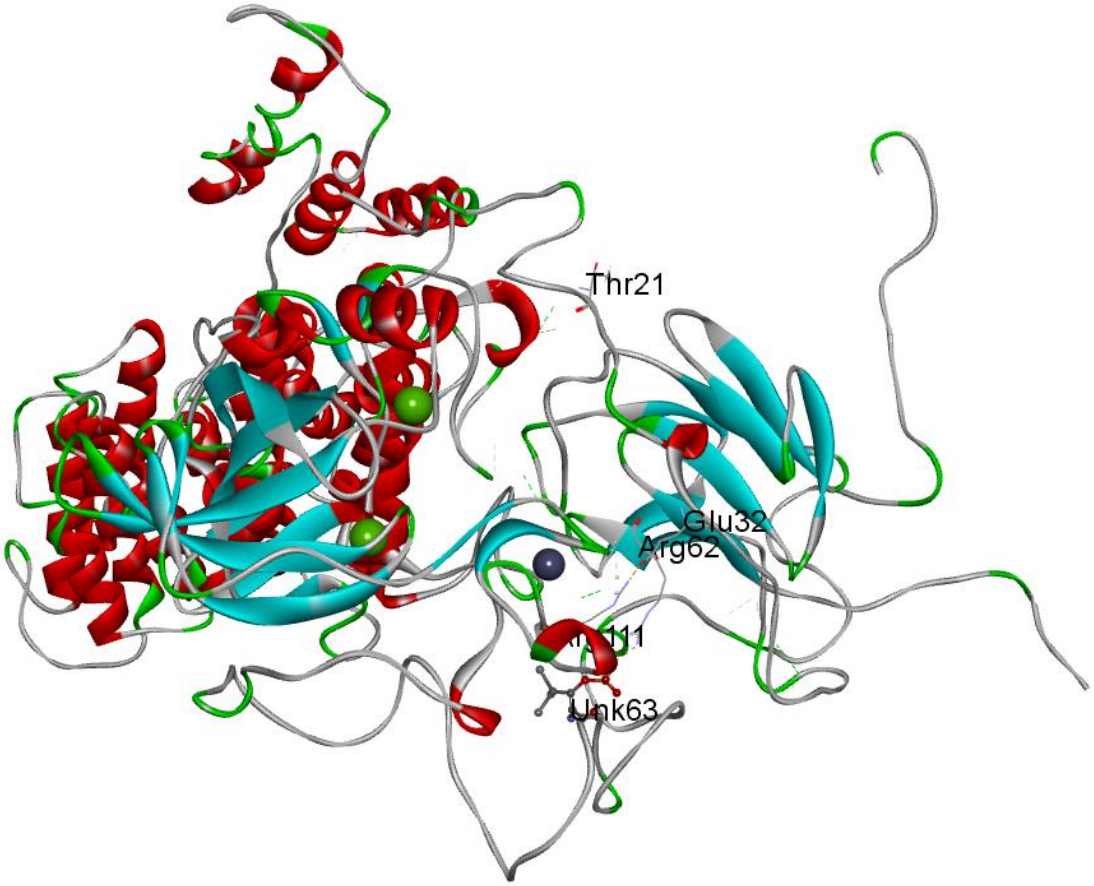
Şekil 4.10. T21P-GarA'nın 15 ns süreyle periyodik kutu içinde 300 ^{o}K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) fosforlanmamış yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.



Şekil 4.11. T21P-GarA'nın periyodik kutu içinde 15 ns süreyle 300 ^{o}K'de yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zamana bağlı enerji değişimleri (*sol*).

Z-DOCK server (Pierce ve ark., 2014) kullanılarak fosforlanmış PknG (PknG-T63) ve GarA arasında protein-protein docking işlemi sonucu elde edilen komplekste PknG-T63'teki ARG111 ile GarA'daki GLU32 ve PknG-T63'teki THX63 ile GarA'daki ARG62 olası çapraz tuz köprülerinin iki protein arasındaki heterodimerleşmede önemli olabileceği düşünüldü (Şekil 4.11). Bu komplekste bulunan diğer önemli bir bulgu da GarA'daki THR21 artığının PknG-T63'ün aktif merkezine

yakın bir şekilde yerleşmiş olmasıdır (Şekil 4.12). THR21'in yer aldığı ilmik dinamik olduğu için kolaylıkla aktif merkeze yerleşebilecektir.



Şekil 4.12. PknG-T63 ile GarA Z-DOCK sonucu oluşan kompleksin yapısı. Komplekste yakınlaşmayı göstermek için ilgili artıklar (ARG111, THX63, GLU32 ve ARG62) minimize edilmiştir. Bu görüntü Discovery Studio (http://www.accelrys.com, 2012) ile alınmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mtb'de sinyal iletiminde yer alan kinazların önemli ilaç hedefi olduğu bilinmktedir. Bu kinazlardan PknG'nın sinyal iletimindeki rolü tam olarak detaylanmamıştır. Diğer kinazlar gibi bu proteinin sinyal iletimindeki rolünün Ser/Thr artıklarının fosforilasyonu ve defosforilasyonunu ve fosforilasyon sonucu proteindeki konformasyon değişikliğinin ilgili sübstratla (burada GarA) olan etkileşimine etkisi önemlidir. Bu çalışmada MD hesaplamalar PknG'daki THR63 artığının fosfarlanmasının proteinde önemli konformasyon değişikliğine yol açtığını ve bunun GarA'nın bağlanmasında önemli olduğu görüldü. İki protein arasındaki docking sonuçlarında etkileşimde PknG-T63'teki ARG111 ve THX63 ile GarA'daki GLU32 ve ARG62 artıkları arasında çapraz tuz köprülerinin önemli rol oynadığı görüldü. GarA'daki THR21'in fosoforilasyonu sonucu bu proteinin konformasyonundaki değişikliğin α-KGD ile etkileşiminde önemli olacağı düşünüldü.

