

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÜNLÜ

**BOĞMACA TOKSİNİ BAĞLAMINDA ADP
RİBOZİLASYONU MEKANİZMASININ KURAMSAL VE
DENEYSEL METOTLARLA İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatih DALLAR

EDİRNE – 2020

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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÜNLÜ

**BOĞMACA TOKSİNİ BAĞLAMINDA ADP
RİBOZİLASYONU MEKANİZMASININ KURAMSAL VE
DENEYSEL METOTLARLA İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatih DALLAR

Destekleyen Kurum:

Tez No:

EDİRNE – 2020

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTİSİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÜNLÜ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Fatih Dallar tarafından tez başlığı “Boğmaca Toksini Bağlamında ADP Ribozilasyonu Mekanizmasının Kuramsal ve Deneysel Metotlarla İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı / /2020 yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÜNLÜ
ÜYE

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Suat ÇAKINA
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÖR

Tezimin belirlenmesinden bitimine kadar rehberliğini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Tammam SİPAHİ'ye, Prof. Dr. Muhammed Bektaş'a ve Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÜNLÜ'ye, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
BOĞMACA.....	3
PROTEİNLERİN YAPISI VE YAPI TAHMİN ÇALIŞMALARI.....	4
PROTEİNLERİN 3 BOYUTLU YAPI ANALİZİ.....	5
PROTEİN-PROTEİN/LİGANT/MOLEKÜL ETKİLEŞİM HESAPLAMALARI..	6
PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİ.....	6
BOĞMACA (PERTUSSİS) TOKSİNİ.....	7
PROTEİN SENTEZİ.....	9
tRNA'LARIN KENDİNELERİNE ÖZGÜN AMİNO ASİTLER İLE YÜKLENMELERİ.....	10
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	16
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA.....	38
SONUÇLAR.....	40
ÖZET.....	42
SUMMARY.....	43
KAYNAKLAR.....	44
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	50
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ADPRT	: ADP-Ribozilleyen Toksinler
ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
AMP	: Adenozin Monofosfat
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Arama Araç (Basic Local Alignment Search Tool)
CPU	: Merkezi İşlem Ünitesi (Central Processing Unit)
CHARMM	: Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dH₂O	: Distile Su
eEF2	: Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2
FA	: Fragment A
FASTA	: DNA – Protein Dizisi Arama Format
FB	: Fragment B
FBS	: Fetal Bovine Serum
FFT	: Hızlı Fourier Dönüşümü (Fast Fourier Transform)
GPU	: Grafik İşleme Ünitesi (Graphics Processing Unit)

kDa	: Kilodalton
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit (Messenger RNA)
NAD	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NAMD	: Moleküler Dinamik Programı (Not Another Molecular Dynamics Programme)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PARPS	: PoliADP Ribozilleyen Enzimler
PC	: Kişisel Bilgisayar (Personal Computer)
PDB	: Protein Veri Bankası (Protein Data Bank)
PT	: Pertussis Toksin
RMSD	: Etkin Değer Sapması (Root Mean Square Deviation)
TEMED	: Tetrametil – etilendiamin
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit (Transfer RNA)
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV	: Ultraviyole
1S5E	: Kolera Toksini
1TOX	: Difteri Toksini

