DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

SAMET AY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran – 2019

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Samet AY tarafından yapılan "Mycobacterium Tuberculosis Protein Kinaz B'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

Yüksek Lisans Tezim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLUNA'na ve başta ailem olmak üzere yanımda olan herkese sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca TÜBİTAK'a TR-GRİD olanaklarını sunduğu ve Prof. Dr. Case' e AMBER lisansı için şükranlarımı bildirmek istiyorum.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR…….		I
İÇİNDEKİLER…….....		II
ÖZET…….....		III
ABSTRACT…….....		IV
ŞEKİL LİSTESİ…….....		V
KISALTMALAR LİSTESİ…….		VI
1.	**GİRİŞ**…….....	1
1.1.	Tüberküloz ……..……	1
1.2.	Sinyal İletimi ……..….	4
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**…….…….	7
2.1.	Kinazlar: Potansiyel Mtb İlaç Hedefleri ……..……...	7
2.2.	PnKB……..……	7
2.3.	Bilgisayarlı Kimya……..	10
3.	**MATERYAL ve METOT**……..…	13
4.	**BULGULAR VE TARTIŞMA**…….……	15
5.	**SONUÇ VE ÖNERİLER**…….……....	23
6.	**KAYNAKLAR**…….……....	25
ÖZGEÇMİŞ……		33

ÖZET

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS PROTEİN KİNAZ B'NİN SİNYAL İLETİMİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAMET AY

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2019

Tüberküloz hastalığı günümüzün en öldürücü hastalıklarından biri olup buna Mycobacterium tuberculosis (Mtb) neden olmaktadır. Bu durumda, bu hastalığa neden olan bu bakeriyi hedef alan ilaç geliştirme stratejileri önem arzeden güncel araştırma konularıdır. Bu bakterinin büyüme ve çoğalma gibi işlemlerinde sinyal iletim mekanizmasını kullanarak başarılı bir şekilde yaşamını sürdürdüğü ve bunun için temel olarak 11 adet (A-K) ökaryotik benzeri serin/treonin kinaz kullandığı bilinmektedir. Dolayısıyla bu proteinlerin sinyal iletimindeki rollerinin bilinmesi bunları kayda değer ilaç hedefleri haline getirmektedir. Bu çalışmanın da amacı Mtb'nin sinyal iletiminde yeri anlaşılan Protein Kinaz B (PknB)'nin bilgisayar destekli yaklaşımlarla detaylı bir şekilde araştırılmasını içermektedir. Model yaklaşımlar kullanılarak bu kinazın mevucut x-ray yapısındaki eksik olan kısımlar tamamlandı ve ilgili treoninler (Thr171 ve Thr179) fosforlanarak bunların proteinin konformasyonunda yaptığı değişiklikler incelendi. Bu değişimlerin PknB'nin sübstratı olarak düşünülen glikojen birikimi düzenleyici (GarA) ile yaptığı etkileşimlere etkisi gözlemlendi. Sonuçlar PknB'nin fosforlandığı zaman anlamlı olarak konformasyonal değişikliğe uğradığını ve neticede GarA ile etkileşiminde anlamlı katkı sağladığı görüldü. PknB-T179'dan ziyade PknB-T171'nin GarA'yı THR22 artığını fosforladığı düşünüldü. Bu kinazın GarA ile etkileşiminde GarA'daki ARG81, 96 ve 97 artıkları fosforlanmış THR171 ile etkileştikleri bulundu. Bunun yanısıra sırasıyla kinazdaki ASP191 ve ARG189 ile GarA'daki ARG26 ve GLU32 ile ASP34 arasında çapraz tuz köprülerinin oluştuğu görüldü. Bu sonuçlar bağlanma mekanizmasını esas alarak bu bakteriye karşı ilaç geliştirme olanakları sunmaktadır. Bütün hesaplamalar AMBER (Assisted Model BuildingwithEnergyRefinement) paket programları kullanılarak yapılırken protein-protein etkileşimleri Z-DOCK vasıtasıyla yapıldı.

ANAHTAR KELİMELER: Mycobacterium Tuberculosis, okaryotik benzeri ser/thr protein kinazlar, PknB, GarA, sinyal iletimi, Docking, Moleküler Dinamik Simülasyonları

ABSTRCAT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROTEIN KINAZ B IN SIGNAL TRANSDUCTION BY MOLECULER MODELLING APPROACHESI

MASTER THESİS

SAMET AY

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). Docking results indicate that PknB-T171 rather than PknB-T179 forms a complex with an orientation to phosphorylate THR22. In this complex, phosphorylated THR171 interacts with ARG81, ARG96 and ARG97 in GarA. Besides, ASP and ARG189 in PknB-T171 interact with ARG26 and GLU32 and ASP34, respectively. All calculations were performed by AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) and protein-protien interactions were studied by Z-DOCK.

KEYWORDS: Mycobacterium Tuberculosis, eucaryotic like seri/thr protein kinases, PknG, GarA, signal transduction, Docking, Molecular Dynamic Simulation

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.1.	WHO verilerine göre tahmini TB insidans oranları, 2017. © Copyright World Health Organization (WHO), 2017. All Rights Reserved.	1
Şekil 1.2.	Mtb bulaşması ve büyümesi	2
Şekil 1.3.	Mtb'nin yapsıs (Mycrobiology in Pictures, 2013'ten alınmıştır.	3
Şekil 4.1.	PknB'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.	14
Şekil 4.2.	PknB'nin vakumda 2.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri.	15
Şekil 4.3.	PknB'nin vakumda 2.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri.	16
Şekil 4.4.	PknB'nin vakumda 32.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).	16
Şekil 4.5.	T171P-PknB'nin 32.5 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PKnB (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.	17
Şekil 4.6.	T179P-PknB'nin 12.5 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PKnB (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.	18
Şekil 4.7.	T171P-PknB'nin 32.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).	19
Şekil 4.8.	T179P-PknB'nin 12.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).	19
Şekil 4.9.	T22P-GarA'nın 15 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış GarA (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.	20
Şekil 4.10.	T22P-GarA (kırmızı)'nın 15 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*). GarA'ya ait RMSD verileri başka bir yüksek lisans çalışmasından alınmıştır. Aynı hesaplamalardan T22P-GarA için elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).	21
Şekil 4.11.	T179-PnkB'nin GarA (*sarı*) ile etkileşiminin modu	21

KISALTMALAR LİSTESİ

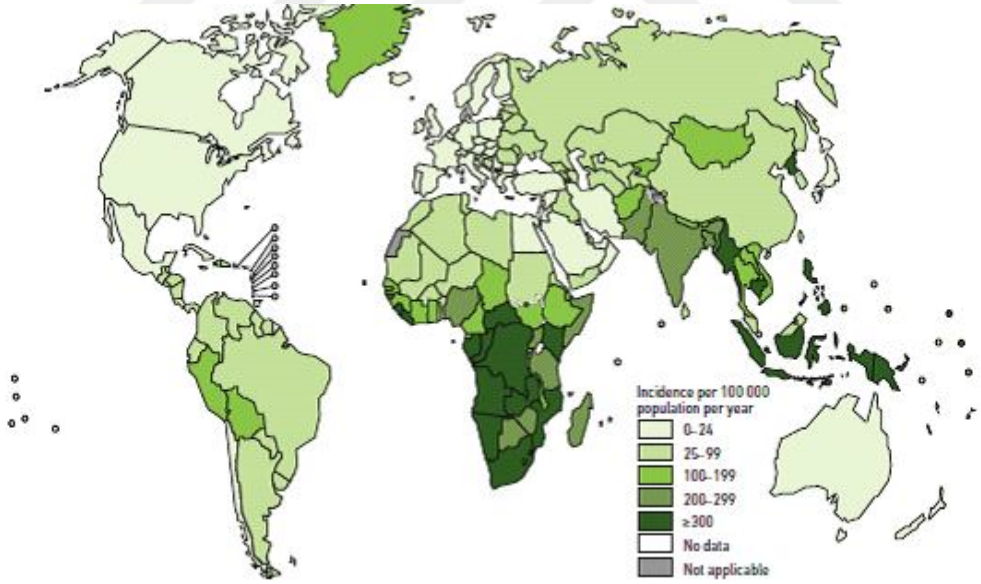
Mtb : Mycobacteriumtuberculosis
WHO : World HealthOrganization
TB : Tüberküloz
Pkn : Protein Kinaz
FHA : Forkhead-associated
GarA : Glycogenaccumulationregulator
MD : Moleküler dinamik
STPK : Serin / treonin protein kinaz

1. GİRİŞ

1.1. Tüberküloz

Tüberküloz (TB) yaygın olan ve birçok durumda insan sağlığına küresel çapta tehdit oluşturan ölümcül, bulaşıcı bir hastalıktır (Cole ve ark., 1998). TB ile ilişkili olan enfeksiyon, tek bir enfeksiyöz ajan vasıtasıyla başlayan dünyadaki en büyük katil olan HIV/AIDS'ten sonra ikinci sırada gelmektedir (WHO, 2018).

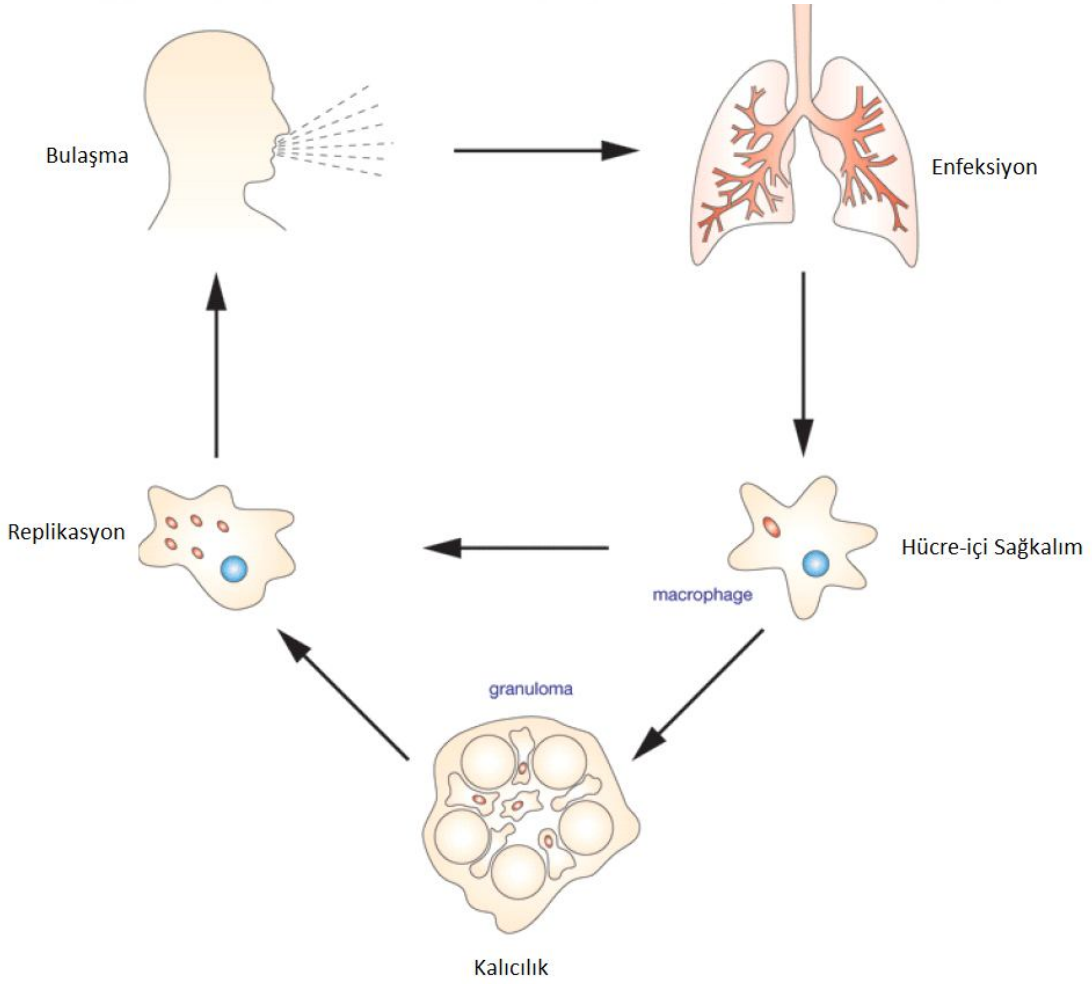
Bir yılda TB bulaşmış yaklaşık 9 milyon insandan ortalama 3 milyonu tedavi edilemiyor ve bu da hastalığın daha da yaygınlaşmasına neden olabiliyor. Bu 3 milyon tedavi edilmemiş vakanın çoğu, yoksulluk ve göz ardı edilen nüfustan kaynaklanmaktadır. TBC vakalarının %95'inden fazlası ve Şekil 1.1'de gösterilen ölümler, sıklıkla AIDS oranının yüksek olduğu ve insan popülasyonlarının bağışıklık sistemlerinin zayıf olduğu Güney Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. (WHO, 2018).