6. KAYNAKLAR

American Thorasic Socıaety https://www.thoracic.org/patients/patient-resources/resources/tuberculosis.pdf

Anat Zvi†1, Naomi Ariel†1, John Fulkerson2, Jerald C Sadoff2 and Avigdor Shafferman*1 Whole genome identification of Mycobacterium tuberculosis vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses-research article Published online 2008 May 28. doi: 10.1186/1755-8794-1-18

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

Behr MA, Warren SA, Salamon H, et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smearnegative for acid-fast bacilli. Lancet 1999; 353:444-449

Brassard P, Kezouh A, Suissa S. Antirheumatic drugs and the risk of tuberculosis. Clin Infect Dis. 2006;43:717-22.

British Thoracic Society. Chemotherapy and management of tuberculosis in the United Kingdom: recommendations 1998. Thorax 1998; 53:536-548.

Chaba, R., Raje, M., and Chakraborti, P. K. (2002) Eur. J. Biochem. 269, 1078–1085

Cheek S, Ginalski K, Zhang H , Grishin NV: A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. BMC Struct Biol 2005, 5:6

Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. Am J Epidemiol. 1974; 99: 131-8.

Comstock GW. Frost revisited: the modern epidemiology of tuberculosis. Am J Epidemiology 1975;101:263-382

Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, Spellneyer DC, Fox T, Caldwell JW, Kollman PA (1995) A second generation force-field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. J Am Chem Soc 117:5179–5197

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

Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A.R., and Jackson, S.P. (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* **4**: 387– 394.

Gopalaswamy, R., Narayanan, S., Jacobs, W.R., Jr., and Av-Gay,Y.(2008) FEMS Microbiol Lett. 278, 121–127

Greenstein,A.E.,Grundner,C.,Echols,N.,Gay,L.M.,Lombana,T.N., Miecskowski, C.A.,Pullen, K.E., Sung, P.Y., and Alber,T. (2005)J.Mol. Microbiol.Biotechnol.9,167–181

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

Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1980; 121: 939-949.

Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura J, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J Chem Phys 79:926-935

Kang,C.M., Abbott, D.W., Park,S.T., Dascher,C.C., Cantley, L.C., and Husson,R.N. (2005) GenesDev.19,1692–1704

Kumar, P., Kumar, D., Parikh, A., Rananaware, D., Gupta, M., Singh, Y., and Nandicoori,V.K. (2009) J.Biol.Chem. 284, 11090–11099

Loudon RG, Romans WE. Cough frequency and infectivitiy in patients with pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1969; 99:109-111.

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

Nott, T.J., Kelly, G., Stach, L., Li, J., Westcott, S., Patel, D., *et al*. (2009) An intramolecular switch regulates phosphoindependent FHA domain interactions in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Signal***2**: ra12.

Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Verem Savaşı Daire Başkanlığı: Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı, Ankara: 2003. 7

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.

Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T, Weng Z. (2014) ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. Bioinformatics 30(12): 1771-3)

Riley RL, Mills CC, O'Grady F, et al. 1962. Infectiousness of air from a tuberculosis ward-ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. Am Rev Respir Dis; 85:511-25.

Rita Szekely et all 2008. A novel drug discovery concept for tuberculosis: Inhibition of bacterial and host cell signalling Immunology letter volüme 116 Issue 2.

Silva, P.A., Ainsa, J (2007). 'Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. Ed Palamino, J.C., Leao, SC., Rittacco, V.) Drugs and drug interactions, s.593-634).

Simmerling C, Strockbine B, Roitberg AE (2002). All-atom structure prediction and folding simulations of a stable protein. J Am Chem Soc 124:11258–11259

Thakur, M., and Chakraborti, P. K. (2006). J. Biol. Chem. 281, 40107–40113

Tiwari D., Singh R.K., Goswami K., Verma S.K., Prakash B., Nandicoori V.K. 2009.Key residues in Mycobacterium tuberculosis protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host.J. Biol. Chem. 284:27467-27479.

Tufariello JM, Chan J, Flynn JL 2003. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection.

WHO, 2003. Treatment of tuberculosis. Guidelines for national programmes. Geneva, World Health Organization.

Wood R, Maartens G, Lombard CJ. Risk factors for developing tuberculosis in HIV-1-infected adults from communities with low or very high incidence of tuberculosis. J Acquir Immune Defic Syndr 2000; 23:75-80.

Y.Zhang, W. W. Yew (2005). Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis INT J TUBERC LUNG DIS 13(11):1320–1330.

(2012) Discovery Studio Visualizer Software, Version 4.0. http://www.accelrys.com.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülistan Sema ÇAKIR

Doğum yeri : DİYARBAKIR

Doğum tarihi : 31.07.1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Diyarbakır Anadolu Lisesi 2003

Lisans : Ege Üniversitesi Eczacılık Bölümü, 2008

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, 2019

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Gülistan Sema ÇAKIR
ÖĞRENCİ NO	11803003
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROTEİN KİNAZ G'NİN SİNYAL İLETİMİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA ARAŞTIRILMASI
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma SınavıSonrası
SAYFA SAYISI	36
BENZERLİK ORANI	%7
RAPORLAMA TARİHİ	24/07/2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 36 sayfalık kısmına ilişkin, 24/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 '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.

Gülistan Sema ÇAKIR
24/07/2019

Prof. Dr. Necmettin Pirinççioğlu **Tez Danışmanı** 24/07/2019	Prof. Dr. Haluk AYDIN **Anabilim Dalı Başkanı** 24/07/2019

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.