GİRİŞ VE AMAÇ

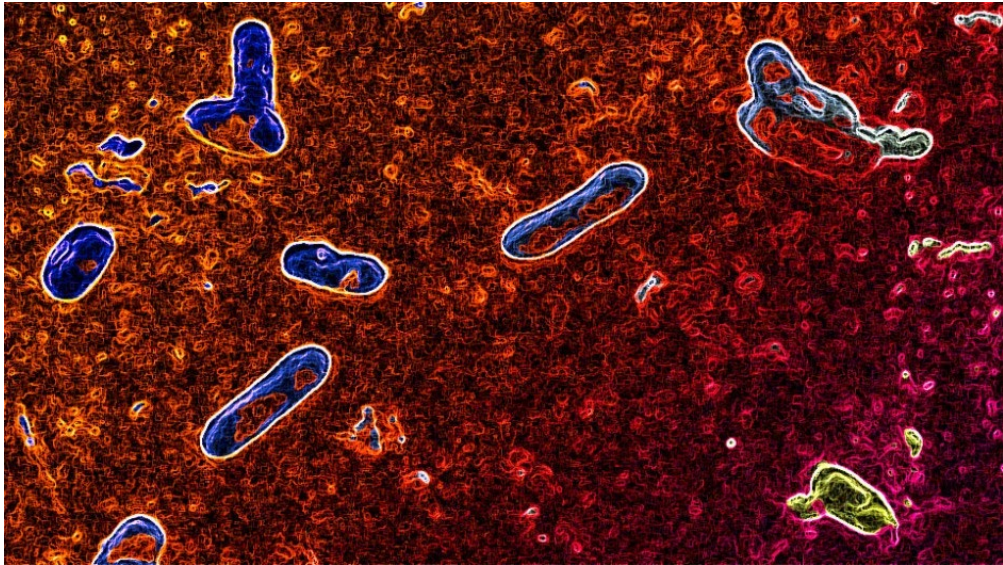
Boğmaca, akciğerler ve hava yollarında yüksek bulaşıcılığa sahip, bebekler ve çocuklarda yaygın şekilde görülen ve insan patojeni olarak Bordetella pertussis'in sebep olduğu bir bakteri enfeksiyonudur. Etkin ve güvenli bir aşısı olduğu halde büyük çocuk ve erişkinlerde hala boğmaca görülmektedir. Enfekte olan bireylerin çoğunda boğulma sesine benzer bir nefes alımının ardından şiddetli bir öksürük nöbeti ile kendini gösterir. Hastalık etkeni olan pertussis toksin ADP-Ribozilleyen ölümcül bir toksin ailesine aittir. ADP-ribozilleyen toksinler; mono(ADPRT) önemli ilaç hedefli toksin ailesidir. ADPRT'ler NAD^+ tanıdığı bilinsede bu iki farklı motifin herhangi bir yapısal benzerliği olup olmadığı, NAD^+ bağlanmasına katkı sağlayan kilit güçler/parçaların ne olduğu ve aynı ya da farklı NAD^+ uygunlukları tanıyıp tanımadıkları konusunda çalışmalar devam etmektedir. Bu toksin ailesi farklı sekans kimliği olmasına karşın, ortak motif gibi bir biçimi olan üç boyutlu benzer bir yapı paylaştıklarını, bunların bağ kuvvetleriyle NAD^+ nikotinamid halkasıyla çoğunlukla etkileşime girdiklerini tahmin edilmektedir. Bu bölgesel ve yapısal olarak korunmuş halka benzeri konformasyonda nikotinamid mononükleit parçasını bağlar. Poli(ADP-ribozilas)yon işlemi, ADPRT'ler tarafından yürütülen sentez sonrası modifikasyondur. Bu toksinler, bir dizi mono(ADP-ribozil) molekülünün "akseptör" proteinlere transferini gerçekleştirir. ADPRT'ler NAD^+ 'in nikotinamid ve ADP-riboz'a ayrılmasını katalize eden enzimleri metabolize eder ve ADP-ribozun hedef proteine transferini sağlar. Bu mekanizmanın anlaşılması oldukça önemlidir. Örneğin difteri toksini grubu toksinler ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF2)'yi bu mekanizmayı kullanarak inhibe ederler ve protein sentezini durdururlar. ADPRT'ler ile PARP'ların yapılarının iyi anlaşılabilmesi inhibitör tasarımları için oldukça önemlidir ve bu enzimlerin üç boyutlu yapılarının belirlenmesi gelecekteki ilaç tasarımlarında oldukça önemli olacaktır. Bu çalışmada katalizleme reaksiyonları sırasında ADPRT'in bir üyesi olan pertussis toksininin NAD^+

substratını nasıl tanıdığını, substratı tanıyan motifin üç boyutlu yapısını belirlemeyi, bu ortak motifin etkileşim arayüzünün, bağlanma enerjileri yüksek sıcak noktalarını kuramsal ve deneysel yöntemlerle araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

BOĞMACA

Boğmaca, üst üste gelen inatçı ve spazmodik öksürük nöbetleri ile karakterize akut bir solunum yolu enfeksiyonudur. Bordetella Pertussis (Şekil 1) için doğal yaşam alanı insan solunum yolu mukozasıdır. İlk olarak 1414 yılında Fransa’da ortaya çıkmış olan boğmaca, şiddetli öksürük anlamına gelen “pertussis” olarak isimlendirilir hastalığa sebep olan etken 1906 yılında keşfedilmiştir (1). Organizmanın hasta olmasına sebep olan şey, kapsül (kokobasil) şeklinde bir bakteri yol açar. Bu bakterinin 9 çeşidi olmasına karşın birkaçı insanlarda hastalık yapar. Bu türlerden biri Bordetella pertussis (Boğmaca)’tir. Bordetella parapertussis ve bronchiseptica bakterileri ise boğmacaya benzer, fakat hafif geçen bir hastalığa yol açmaktadır.