Şekil 1.1. WHO verilerine göre tahmini TB insidans oranları, 2017. © Copyright World Health Organization (WHO), 2017. All Rights Reserved.

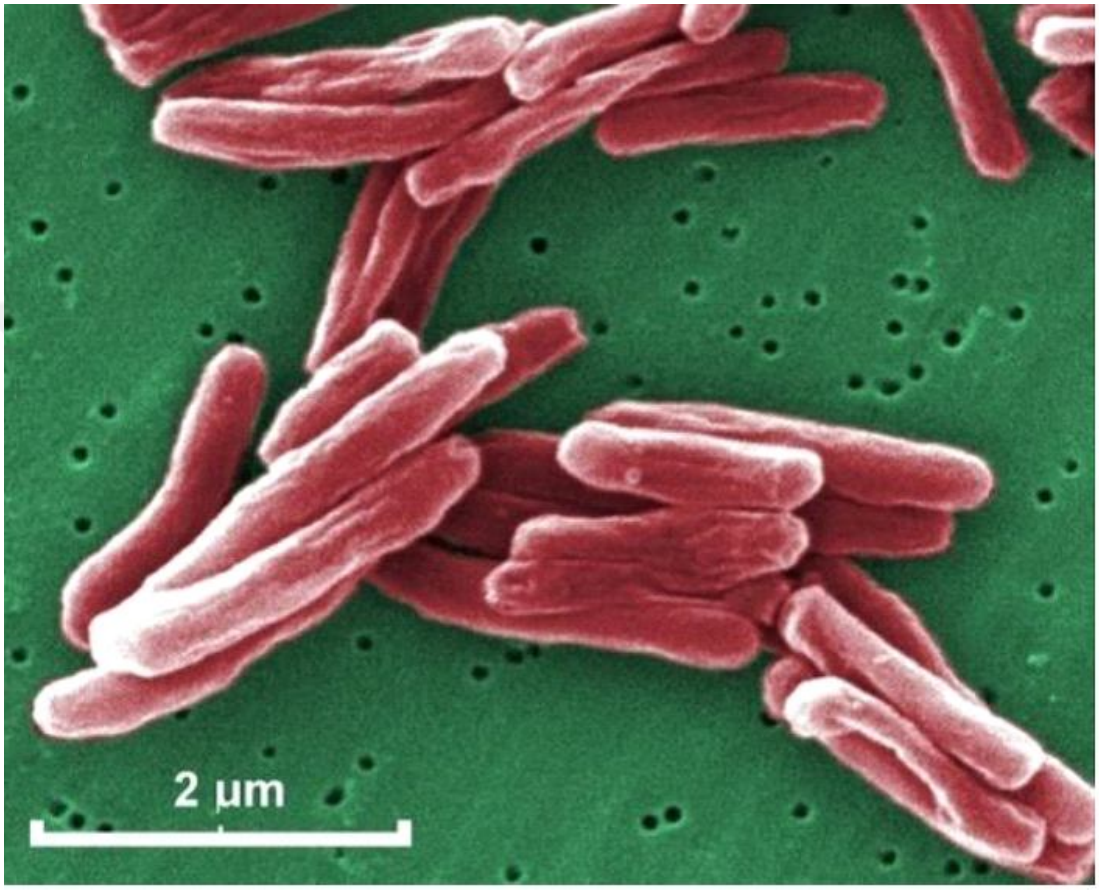
Tüberküloza, çeşitli mikobakteri suşları, ve genellikle mycobacterium tuberculosis neden olur ve en sık akciğerleri etkiler. Hava yoluyla insandan insana kolayca aktarılabilir. Alıcının, enfekte olması için bu aktif mikroorganizmaların genlerin yanı sıra azot ara maddeleri reaktifleri nötrleştirme yeteneğini de içerir. (Flynn ve Chaney, 2003).

Birkaçını Şekil 1.2'de gösterildiği gibi solunması gerekir (Dünya Sağlık Örgütü, 2018). Mycobacterium tuberculosis konağın immün sisteminde akciğerleri alveoler makrofajlarını kolonileştiren zorunlu bir hücre içi parazittir (Flynn ve Chaney, 2003).



Şekil 1.2. Mtb bulaşması ve büyümesi

Mtb mikroorganizması, yüksek lipid içeriğine sahip bir hücre duvarına sahip, Şekil 1-3'te gösterilen aerobik, aside dayanıklı, bir basildir (Kassim ve Ray. 2004). Bu organizma, sentetik ortamda ve enfekte hayvanlarda 24 saatlik bir çoğalma süresi ile yavaş büyür (Murray ve ark., 2005).



Şekil 1.3. Mtb'nin yapsıs (Mycrobiology in Pictures, 2013'ten alınmıştır.

Organizmanın temel özelliği hücre içi patogenezi olması ve uykuda olan bir duruma girebilme kabiliyetidir. Konağın makrofajlarının bakteriyi parçalaması engellenir çünkü kompleks bakteriyel hücre duvarı, makrofagal lizozomunun Mtb ile karışmasını önler, bu süreçte yer alan köprü molekülünü bloke eder (Flynn ve Chaney, 2003). Makrofaj asitlenmesi ve reaktif azot ara maddeleri üretimi normal olarak istilacı patojeni öldürmek için bu özel bağışıklık hücreleri tarafından kullanılan mekanizmalardır, fakat Mtb ayrıca makrofajın asitlenmesini önlenmesini kodlayan genlerin yanı sıra azot ara maddeleri reaktiflerini nötrleştirme yeteneğini de içerir. (Flynn ve Chaney, 2003).

Ev sahibinin bu organizmaya karşı verdiği immün yanıtlar, Mtb'nin metabolik kapanmasını taklit eden, ancak enfeksiyonu ortadan kaldırmayan uykuda bir aşamaya dönüşmesine neden olur. Bu nedenle, konağın bağışıklığı zamanla azalırsa, uykuda olan organizma yeniden aktif hale gelebilir ve ölümcül bir hastalığa neden olabilir. Uyku halinden reaktivasyona dönüşüm olgusunun genetik olarak programlandığı ve hücre içi sinyal yollarını içerdiği varsayılmaktadır (Cole ve ark., 1998).

1.2. Sinyal İletimi

Değişen bir ortama başarılı bir şekilde adapte olmak, verimli bir izleme ve hızlı bir tepki gerektirir. Kimyasal reaksiyonların kaskadı, gen transkripsiyonu ve hızlı bir metabolik adaptasyon ile sonuçlanır. Bu hızlı değişiklikler özellikle tepkilerin farklı hücresel bölmelerden yönetilmesi gerektiğinde önemlidir. Bu nedenle, konak hücrenin normal işleyişinde sinyallemenin önemi göz önüne alındığında, patojenlerin bulaşıcı döngülerini optimize etmek için konak hücrenin sinyal ağlarını kullanması şaşırtıcı değildir. Sinyalleme sistemleri genellikle hastalık ilerlemesi sırasında patojenik bakterilerin virülans faktörlerinin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. Önceden, iki bileşenli sistemler bakterilerde çevresel algılama için bilinen tek araçtı (Stock ve ark., 2000; Foussard ve ark., 2001). Buna karşılık, ökaryotlarda sinyal vermek, temel olarak, bir dizi serin / treonin ve tirozin kinazın ve bunlarla ilişkili fosfatazların koordineli olarak çalışmasını gerektiren bir protein fosforilasyon basamakları ağı ile gerçekleştirilir. Bu protein kinazlar ATP veya GTP'den bir fosfat grubunu bir protein substratının spesifik serin, treonin ve / veya tirozin kalıntılarına aktarır. Tipik olarak, fosforilasyon fonksiyonel olarak spesifik bir aktivite veya hücresel lokalizasyon gerçekleştirmek için substratı aktive eder ve / veya fosfat grubunun sinyal tepkisi reaksiyonlarının bir kademesini başlatan akış aşağı efektöre transfer eder. Fosforilasyonun ters reaksiyonu, aktivatörleri ve efektörleri başlangıçtaki fonksiyonel durumlarına (fosforile edilmemiş) geri yükleyerek sistemi bir sonraki sinyalleme olayı için hazırlar. Bu nedenle, kinazlar ve fosfatazlar, belirli sinyal iletim yollarını (Huse ark., 2002) modüle eden açma / kapama anahtarları olarak işlev görür.