Şekil 1. Bordetella pertussis

Boğmaca hastalığı için ne doğal bağışıklık ne de aşılama ömür boyu koruyuculuk sağlamaz. Aşılamadan 3-5 yıl sonra koruyuculuk azalmaya başlar ve yaklaşık 12 yıl sonra tamamen biter. Pertussis bakterisinin yüzey proteinleri sayesinde gerçekleşen ve birinci aşama olan üst solunum yolu hücrelerine tutunur, hastalık antibiyotiklerle kontrol altına alınabilir. İkinci aşamasına bakterinin salgıladığı bazı toksinler yol açar. Dünyada her yıl yaklaşık olarak 50 milyon civarında insanı etkiler ve 300 bin insanın ölümüne sebep verir. Pertussis hastalığı gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülmektedir. 70 yıldandır boğmacaya karşı aşilar yapılmaktadır fakat son yıllarda hastalığın görülme oranı artmıştır ve dikkatler yeniden bu hastalığın karşı yönelmiştir. 1980 yıllarından sonra bu hastalık artış göstermiştir. Boğmaca daha çok çocukları etkilemektedir fakat son yıllardaki ciddi artışlar olmuştur ve erişkinlerde de sıklıkla görülmeye başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) her yıl yaklaşık 51 milyondan fazla boğmaca olgusu görüldüğünü, bunların yaklaşık 600 binden fazlasının ölümle sonuçlandığını ve tümünün aşısız çocuklar olduğunu bildirmektedir (2). Son yıllarda aşılama yüksek oranlarda yapılmasına karşın yine de artış eğilimi göstermiştir, boğmacaya karşı yapılan bu mücadelede daha farklı yöntemler geliştirilmesini gerektirmiştir. Hastalığa yol açan bakterinin ve onun sentezlediği toksinin daha iyi anlaşılması ve bunun için yeni tür aşilar yapılması gündeme gelmiştir.

PROTEİNLERİN YAPISI VE YAPI TAHMİN ÇALIŞMALARI

DNA genetik kodu mevcut olup ribozomlar üzerinde sentezlenen toksin, enzim, vb. bütün biyolojik moleküller protein yapıdadırlar ve üç boyutlu katlanmaları öncesi aynı yöntemlerle sentezlenir. Her protein kendine özgü benzersiz bir amino asit dizisine sahiptir. Birincil yapı proteinlerin üç boyutlu yapısı gibi fonksiyonel değildir. Bir proteinin birincil yapısının oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan, peptid bağlarıdır ve proteinleri meydana getiren polipeptid zincirinin bir ucu amino terminal uç veya N-terminal uç, diğer ucu karboksil terminal uç veya C-terminal uç olarak isimlendirilir. Proteinlerin dizi bilgisinden oluşan birincil yapı tahmini DNA dizisinden yararlanılarak belirlenmektedir. Benzeşen gen veya protein dizilerini araştırmak için dünya çapında bilgisayar ağından yararlanılır. Belirli bir veri bankası seçilerek istenilen dizi bu siteye gönderilir ve sonuçlar veri tabanındaki kayıtlı diziler ile karşılaştırılarak saniyeler içinde araştırmacıya sunulur. Genelde gönderilen diziler BLAST veya FASTA formatı denilen popüler iki dizi araştırma programına uygun olmalıdır.

Proteinlerin birincil yapısı yani polipeptid zinciri omurgası oluşur oluşmaz, özgün diziliş sırasındaki amino asit dizilerinin R- yan gruplarından uzanan özel kimyasal gruplar, özgün

katlanmalar oluştururlar. Proteinler için, gelişigüzel kıvrılma, α -sarmal yapısı β - kırmalı tabaka ve β -bentler yapısı olmak üzere dört değişik ikincil yapı vardır. Bu yapılara kararlılık kazandıran aynı polipeptid zinciri üzerinde kurulan H köprüleridir ve kararlı yapı göstereni α -sarmal katlanmasıdır. İkincil yapı tahmini yöntemleri α ve β katlanmaları proteinin aminoasit dizisinden oluşturmaya çalışır. Pauling metotları kullanılarak birincil diziden α ve β katlanmalarının tahminini doğru bir şekilde yapmayı başarmasından sonra sekonder yapı tahmin yöntemleri oldukça geliştirilmiştir. Proteinlerin üç boyutlu yapı tahmin yöntemlerinde oluşturulan ikincil yapı modellerinden yararlanılır. Bir kuramsal protein modelleme tekniği olan homoloji modelleme metodu ile elde edilen üç boyutlu yapının doğruluğunun kontrolü içinde önem teşkil eder. İkincil yapının tahmininde Fred Cohen'in geliştirdiği yöntem ile doğruluk oranı % 85'e çıkmış olması üç boyutlu yapı tahminlerinde oldukça kolaylık sağlamıştır.

İkincil yapıyı kazanmış protein yapıları, üst üste katlanarak, sarılarak veya kendi etrafında kıvrılarak yuvarlak ya da elipsoid şekiller oluşturarak üçüncül yapıyı meydana getirirler. Birincil yapıda birbirinden uzakta bulunan amino asitler, üçüncül yapıda yan yana gelebilirler. Üçüncül yapı, proteinin fonksiyonel karakterini belirler. Üçüncül yapı, amino asit yan zincirleri arasındaki H bağları, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler, disülfid bağları ve Van der Waals etkileşimleri tarafından kurulur. Birincil, ikincil ve üçüncül yapıları bulunan olipeptid zincirlerinin non-kovalent bağlarla bir arada tutulması ile oluşan yapıya dördüncü yapı denir. Dördüncü yapı, alt birimlerin R yan zincirleri arasındaki hidrojen bağları, iyonik bağlar, hidrofobik etkileşimler, disülfid bağları ve van der waals etkileşimleri tarafından kurulur.

PROTEİNLERİN 3 BOYUTLU YAPI ANALİZİ

Proteinlerin 3 boyutlu yapılarının çözülmesi için deneysel ve kuramsal yöntemler kullanılır. Bu analiz şeklinde daha önceden deneysel olarak elde edilen veriler bir veri tabanına yüklenir. Veri tabanında biriken bu bilgiler bilgisayar ortamında geliştirilen simüstasyon programlarında işlenerek proteinlerin yapı tahminlerinin gerçekleştirilmesinde kuramsal bilgi olarak elde edilir. Deneysel yöntemlerin eksiklikleri nedeniyle teorik yöntemlere de gerek duyulmaktadır. Kuramsal yöntemler, proteinlerin üç boyutlu yapısını belirlemenin ötesinde belirli bir işlev için gerekli belirli bir yapıyı öngörme potansiyelini de taşıdığından daha da önemli hale gelmektedir.

Proteinlerin 3 boyutlu yapısını belirleyen kuramsal yöntemler üç ana başlıkta incelenebilir.

- a) Ab initio Modelleme
- b) Katlanma Tanıma Modellemesi (Fold Recognition Modelling)

c) Benzeşim Modelleme (Homology Modelling)

Bu üç yöntemden en çok birincil dizileri üç boyutlu yapıları ile veritabanları aracılığı ile karşılaştıran benzeşim modellemesi tekniği kullanılır. Veri tabanları gün ve gün bilgi kapasitelerini arttırdıkça bu yöntemin başarı olanı giderek artmakta yapay zeka teknolojisinin de gelişmesi ile oldukça umut vaat etmektedir.