Yakın zamana kadar prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda sinyallemenin farklı mekanizmalarla aracılık ettiği varsayılmıştır. Bununla birlikte, genetik

stratejilerdeki ve genom dizilimindeki son gelişmeler, Streptococcus spp gibi patojenler de dahil olmak üzere bir dizi prokaryotik organizmada "ökaryotelike" serin / treonin protein kinazlarının (STPKs) ve fosfataz varlığını ortaya çıkarmıştır. (Rajagopal ve ark., 2003; Jin ve ark., 2006), (Av-Gayve ark., 2000; Greenstein ve ark., 2005), . (Galyov ve ark., 1993; Hakansson ve ark., 1996), (Archambaud ve ark., 2005; Lima ve ark., 2011), (Wang ve ark., 1998), (Kristich ve ark., 2007) (Beltramini ve ark., 2009; Truong-Bolduc ve ark., 2010). Aslında, prokaryotlarda tanımlanan ökaryot benzeri Ser/Thr kinazları, kinaz bölgeleri arasındaki dizi homolojisine dayanan ökaryotik protein kinaz süper ailesi ile karakteristik imza sekansı motiflerini paylaşır (Hanks ve ark., 1995). Bu alanlar, tipik olarak, iki lob arasında (Hanks ve ark., 199; Kornev ve ark., 2010) oluşan derin bir yarıkta yatan katalitik aktif bölge ile birlikte, karakteristik birkaç katalizör göbek yapısında katlanan 12 alt etki alanında (Hanks alanları) düzenlenir. Kinaz katalitik bölgesi, spesifik korunmuş motiflerin ve fosfat verici ATP molekülünün ve protein substratının kataliz için konumlandırılmasında doğrudan veya dolaylı olarak yer alan neredeyse değişmeyen kalıntıların varlığı ile tanımlanabilir. Katalitik alanın farklı kinazlar arasında yapısal korunması dikkat çekicidir ve soylar arasında korunmaktadır.

Ökaryot benzeri sinyalleme sistemlerinin bakteriyel patojenlerde keşfedilmesi işlevlerini anlamada ilgi uyandırmıştır. Bunun nedeni, ökaryotik protein kinazların şu anda en büyük ilaç hedef grubu olması, ikincisi ise sadece G-protein-bağlı reseptörlere (Bogoyevitch ve ark., 2005; Cheng ve ark., 2010)ait olmasıdır. Çok sayıda STPK inhibitörleri, Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. İnsanlarda kullanımı ile ilgili kinaz inhibitörleri de klinik deneylerde test edilmektedir (Cheng ve ark., 2010)(Sachsenmaier ve ark., 2001; Cohen ve ark., 1991). Ayrıca STPK'lar da terapötik stratejilerdeki potansiyel araçlar olarak araştırılmaktadır (McConnell ve ark., 2009; Lu ve ark., 2009). Bu nedenle, insan patojenlerindeki prokaryotik STPK'lar üzerine yapılan çalışmalar gelecekteki anti-enfektif tedavilerde bu sinyalleşme bileşenlerini kullanma olasılığı nedeniyle ilgi kazanmıştır. STPK'ların bakteri üremesi ve patogenezine olan katkısı, diğer sinyal sistemleri için gözlemlendiği gibi çok yönlüdür. Bununla birlikte, bu kinazların koordineli bir şekilde farklı fonksiyonlara aracılık ettiği mekanizmalar, özellikle konakçı istilası / kalıcılığı sırasındaki rolleri tamamen anlaşılmamıştır. Şu ana kadar bilinen STPK'ya yönelik konakçı-patojen etkileşimleri, farklı tiplerde

görünmektedir. Bakteriyel STPK'nın, bir konakçı substratını veya substratlarını fosforile ettiği, konakçı savunmanın STPK aktivitesi tarafından bozulduğu ve STPK'nın rolü olduğu esastır ancak etkileşim mekanizması henüz açıklığa kavuşturulmamıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kinazlar: Potansiyel Mtb İlaç Hedefleri

Salgılanan ve ihraç edilen Mtb proteinleri, özellikle protein kinazları, patogenez için önemlidir ve bu bakterilerin büyümesinde rol oynar (Tomioka ve ark. 2008). Protein kinazlar, çeşitli metabolik ve sinyal yollarına katılan yapısal olarak farklı proteinlerden oluşan bir gruptur (Johnson ve ark. 1993; Kenyon ve ark. 2011). Bu enzimler, fosfat grubunun ATP (veya GTP) gibi yüksek enerjili donör moleküllerden bir substrata transferini katalize ederler. Substratlar, fosforil alıcısı olarak bir alkol, amino, karboksil veya fosfat grubu içeren küçük moleküller, protein veya lipitler olabilir (Kenyon ve ark. 2011; Cheek ve ark. 2002; Cheek ve ark. 2005). Proteinlerin fosforilasyonu, daha sonra karmaşık hücresel süreçleri kontrol etmek için kullanılan spesifik proteinlerin aktivitesini değiştirir. Bu enzimler metabolizma ve dolayısıyla Mtb'nin hayatta kalması için çok önemlidir (Tomioka ve ark. 2008). Kinazlar, fosforil transfer mekanizmalarına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılırlar (Kenyon ve ark. 2012). Mtb kinazlarının çeşitliliği ve önemi onları ideal bir biyokimyasal araştırma hedefi haline getirir.

Genomiklerin, biyoinformatiklerin ve genom diziliminin güçlü araçları, yeni tedavilerin geliştirilmesini kolaylaştırmak için Mtb hakkında bilgi sağlamıştır. Mtb suşu, H37Rv'nin genomu dizilmiş ve açıklanmış ve NCB000'de NC_000962.2 olarak depolanmıştır. Bu, burada olgunlaştırılmış tüm varsayılan gen dizilerinin kaynağıdır.

2.2. PknB

Protein fosforilasyonu/defosforilasyonu, hücre dışı ipuçlarının hücresel cevaplara dönüştürüldüğü kritik bir düzenleyici mekanizmadır. Geleneksel olarak, bir histidin kinaz sensörünü ve ilişkili yanıt düzenleyiciyi içeren iki bileşenli sistemlerin prokaryotlarda fosforilasyon aracılı sinyallemeden sorumlu olduğu düşünülmüştür (Stock ve ark., 1989; Robinson ve ark., 2000). İki bileşenli yollar ökaryotlarda nadirdir ve fosfotransfer bazlı sinyalleme baskın olarak çoğunlukla bir kaskadda serin, treonin veya tirozin kalıntıları üzerinde fosforilasyon / defosforilasyonu içerir. Bir prokaryotta ökaryotik benzeri bir STPK'nın varlığı ilk olarak 1991'de rapor edildi (Myxococcus xanthus'ta pkn1) (Mun˜oz-Dorado ve ark., 1991). Bu “ökaryotik benzeri” STPK'ler, hücre bölünmesi, hücre duvarı sentezi, hücre metabolizması ve dormansi çıkışı gibi

bakteriyel hücresel süreçlerde önemli rol oynarlar (Echenique ve ark., 2004; Kang ve ark., 2005). Mycobacterium tuberculosis genom dizisinin analizi 11 tane varsayılan ökaryotik benzeri STPK ve üç protein fosfataz varlığını ortaya koydu (Cole ve ark., 1998). PknG ve PknK hariç, tüm bu kinazların bir transmembran alana sahip olduğu tahmin edildi (Cole ve ark., 1998, Av-Gay ve ark., 2000). Bütün kinazlar, Hanks kriterlerine göre 11 korunmuş alt alan dahil olmak üzere protein kinaz "imza" motiflerine sahipti ve bu STPK familyası üyelerinin amino asit dizilimi, hepsinde katalitik açıdan önemli kalıntının korunduğunu ortaya koydu (Av-Gay ve ark., 2000;Hanks ve ark., 1995). M. tuberculosis STPK'ları anahtar mikobakteriyel süreçleri etkiler: PknA ve PknB'nin aracılık ettiği sinyal iletimi, hücre şekli, morfoloji ve muhtemelen hücre bölünmesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Kang ve ark., 2005); PknG ve PknH, M. tuberculosis virülansını, adaptasyonunu ve konakçıdaki büyümesini etkiler (Cowley ve ark., 2004;Walburger ve ark., 2004); PknF hücre bölünmesini, büyüme hızını, morfolojiyi ve glukoz taşınımını etkiler (Deol ve ark., 2005). Son zamanlarda, (Ortega ve ark., 2014) PknB'nin hipoksiye cevap olarak replikasyon anahtarı şeklinde rol oynadığını belirtmiştir. PknB aktivitesinin, hücrelerin hipoksik durumdan yeniden aktivasyonu için gerekli olduğunu gösterdiler.

Sırasıyla pknA ve pknB tarafından kodlanan protein kinazlar A ve B, protein fosfataz pstP, rodA (hücre şekli kontrolüne dahil olan) ve pbpA'yı (peptidoglikan sentezine dahil olan) kodlayan operon taşıyan sistronların bir parçasıdır. Bu lokus ayrıca iki forkhead-associated(FHA) alan içeren gen içerir ve mycobacterium cinsi (Narayan ve ark., 2007) boyunca replikasyon kaynağının yakınında bulunur. Diğer çoğu kinazlarda olduğu gibi, PknA ve PknB bir kinaz bölgesi, bir transmembran bölgesi, kısa bir transmembran bölgesi ve bir hücre dışı bölgeden oluşur (Av-Gay ve ark., 2000, Chakraborti ve ark., 2011). Her iki kinazın, transpozon-yerleştirme deneylerine (Sassetti ve ark., 2003) dayanarak gerekli olduğu bulunmuştur ve pknB geni, M. tuberculosis ve M. smegmatis'te allelik replasman ile sadece genin ikinci bir işlevsel kopyasının varlığında bozulabilir (Fernandez ve ark., 2006). 2009 yılında (Forti ve ark., 2009), pknB'nin genomik kopyasının bir pristinamisinin indüklenebilir kopyasına dönüştürüldüğü ve önceki bulguları tekrar doğrulayan, özdeşliğini gösterdiği M. Tüberküloz H37Rv-pptr-pknB koşullu mutantını üretti.

PknB, mikobakterilerin yüksek oranda karakterize edilmiş serin / treonin protein kinazları arasındadır. PknB'nin kinaz alanının (aa 1-279) kendi başına etkinliği (Dura´n ve ark., 2005) için yeterli olduğu gösterilmiştir; ancak, tam uzunluktaki proteine kıyasla etkinliğinin kapsamı belirlenmemiştir. PknB kinaz bölgesinin kristal yapı analizi, ökaryotik STPK homologlarına protein katlanmasının ve katalitik makinelerin korunmasını gösteren iki loblu bir yapı (N- ve C- terminal lobları) olarak bulundu (Ortiz-Lombardı´a ve ark., 2003; Young ve ark., 2003). N-terminal lob, ATP bağlama bölgesini içerir, oysa C-terminal lob aktif bir durum sergilemekte ve substrat (Lombana ve ark., 2010) ile etkileşimleri dengelemekte rol oynar. Yapılara dayanarak, PknB'nin hem arka arkaya hem de önden öne dimerleri (Mieczkowski ve ark., 2008) oluşturması önerilmiştir. PknB'nin dimerizasyonunun, allosterik bir mekanizma (Lombana ve ark., 2010) ile otofosforilasyon ve kinazın aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. PknB'nin hücre dışı alanının, dört konservasyona sahip olduğu tahmin edilmektedir.

PASTA (penisilin bağlayıcı protein ve serin / treonin kinaz ile ilişkili) alanlarının (Young ve ark., 2003, Yeats ve ark., 2002), peptidoglikan katmanlarını oluşturmak için kullanılan D-alanil-D-alanin dipeptitlerinin tanınmasında rol oynadığı öne sürülmüştür (Yeats ve ark., 2002). Nükleer manyetik rezonans ve küçük açılı X-ışını saçılması kullanılarak, dört PASTA alanından, iki PASTA alanının bir katlanıp, katlandığı penisilin b ağlama proteini PBP2x'in (Streptococcus pneumoniae'den) tersine doğrusal bir şekilde düzenlendiği gösterilmiştir (Barthe ve ark., 2010; Dessen ve ark., 2001). M. tuberculosis'in PknB'sinin hücre dışı alanının da muropeptitleri bağladığı gösterilmiştir ve kök peptidindeki etkileşimin aktivitesini etkileyen spesifik amino asitler tanımlanmıştır (Mir ve ark., 2011).

Her ne kadar PknB yapısı ve in vitro aktivasyon modu şimdi anlaşılmış olsa da, çeşitli alanların yapı-fonksiyon ilişkileri, mikobakteriyel büyüme ve hayatta kalma bağlamında incelenmemiştir. Bu çalışma, farklı alanların PknB fonksiyonunu *in vivo* modüle etmedeki önemini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için yapılmıştır. Mycobacterium smegmatis ve M. tuberculosis suşlarında pknB koşullu mutantları kullanarak, PknB'nin değişken ifadesinin, hücre ölümüne yol açan hem aşırı ekspresyon hem de tükenme ile hücre büyümesini ve morfolojisini düzenlediğini gözlemlemişlerdir. İlginçtir ki, ekstrakitoplazmik bölgede gerekli olan minimum PASTA alanı sayısının avirulent ve virülent mikobakteriler arasında değiştiğini bulmuşlardır. Bir fare

modeliyle yapılan enfeksiyon çalışmaları, PknB'nin tükenmesinin, patojenlerin konakçı dokulardan temizlenmesine yol açtığını ve bunun kesin olarak PknB'nin, konakçıdaki patojenin hayatta kalması için gerekli olduğunu göstermektedir.

Önceki çalışmalarda PknB'nin, kinaz-fosfataz çiftini kodlayan genlerin genetik olarak bağlandığı diğer bakteriler için gözlendiği gibi Ser / Thr protein fosfataz PstP, tarafından Sertofosforilasyon ve fosforilasyonla düzenlendiği gösterilmiştir (Obuchowski ve ark. 2000; Rajagopal ve ark. 2003; Nova´kova ve ark. 2005). PknB'de iki aktivasyon döngüsünden gelen treonin artıkları (Thr171 ve Thr179), bütün katalitik alanda tamamen otofosforile edilmiş tek bölgeler olarak tanımlanmaktadır (artık 1-279). Ya fosfataz ile muamele edilmiş PknB ya da Thr-Ala nokta mutantları, otofosforilasyon aktivitesinin yanı sıra, taşıyıcı substrat miyelin bazik proteine (MBP) doğru kinaz aktivitesini de önemli ölçüde azaltmıştır (Boitel ve ark. 2003). Bakteriyel STPK'nin PknB'sinin nükleotit ile kompleks içindeki kristal yapısı , ökaryotik homologları içinde görüldüğü gibi korunmuş bir protein kat ve katalitik makine ortaya çıkarmıştır (Ortiz-Lombardia ve ark. 2003; Young ve ark. 2003). Bununla birlikte, PknB'nin iki bağımsız kristal yapısındaki düzensiz aktivasyon döngüsü, şimdiye kadar bilinmeyen bir bağlanma-uyarım modunu önerir. Prokaryotlarda protein kinaz biyolojisi anlayışımızdaki en büyük engel, fizyolojik olarak alakalı kinaz substratlarının tanımlanmasıdır. Mikobakteriyel kinazların *de novo* protein substratlarının keşfedilmesine yönelik ilk adımı , küresel bir proteomik yaklaşım kullanarak PknB'nin varsayılan bir fizyolojik substratı olan ve FHA alan içeren protein olan glycogen accumulation regulator (GarA)'nın tanımlandığını bildirildi. GarA, PknB ile bütün hücreli protein özütlerinde (WCE) ve M. tuberculosis ve Mycobacterium smegmatis'in hücre süzüntülerinde (CF) seçici olarak fosforile edilir. Çalışmalar, kinaz aktivasyon döngüsü ve substrat FHA alanı arasındaki spesifik etkileşimleri içeren mikobakteriyel protein kinaz PknB tarafından GarA substrat alımı için moleküler bir mekanizma olduğunu ortaya koymaktadır (Villarino ve ark., 2005).

2.3. Bilgisayarlı Kimya

Canlı hücrede gerçekleşen karmaşık biyokimyal işlemler dahil çeşitli kimyasal etkileşimlerin deneysel olmayan teorik yaklaşımlarla öngörülmesi bilimin popüler olan

konuların başında gelir. Kimya alanında bu yaklaşımlar temel olarak kuantum mekanik ve moleküler mekanik olmak üzere iki yaklaşıma ayrılır. Biyokimyasal işlemler büyük sistemler olduğu için bu tür etkileşimlerin incelenmesi moleküler mekanik yaklaşımlarla yapılır. Bu yaklaşım da bir kuvvet alanı (force field) uygulamasını içerir. Yani öngörülmek istenen sistemin tamamı parametreleştirilmiştir.

Biz de bu çalışmada bu yaklaşımdan faydalanarak PknB'nin fosforilasonunun sinyal iletimindeki rolünü ve bunun GarA proteini ile olan ilişkisini incelemeyi hedefledik. Bu proteine ilişkin bu türden yaklaşımlarla yapılan çalışmalar sınırlıdır (Caballero ve ark. 2018; Turapov ve ark. 2018; Prigozhin ve ark. 2016; Punkvang ve ark. 2016; Gurung ve ark. 2015; Arora ve ark. 2014; Silakari ve ark. 2012; Ortega ve ark. 2014; Zakharevich ve ark. 2012; Kristich ve ark. 2011; Székely ve ark. 2008). PknB'deki THR171 ve THR179 artıklarının fosforilasyonunu ve fosforilasyon sonucu proteindeki konformasyon değişikliğinin GarA ile olan ilişkisinin araştırlıması hedeflendi. Bu çalışmada çıkan bulgular spesifik olarak bu protein veya GarA hedef alınarak ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sunacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

Bütün moleküler dinamik hesaplamalar Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER v.12) (Case ve ark., 2012) paket programı ile yapıldı. Hesaplamalarda proteinlerin similasyonu için ff99SB kuvvet alan kütüphanesi kullanıldı (Hornak ve ark., 2006). *Mycobacterium tuberculosis* Serine/threonine-protein kinaz PknB 'nin x-ray yapısı protein data bank **(**https://www.rcsb.org)'tan alındı (pdb kodu: 1O6Y). Eksik olan kısımlar tamamlandı. Eksik olan kısımlar 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). Hesaplamalar vakumda bağ yapmayan durdurma mesafesi (cutoff) değeri=999 ve genellenmiş Born çözücü modelli (igb = 0) seçilerek yapıldı. Bu aşamadaki moleküler dinamik hesaplamalar için eklemeler yapılan kısımlar hariç diğer yerler sabit (500 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ kuvvet ile) tutularak toplamda 1000 adımda minimize edildi. Minimizasyon önce 500 adımda steepest descent yaklaşımı ile diğer 500 adımda conjugate gradient yaklaşımı ile yapıldı. Daha sonra sistem 230 ps süreyle 7 adımda 0 K'den 325 K'e kadar ısıtıldı. Sonunda eklemeler yapılan kısımlar hariç diğer yerler 10 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ kuvvet ile sabit tutularak 325 K'de 2.5 ns süreyle simüle edildi. Bu hesaplamalardan elde edilen yapıların CHIMERA (Pettersen ve ark., 2004) ile yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden yapı seçilerek bunlar XLEAP yardımı nötrleştirdi ve periyodik kutu şartlarında simülasyonlarını yapmak için kutu boyutu 10.0 Å olacak TIP3PBOX (Jorgensen ve ark., 1983) çözücü ilave edildi. Sistem önce protein kısmı sabit tutularak önce protein kısmına 10 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ lik bir kuvvet uygulanarak 1000 adımda minimize edildi ve daha sonra uygulanan kuvvet kaldırılarak 2500 adımda bütün sistem minimize edildi. Buna müteakip sistem 200 ps süreyle protein kısmına kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ lik bir kuvvet uygulanarak 0 K'den 300 ^{o}K'e kadar ısıtıldı. Sonra uygulanan kuvvet kaldırılarak sistem 300 ^{o}K ve 1 atm'de 32.5 süreyle canonical ensemble modunda MD hesaplamlara tabii tutuldu. Sıcaklık ve basıncı dengelemek için Langevin termostatı ve barostatı kullanıldı. Hidrojen atomlarını içeren bütün bağları sınırlamak için *SHAKE* algoritması uygulandı (Cornell ve ark., 1995). Periyodik kutu içinde yapılan hesaplamalar için bağ yapmayan durdurma mesafesi (cutoff) değeri 10 Å olarak seçildi ve uzun-mesafe elektrostatik etkileşimler yaklaşık 0.1 nm mesafeli bir hızlı Fourier

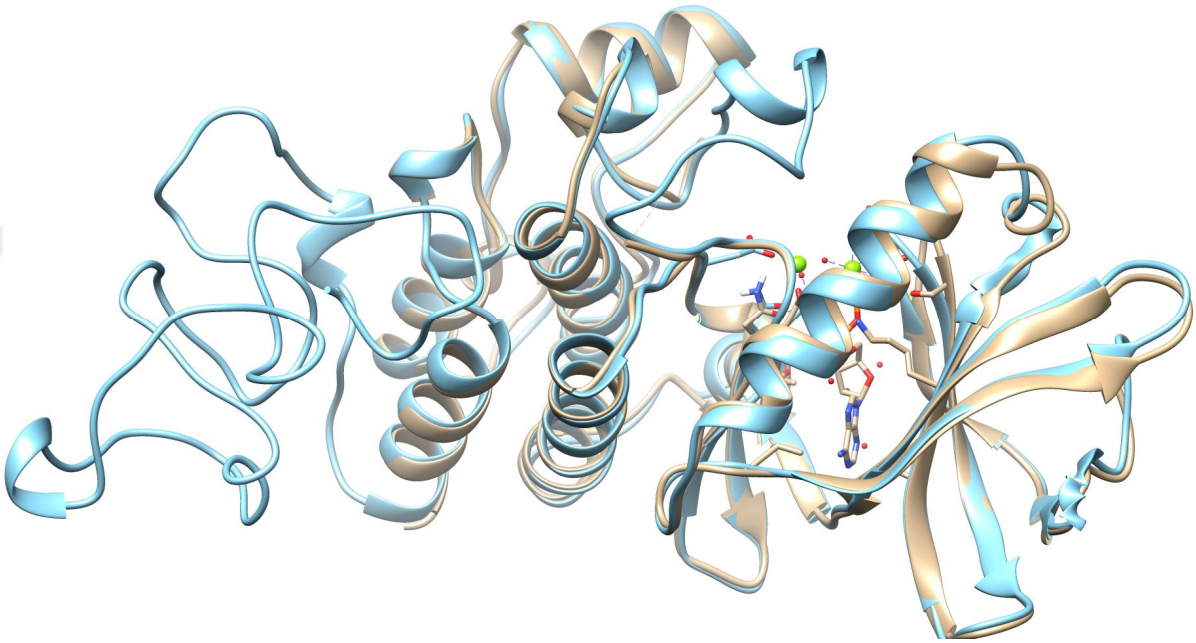
tranform gridli Particle Mesh Ewald (PME) (Darden ve ark. 1993) metododu kullanılarak muamele edildi. Trajektörü anlık görüntüleri her 0.2 ps'de bir alındı ve bunlar daha sonra analizde kullanıldı.