PROTEİN-PROTEİN/LİGANT/MOLEKÜL ETKİLEŞİM HESAPLAMALARI

Biyolojik dünyada ve ilaç geliştirme sektöründe oldukça gelecek vaat eden bir uygulama alanıdır. Gelişen CPU/GPU teknolojisinin son yıllarda giderek artmasına paralel olarak geliştirilen yapay zeka teknolojisi sayesinde bu alan gelecek yıllarda daha da gelişeceği kesindir. Ülkemizin bu alanda yetişmesi gereken insan gücünde her geçen gün ülkeler arası teknoloji savaşı içinde olmasa olmazlar arasına girmiştir. Bu alanda molekül geliştiren birçok firma kendi patent aldıkları bir çok molekülün atomik dosyalarını başka bilim insanlarının kullanımına açmışlar ve böylelikle elde edilmiş olan moleküller birçok laboratuvar ortamında denenebilir hale gelmiştir. Bu çalışmalarda moleküllerin deneysel çalışmalar öncesi para/zaman israfını önleyip moleküller için bir öngörü kazandıran son yıllarda önemi giderek artan moleküler docking (moleküler demirleme) çalışmalarıdır. Bu alanda kişisel PC'ler üzerinden sunucu(server)'lara veri aktararak yapılan çalışmaların yanında, kişisel PC, workstation gibi yüksek hızlı işlemcilerle sahip makinalarda çalışma yapmak mümkündür. Ülkemizde bu alandaki çalışmaları desteklemek için TÜBİTAK bünyesinde bulunan ulusal bilgi ağı TR-DATA GRID sistemi mevcut olup tüm kullanıcılara açıktır.

PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİ

Son yıllarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte yapılan genom çalışmalarında farklı organizmaların gen sayıları karşılaştırıldığında protein etkileşimleriyle orantılı olmayan sonuçlar görülmüştür. Örneğin, 2008 yılında Stumpf ve ark. larının yapmış olduğu bir çalışmada insanın sahip olduğu gen sayısı yaklaşık 24,000 iken, meyve sineği yaklaşık olarak 14 bin gene sahip, yani insan gen sayısı meyve sineğine göre 2 kat bile değildir. Çalışma sonunda, insan genomu, diğer basit canlılardan fmeden farklı olduğumuzu açıklanmasında yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada, insanın tek hücreli bira mayasına göre 20 kat basit bir meyve sineğine göre ise yaklaşık 10 kat daha fazla protein etkileşimine (protein interactions) sahip olduğu göz önüne serilmiştir. Bunun gibi çalışmalar sonucu vücuttaki toplam protein etkileşim sayısını “insan

genomu” isimlendirilmesine benzer bir şekilde “insan interaktomu (human interactome)” olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. İnsan interaktomu

Vücudumuzdaki birçok biyolojik olay, proteinlerin birbirleri ile bağlanıp-ayrışmaları sonucunda gerçekleşmektedir. Protein-protein etkileşimleri özetleyecek olursak

- a) Antikor/antijen bağlanmaları
- b) Sinyal iletimi
- c) Enzim/substrat ilişkisi
- d) RNA/DNA sentezlenmesi
- e) Hormon/reseptör ilişkisi
- f) Maddelerin hücre içinde taşınması bunlar arasında sayılabilir.

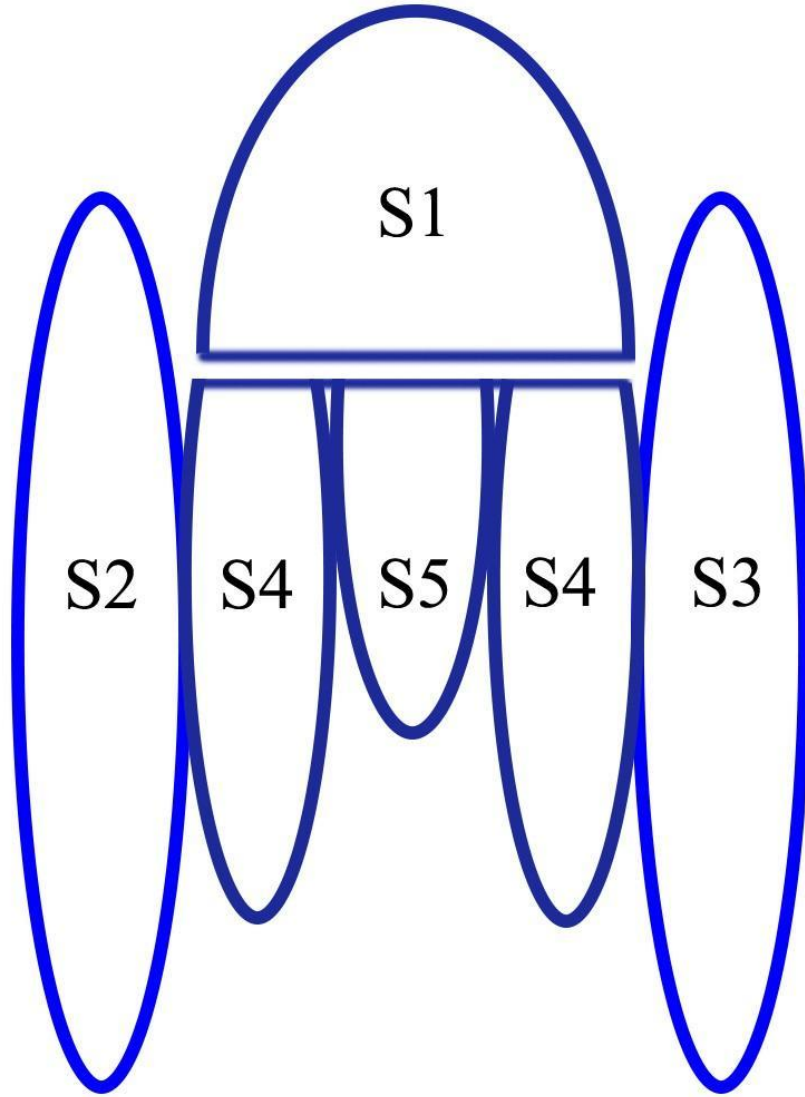
Protein-protein etkileşimlerini proteinin yoğunluğu, proteinin yüzeyindeki amino asitlerin bağlanma özgülüğü ve bağlanma afinitesi gibi bir çok parametre etkiler Proteinler arasında etkileşimleri incelemek için deneysel ve kuramsal metodlar kullanılır. Deneysel ve kuramsal metodlardan elde edilen sonuçlardan protein etkileşim haritaları çıkarılır.