Periyodik kutu içinde 32.5 ns süreyle simüle edilen yapıların küme analizlerinden elde edilen en kalabalık kümeye sahip yapıdan GarA için THR22 XLEAP kullanılarak fosforlandı. Fosfotlanmış treonin için litaratürdeki kuvvet alan kütüphanesi kullanıldı (Homeyer ve ark., 2006). Benzer bir şekilde PknB'nin de THR171 ve THR179 artıkları fosforlandı. Fosforlanan yapılar da yukarıda belirtildiği gibi periyodik kutu içinde 32.5 ns süreyle simüle edildi. Moleküler dinamik hesaplamalar sonucu elde edilen moleküler dinamik koordinatlar yardımı ile CPPTRAJ (Roe ve Cheatham 2013) yardımıyla sistemlerin Root Mean Square Deviation (RMSD) hesaplandı. RMSD ve MD hesaplamalar boyunca zamana karşı enerji değişimleri Graph Prism 4 ile yapıldı. Yapıların gösterilmesi CHIMERA ile yapıldı.

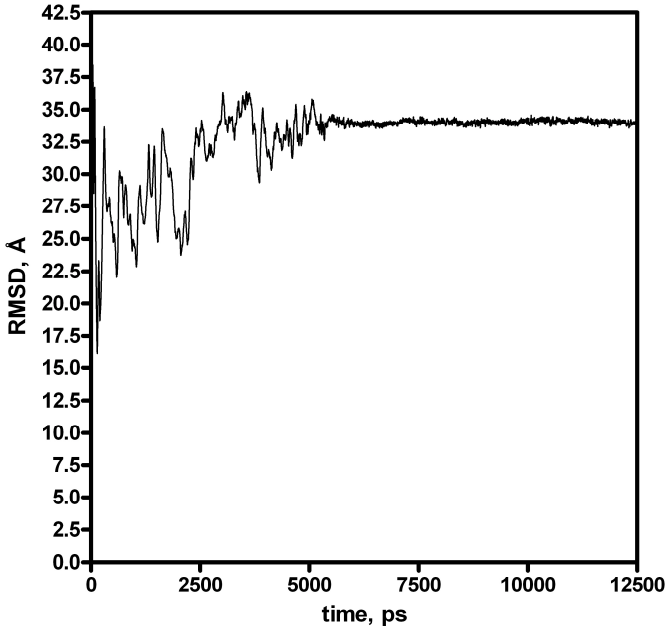
Protien-Protein Docking işlemleri on-line server yardımı ile Z-DOCK (http://zdock.umassmed.edu) ile yapıldı (Pierce ve ark., 2014).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

PknB için eklemeler yapılan kısımlar hariç diğer yerler 10 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ 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. Bu MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD değişimleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğramıştır.

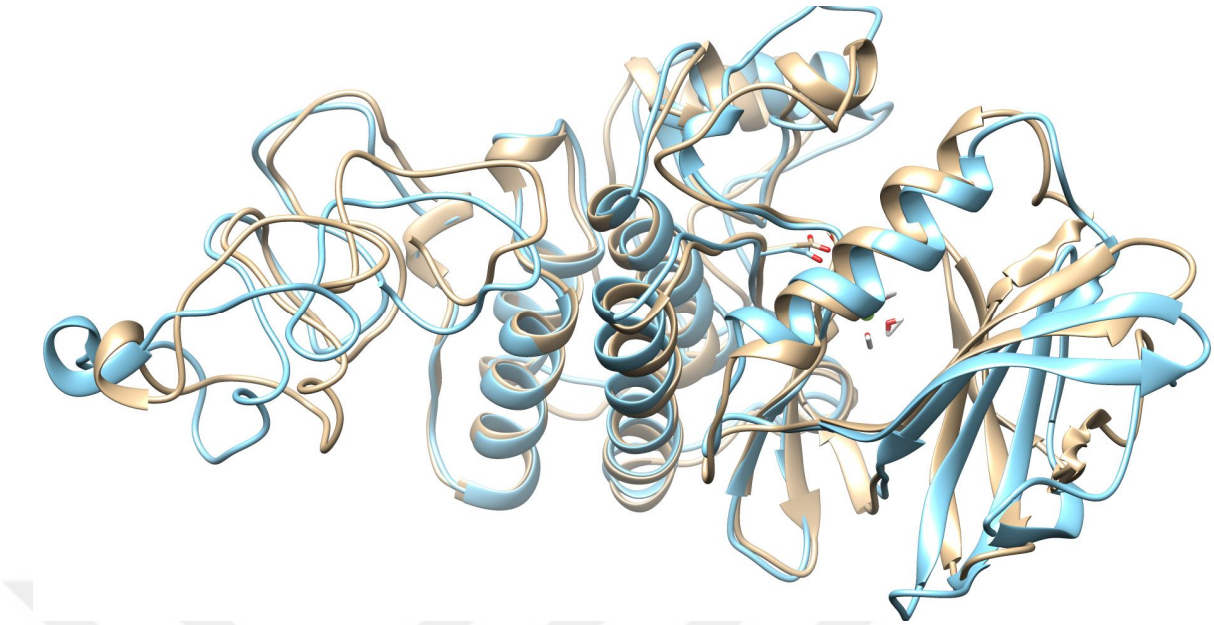


Şekil 4.1. PknB'nin 2.5 ns süreyle vakumda 325 K'de MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) orijinal yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.

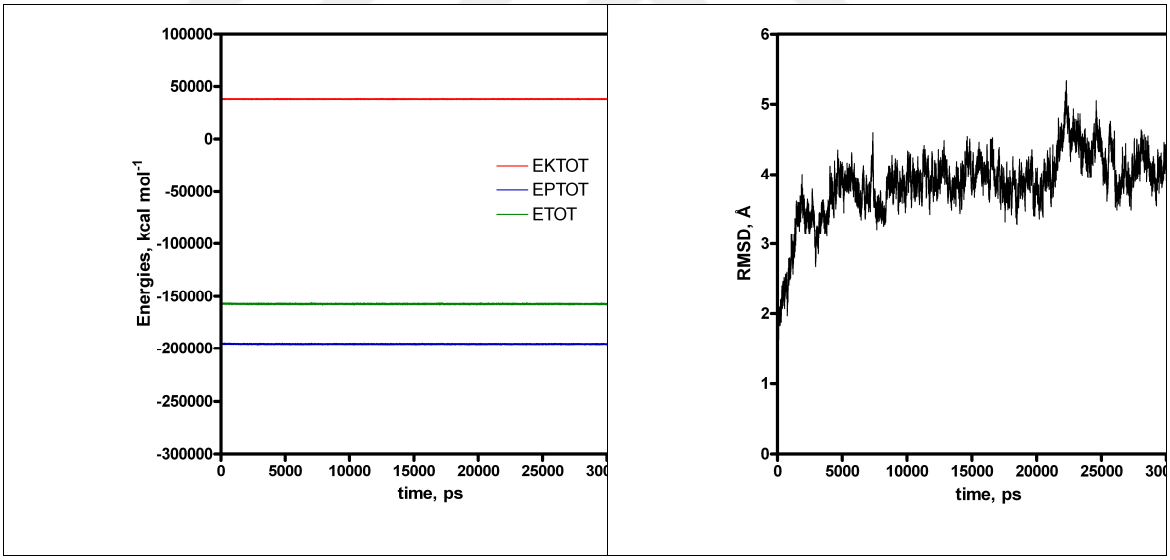


Şekil 4.2. PknB'nin vakumda 2.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri.

Bu yapının periyodik kutu içinde 12.5 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen yapı Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Bu süre zarfında periyodik kutu içinde sistemin kararlı kaldığı ve vakumdaki yapıdan çok sapmadığı görülmektedir (Şekil 4.3). 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 kısa bir süre sonra dengeye ulaştığ anlaşılmıştır.



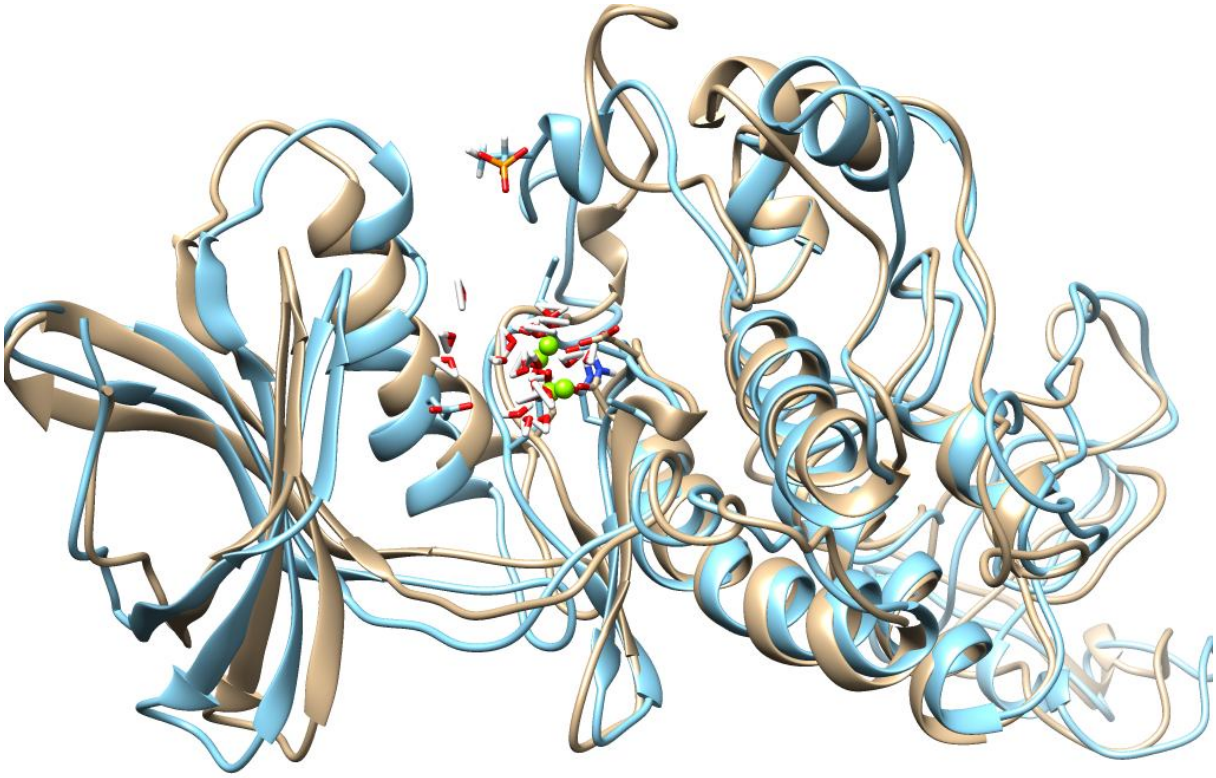
Şekil 4.3. PknB'nin 32.5 ns süreyle periyodik kutu içinde moleküler dinamik hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) vakumdaki yapı (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.



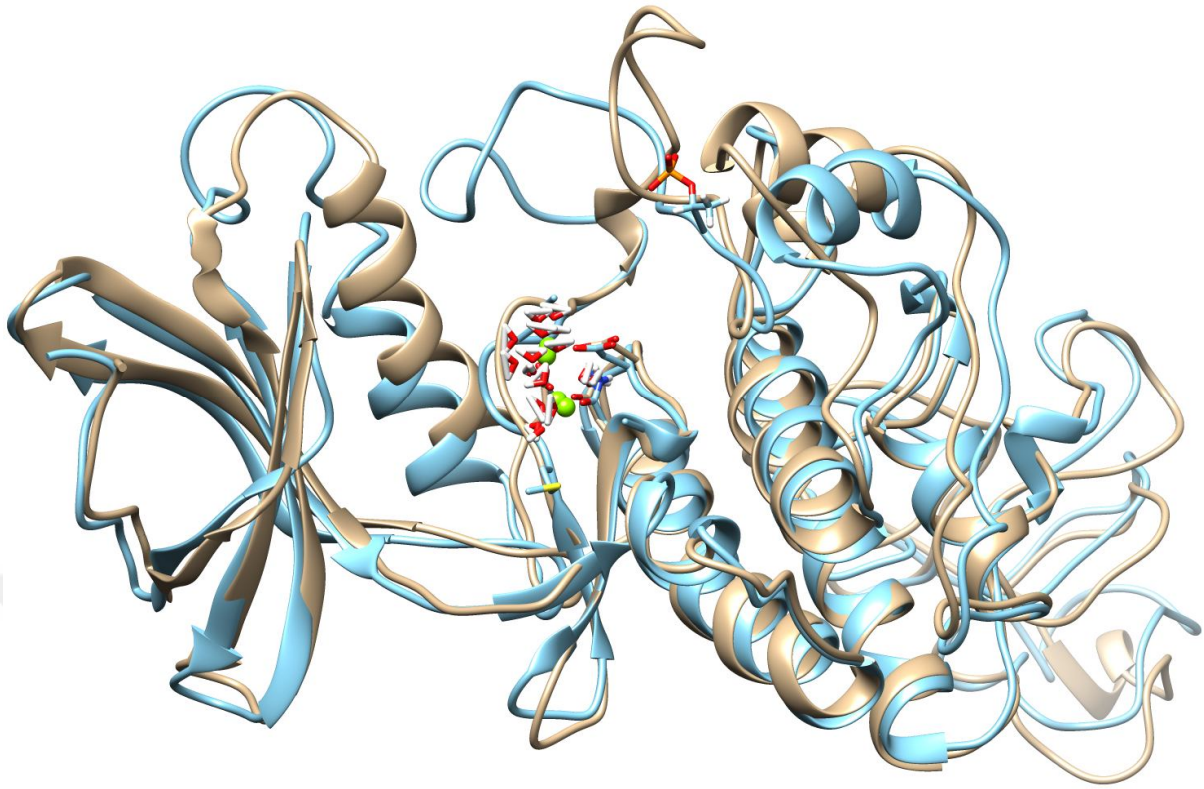
Şekil 4.4. PknB'nin vakumda 32.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).

Fosforlanmış PknB (THR171 ve THR179) yapıların periyodik kutu içinde 32.5 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen yapıların fosforlanmamış

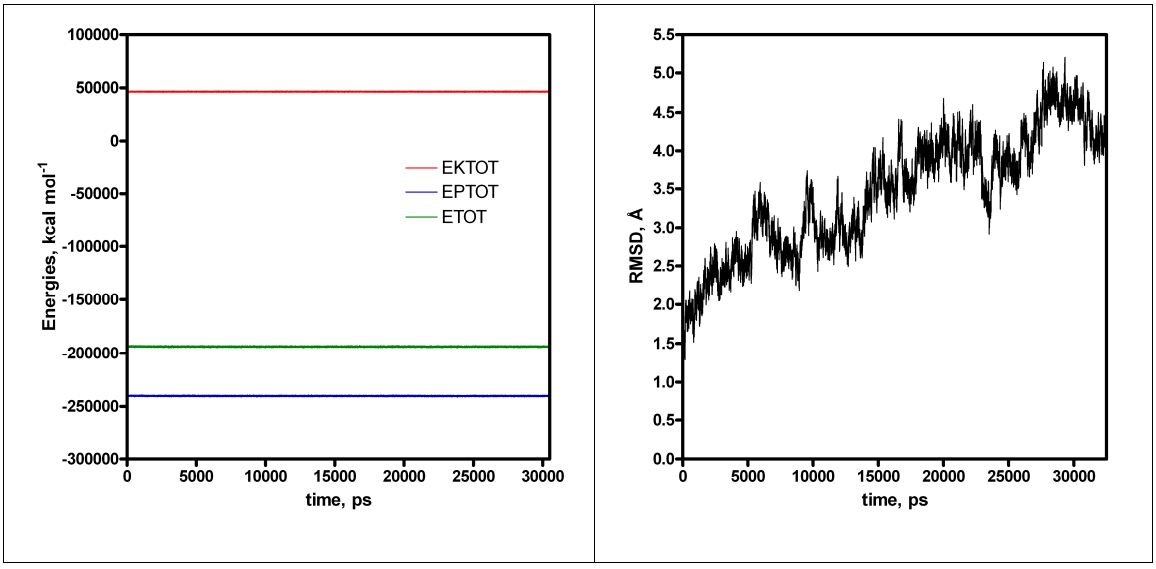
yapılarla üst-üste çakıştırılmış görüntüleri sırasıyla Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış yapılar özellikle 155-184'teki ilmikte (loop) konformasyonal değişikliğe uğradığı görülmektedir. Bu konformasyon değişikliğinin ilgili sübstratı tanıma ve fosforlama da önemli olabileceği kanısına varıldı. Bu fosoforlanmış yapıların MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.7 ve 4.8'de verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistem kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğradığı ve 25 ns'e kadar ço az bir şekilde artan RMSD'ye rağmen 32 ns'ten sonra bu artıiın azalma eğiliminde olduğu görülmektedir.



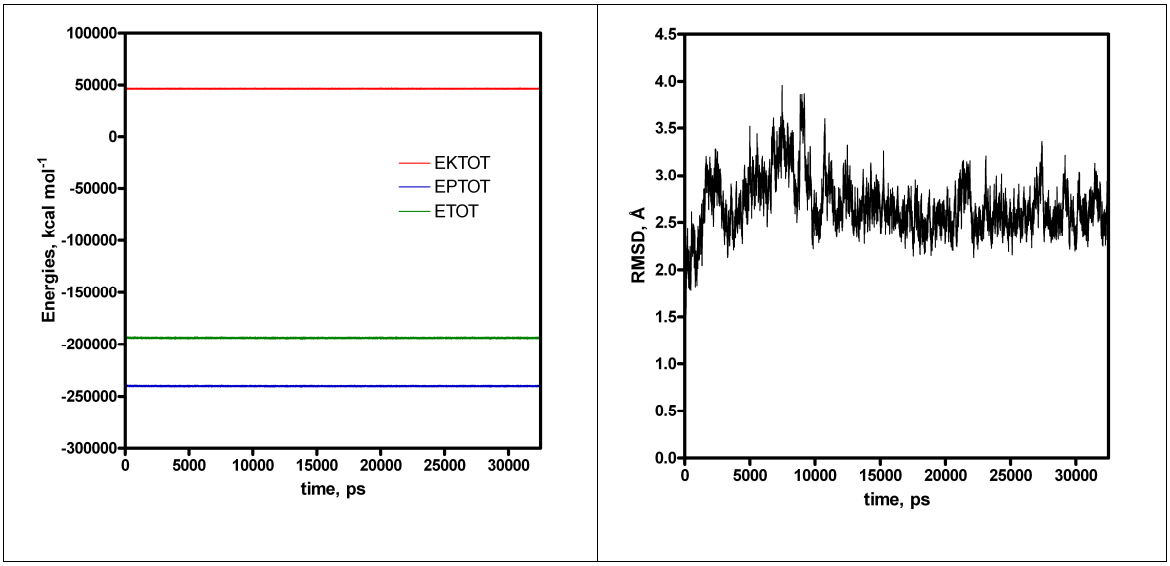
Şekil 4.5. T171P-PknB'nin 32.5 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PKnB (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.



Şekil 4.6. T179P-PknB'nin 12.5 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış PKnB (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.

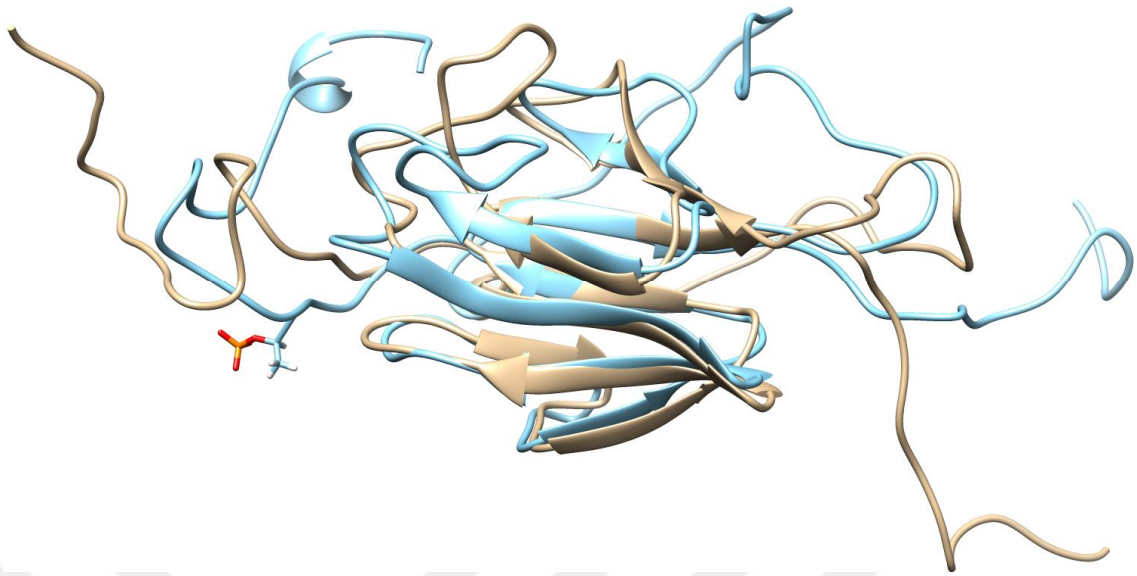


Şekil 4.7. T171P-PknB'nin 32.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).

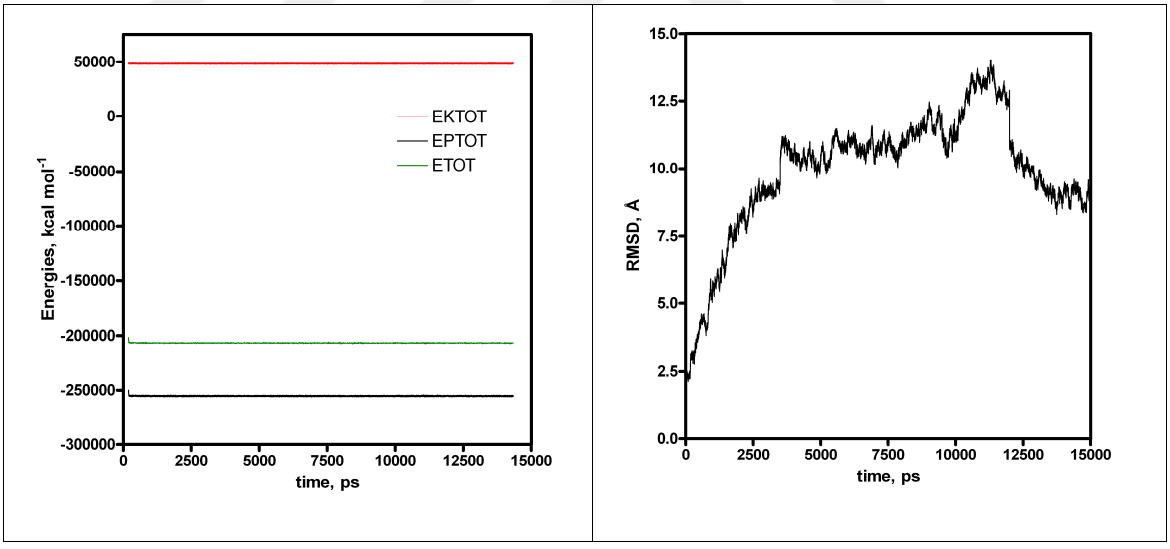


Şekil 4.8. T179P-PknB'nin 12.5 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*) ve aynı hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).

Benzer bir şekilde fosforlanmış GarA (THR22-P) yapısının periyodik kutu içinde 15 ns süreyle simüle edilen ve moleküler dinamik trajektörlerinden yapılan kümeleme işlemlerinden sonra en kalabalık kümeden elde edilen yapının fosforlanmamış yapıyla üst-üste çakıştırılmış gösterimi Şekil 4.9'da verilmiştir. Burada da görüleceği gibi fosforlanmış proteinin konformasyonal değişikliğe uğradığı görülmektedir (Şekil 4.9). T22P-GarA'nın periyodik kutu içinde MD hesaplamalar için zamana bağlı RMSD ve enerji değişimleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi sistemler kabul edilebilir bir şekilde dönüşüme uğradığı ve 5 ns'tan sonra dengeye ulaştığı görülmektedir.



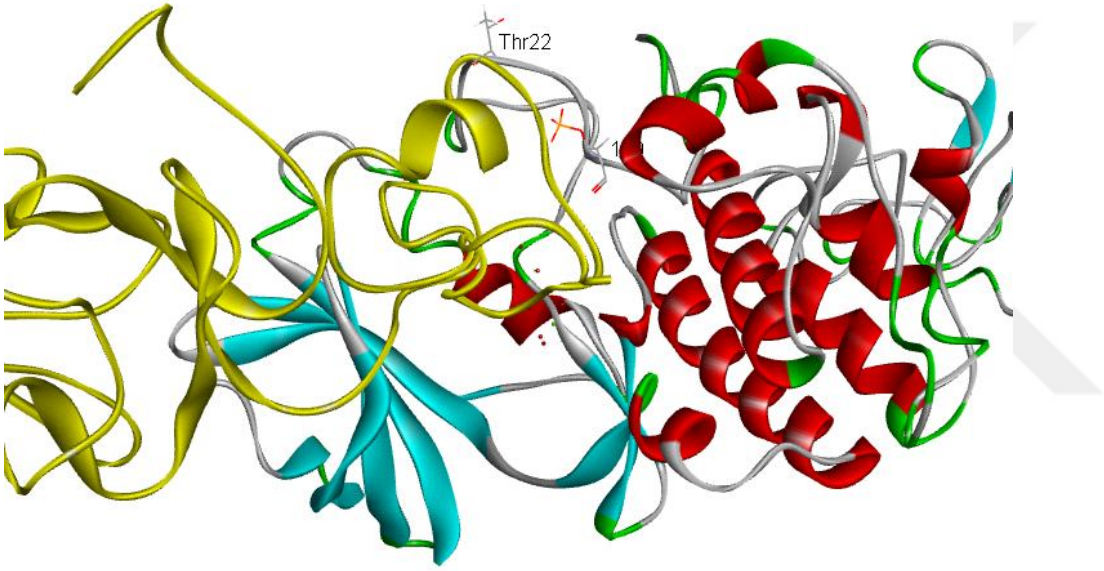
Şekil 4.9. T22P-GarA'nın 15 ns süreyle periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen yapının (açık mavi) aynı sürede periyodik kutu içinde MD hesaplamalardan elde edilen fosforlanmamış GarA (açık kahve) ile üst üste çakıştırılması sonucu elde edilen görüntü.



Şekil 4.10. T22P-GarA (kırmızı)'nın 15 ns süreyle yapılan MD hesaplamalardan elde edilen koordinatların zaman bağlı RMSD değişimleri (*sağ*). GarA'ya ait RMSD verileri başka bir yüksek lisans çalışmasından alınmıştır. Aynı hesaplamalardan T22P-GarA için elde edilen koordinatların zaman bağlı enerji değişimleri (*sol*).

Z-DOCK server (Pierce ve ark., 2014) kullanılarak fosforlanmamış PknB ve fosforlanmış PknB-T171P ve PknBT179P ile GarA arasında protien-protein docking

işlemi sonucu PknB ve T179P-PknB ile GarA arasında benzer bir etkileşim deseni ile kompleks oluştuğu görülürken PknB-T171'nin ise ile GarA ile kısmen farklı bir etkileşim deseni ile kompleks oluşturulduğu gözlendi. Her ne kadar PnkB-T179'nin dock skoru (1539.44) PnkB'ninkinden (1430.38) iyise komplekslerinin kararlıklarını mukayese edebilmek bu komplekslerin için moleküler dinamik hesaplamalar yapmak gerekecektir. Buna rağmen T171P-PknB ile GarA arasındaki kompleks için her komplekslerde benzer bir ilişki bulunmadı. Yine de ilk 10 kompleksin içinde 7. sırada yer alan komplekste THR22 artığı fosforlanmış T171 grubuna yakın mesafede olduğu görüldü (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. T179-PnkB'nin GarA (*sarı*) ile etkileşiminin modu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma Mtb'de PknB'nin fosforilasyonu soncu proteinde gerçekleşen konformasyonel değişiklik ve bu değişikliğin GarA ile etkileşimine etkisi araştırılıdı. Sonuçlar T171. ve T179. artıklardaki fosforilasyonun protein konformasyonunda anlamlı değişikliğe neden olduğunu ve bu değişikliğin GarA'yı bağlamada önemli bir yer tutuğunu gösterdi. Bu sonuçlar bağlanma mekanizmasını esas alarak bu bakteriye karşı ilaç geliştirme olanakları sunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Archambaud, C., Gouin, E., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., and Dussurget, O. (2005) Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serinethreonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 56, 383–396.

Arora, G., Sajid, A., Singhal, A., Joshi, J., Virmani, R., Gupta, M., Verma, N., Maji ,A., Misra, R., Baronian, G., Pandey, A.K., Molle, V. and Singh, Y. (2014) Identification of Ser/Thr kinase and forkhead associated domains in Mycobacterium ulcerans: characterization of novel association between protein kinase Q and MupFHA. PLoS Negl Trop Dis. 8(11), e3315.

Villarino, A.,Duran, R., Wehenkel, A.,Fernandez, P., England P.,Brodin, P., Cole, S. T.,Zimny-Arndt, U.,Jungblut, P. R.,Cerven˜ansky C., and Alzari,P. M. Proteomic Identification of M. tuberculosis Protein Kinase Substrates: PknB Recruits GarA, a FHA Domain-containing Protein, Through Activation Loop-mediated Interactions. J. Mol. Biol. (2005) 350, 953–963.

Alber, T. (2009) Signaling mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 650–657.

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

Barthe, P., Mukamolova, G. V., Roumestand, C., and Cohen-Gonsaud, M. (2010) The structure of PknB extracellular PASTA domain from mycobacterium tuberculosis suggests a ligand-dependent kinase activation. Structure 18, 606–615.

Beltramini, A. M., Mukhopadhyay, C. D., and Pancholi, V. (2009) Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect. Immun.* 77, 1406–1416.

Bogoyevitch, M. A., Barr, R. K., and Ketterman, A. J. (2005) Peptide inhibitors of protein kinases–discovery, characterisation and use. *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 79–99.

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

Caballero, J., Morales-Bayuelo A. and Navarro-Retamal C.. (2018) Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinases: structural information for the design of their specific ATP-competitive inhibitors. J Comput Aided Mol 32(12), 1315-1336.

Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E. III., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Götz, A.W., Kolossváry, I., Wong, K.F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R.M., Liu, J., Wu, X., Brozell, S.R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe, D.R., Mathews, D.H., Seetin, M.G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A. and Kollman P.A. (2012), AMBER 12, University of California, San Francisco

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

Chakraborti, P. K., Matange, N., Nandicoori, V. K., Singh, Y., Tyagi, J. S., and Visweswariah, S. S. (2011) Signalling mechanisms in Mycobacteria. Tuberculosis 91, 432–440.

Cheek, S., Ginalski, K., Zhang, H. and Grishin, N.V. (2005). A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. BMC Structural Biology vol. 5 (6), pp. 1-19.

Cheek, S., Zhang, H. and Grishin, N.V. (2002). Sequence and structure classification of kinases. Journal Molecular Biology vol. 320, pp. 855-881.

Cheng, H., and Force, T. (2010) Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ. Res.* 106, 21–34.

Cohen, P. (1991) Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods Enzymol.* 201, 389–398.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 393, 537–544.

Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P., and Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1315–1352.

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

Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K. J., Gordhan, B. G., Betts, J. C., Mizrahi, V., Smith, D. A., Stokes, R. W., and Av-Gay, Y. (2004) The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. Mol. Microbiol. 52, 1691–1702.

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

Deol, P., Vohra, R., Saini, A. K., Singh, A., Chandra, H., Chopra, P., Das, T. K., Tyagi, A. K., and Singh, Y. (2005) Role of Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division. J. Bacteriol. 187, 3415–3420.

Dessen, A., Mouz, N., Gordon, E., Hopkins, J., and Dideberg, O. (2001) Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J. Biol. Chem*. 276, 45106–45112

Dura´n, R., Villarino, A., Bellinzoni, M., Wehenkel, A., Fernandez, P., Boitel, B., Cole, S. T., Alzari, P. M., and Cerven˜ansky, C. (2005) Conserved autophosphorylation pattern in

activation loops and juxtamembrane regions of Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 333, 858–867.

Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P. W., and Trombe, M. C. (2004) Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 72, 2434–2437

Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Gicquel, B., Cole, S. T., and Alzari, P. M. (2006) The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J. Bacteriol*. 188, 7778–7784.

Flynn, J.L and Chany, J. (2003). Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol* 15 (4), 450-455.

Forti, F., Crosta, A., and Ghisotti, D. (2009) Pristinamycin-inducible gene regulation in mycobacteria. J. Biotechnol. 140, 270–277.

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

Galyov, E. E., Håkansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 361, 730–732.

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) Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9, 167–181.

Gurung, A.B., Mylliemngap, B.J., Bhattacharjee, A., Ali, M.A. and Al-Hemaid, F.M.(2015) Interactome analysis and design of inhibitors against selected protein targets of Ser/Thr protein kinase (STPK) signaling pathways in Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Genet Mol Res. 14(3),10390-403.

Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576–596.

Homeyer, N., Horn, A.H., Lanig, H., Sticht, H.(2006)AMBER force-field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, and phosphohistidine. *J Mol Model*. 12(3), 281-289.

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

Huse, M., and Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275–282.

Hussain, H., Branny, P., and Allan, E. (2006) A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 188, 1628–1632.

Håkansson, S., Galyov, E. E., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1996) The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol. Microbiol.* 20, 593–603.

Jin, H., and Pancholi, V. (2006) Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J. Mol. Biol.* 357, 1351–1372.

Johnson, L.N. and Barford, D. (1993). The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. Annual review of biophysics and biomolecular structure, vol. 22 (1), pp. 199-232.

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

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

Kassim, I. and Ray, C.G. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw Hill 9, pp. 8385-8529.

Kenyon, C.P., Roth, R.L, Van der Westhuyzen, C.W. and Parkinson, C.J. (2012). Conserved phosphoryl transfer mechanisms within kinase families and the role of the C8 proton of ATP in the activation of phosphoryl transfer. BMC Research Notes, vol. 5 (131), pp. 1.

Kenyon, C.P., Steyn, A., Roth, R.L., Steenkamp, P.A., Nkosi, T.C. and Oldfield, L.C. (2011). The role of the C8 proton of ATP in the regulation of phosphoryl transfer within kinases and synthetases. BMC Biochemistry, vol. 12, pp. 36-53.

Kornev, A. P., and Taylor, S. S. (2010) Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 440–444.

Kristich, C. J., Wells, C. L., and Dunny, G. M. (2007) A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3508–3513.

Kristich, C.J., Little, J.L., Hall, C.L. and Hoff, J.S. (2011) Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in Enterococcus faecalis. MBio. 2(6), e00199-11.

Leiba, J., Hartmann, T., Cluzel, M. E., Cohen-Gonsaud, M., Delolme, F., Bischoff, M., and Molle, V. (2012) A novel mode of regulation of the Staphylococcus aureus catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. J. Biol. Chem. 287, 43607–43619.

Lima, A., Durán, R., Schujman, G. E., Marchissio, M. J., Portela, M. M., Obal, G., Pritsch, O., de Mendoza, D., and Cerveñansky, C. (2011) Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J. Proteomics* 74, 1720–1734

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

Lu, J., Kovach, J. S., Johnson, F., Chiang, J., Hodes, R., Lonser, R., and Zhuang, Z. (2009) Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage-induced defense mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11697–11702.

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

Microbiology In Pictures. (2013). *Mycobacterium tuberculosis*. [Online] Available at: http://www.microbiologyinpictures.com/mycobacterium%20tuberculosis.

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

Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G. J., and Husson, R. N. (2011) The extracytoplasmic domain of the Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. PLoS Pathog. 7, e1002182.

Molle, V., and Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* 75, 1064–1077

Mun˜oz-Dorado, J., Inouye, S., and Inouye, M. (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of M. xanthus, a Gram-negative bacterium. Cell 67, 995–1006.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A. (2005). Medical Microbiology. Elsevier Mosby.

Narayan, A., Sachdeva, P., Sharma, K., Saini, A. K., Tyagi, A. K., and Singh, Y. (2007) Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function. Physiol. Genomics 29, 66–75.

Nova´kova´, L., Saskova´ , L., Pallova´ , P., Janecek, J., Novotna´, J., Ulrych, A. et al. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of Streptococcus pneumoniae and identification of kinase substrates. FEBS J. 272, 1243–1254.

Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boel, G., Iwanicki, A., Foulger, D. & Seror, S. J. (2000). Characterization of PrpC from Bacillus subtilis, a member of the PPM phosphatase family. J. Bacteriol. 182, 5634–5638.

Ortega, C., Liao, R., Anderson, L. N., Rustad, T., Ollodart, A. R., Wright, A. T., Sherman, D. R., and Grundner, C. (2014) Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr protein kinase B mediates an oxygen-dependent replication switch. PLoS Biol. 12, e1001746.

Ortiz-Lombardı´a, M., Pompeo, F., Boitel, B., and Alzari, P. M. (2003) Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. 278, 13094–13100.

Ortiz-Lombardia, M., Pompes, F., Boitel, B. & Alzari, P. M. (2003). Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. 278, 13094–13100.

Pandey, A. K., Raman, S., Proff, R., Joshi, S., Kang, C. M., Rubin, E. J., Husson, R. N., and Sassetti, C. M. (2009) Nitrile-inducible gene expression in mycobacteria. Tuberculosis 89, 12–16.

Parikh, A., Kumar, D., Chawla, Y., Kurthkoti, K., Khan, S., Varshney, U., and Nandicoori, V. K. (2013) Development of a new generation of vectors for gene expression, gene replacement, and protein-protein interaction studies in mycobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1718–1729.

Parish, T., and Stoker, N. G. (2000) Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement. Microbiology 146, 1969–1975.

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

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

Prigozhin, D.M., Papavinasasundaram, K.G., Baer, C.E., Murphy, K.C., Moskaleva, A., Chen, T.Y., Alber, T. and Sassetti, C.M. (2016) Structural and Genetic Analyses of the Mycobacterium tuberculosis Protein Kinase B Sensor Domain Identify a Potential Ligand-binding Site. J Biol Chem. 291(44), 22961-22969.

Punkvang, A., Hannongbua, S., Saparpakorn, P. and Pungpo, P. (2016) Insight into the structural requirements of aminopyrimidine derivatives for good potency against both purified enzyme and whole cells of M. tuberculosis: combination of HQSAR, CoMSIA, and MD simulation studies. J Biomol Struct Dyn. 34(5), 1079-1091.

Rajagopal, L., Clancy, A. & Rubens, C. E. (2003). A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in Streptococcus agalactiae reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. J. Biol. Chem. 278, 14429–14441.

Robinson, V. L., Buckler, D. R., and Stock, A. M. (2000) A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. Nat. Struct. Biol. 7, 626–633.

Roe, D.R., and Cheatham T..E III (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*. 9(7), 3084-95.

Sachsenmaier, C. (2001) Targeting protein kinases for tumor therapy. *Onkologie* 24, 346–355.

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

Shah, I. M., Laaberki, M. H., Popham, D. L., and Dworkin, J. (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. Cell 135, 486–496.

Silakari, O., Chand, S. and Bahia, M.S. (2012) Structural Basis of Amino Pyrimidine Derivatives for Inhibitory Activity of PKC-θ: 3D-QSAR and Molecular Docking Studies. Mol Inform. 31(9), 659-668.

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

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

Stock, J. B., Ninfa, A. J., and Stock, A. M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53, 450–490.

Székely, R., Wáczek, F., Szabadkai,I., Németh, G., Hegymegi-Barakonyi, B., Eros, D., Szokol, B., Pató, J., Hafenbradl,D., Satchell, J., Saint-Joanis, B., Cole, S.T., Orfi, L., Klebl, B.M. and Kéri, G. (2008) A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling. Immunol Lett. 116(2), 225-231.

Tomioka, H., Tatano, Y., Yasumoto, K. and Shimizu, T. (2008). Recent advances in antituberculous drug development and novel drug targets. Expert Review of Respiratory Medicine, vol. 2 (4), pp. 455-471.

Truong-Bolduc, Q. C., and Hooper, D. C. (2010) Phosphorylation of MgrA and its effect on expression of the NorA and NorB efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 2525–2534.

Truong-Bolduc, Q. C., Ding, Y., and Hooper, D. C. (2008) Posttranslational modification influences the effects of MgrA on *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 7375–7381.

Turapov, O., Forti, F., Kadhim, B., Ghisotti, D., Sassine, J., Straatman-Iwanowska, A., Bottrill, A.R., Moynihan, P.J., Wallis, R., Barthe, P., Cohen-Gonsaud, M., Ajuh, P., Vollmer, W. and Mukamolova, G.V. (2018) Two Faces of CwlM, an Essential PknB Substrate, in Mycobacterium tuberculosis. Cell Rep. 25(1), 57-67.e5.

Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., and Pieters, J. (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. Science 304, 1800–1804.

Wang, J., Li, C., Yang, H., Mushegian, A., and Jin, S. (1998) A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice. *J. Bacteriol.* 180, 6764–6768.

Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Graña, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez,P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cerveñansky, C., Cole, S. T., and Alzari, P. M. (2008) Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 193–202.

WORLD HEALTH ORGANISATION. (2018) Global Tuberculosis Report 2018 at: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

Yeats, C., Finn, R. D., and Bateman, A. (2002) The PASTA domain: a -lactam-binding domain. Trends Biochem. Sci. 27, 438.

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

Young, T. A., Delagoutte, B., Endrizzi, J. A., Falick, A. M., and Alber, T. (2003) Structure of Mycobacterium tuberculosis PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. Nat. Struct. Biol. 10, 23.

Zakharevich, N.V., Osolodkin, D.I., Artamonova, I.I., Palyulin, V.A., Zefirov, N.S. and Danilenko, V.N. (2012) Signatures of the ATP-binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria. Proteins. 80(5), 1363-76.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Samet Ay

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 02/07/1985

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (kurum ve yıl):

Lise: Diyarbakır Rekabet Kurumu Cumhuriyet Fen Lisesi 1999-2002

Üniversite: Ege Üniveristesi Eczacılık Fakültesi 2002-2006

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Samet AY
ÖĞRENCİ NO	11803011
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROTEİN KİNAZ B'NİN SİNYAL İLETİMİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER MODELLEME YAKLAŞIMLARIYLA ARAŞTIRILMASI
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma SınavıSonrası
SAYFA SAYISI	39
BENZERLİK ORANI	%4
RAPORLAMA TARİHİ	24/07/2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 39 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 % 4 '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.

Samet AY
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.