BOĞMACA (PERTUSSİS) TOKSİNİ

Pertussis toksini (PT) Bortedella pertussiden izole edilerek saflaştırılmış bir toksindir ve hastalığın enfekte olduktan sonra konakçı üzerinde ilerlemesinden sorumludur. Adenilat siklaz sistemini aktifleştirerek cAMP derişimini artırır. A ve B olmak üzere iki alt birimden oluşur. A kesimi 28.000 Da molekül ağırlığına sahip olup, ADP ribozillenme mekanizmasında rol oynar. PT, hücre yüzeylerine bağlanmasından (B) ve katalitik aktiviteden (A) sorumlu olan fonksiyonel

olarak farklı alanlar içeren, A-B toksin sınıfına aittir. Toplam 105 kDa olan beş farklı alt birimden (S1, S2, S3, iki kopya S4 ve S5) (Şekil 3) oluşan bir hegzamerik proteindir. A bileşeni (S1 alt birimi), bu ailenin başka bir üyesi olan kolera toksinin A-alt birimi ile yaklaşık % 20 dizi benzerliği paylaşmaktadır. B bileşeni, kalan beş alt birimden oluşur. S2 ve S3'ün amino asit dizileri % 70 oranında özdeştir (3).

PT, bağışıklık sisteminde bulunan ve önemli görevi olan lenf hücrelerinin (lenfosit) çalışmasını engeller. Aynı zamanda pankreastaki insülin salgılayan hücrelerini de etkileyerek hipoglisemiye (kan şekerinin düşmesi) sebep olur. PT, solunum yolunda bulunan hücrelerinin çalışmasını etkileyerek bunların aşırı salgı üretmelerine neden olur ve boğulurcasına öksürük oluşmasına sebebiyet verir. Pertussis bakterisinin ayrıca adenilat siklazdır toksini de üretir. Bu toksin, bakterilerin hücrenin içine girmesine yardımcı olur. Bu toksin ayrıca, istila ettiği konakçının bağışıklık sistemine de hasar verir. Dermonekrotik toksini, etkilediği bölgede iltihaplanma ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne neden olur. Fareler üzerinde verildiğinde dermonekrotik toksin, çok güçlü damar kasıcı etkisi yaparak onların ölümüne sebep olmuştur. Solunum yolu hücrelerinde Pertussis bakterisi çoğalmaya başlayınca trakeal toksin adı verilen bir molekül salgılamaya başlar. Bu toksin, solunum yolu hücrelerinin yapması gereken işlevini bozarak hava yollarında oluşan salgıların dışarı atılmasını engeller ve öksürüğe sebep olur. Aynı zamanda, IL-1 (interlökin) üretimini artar bu da ateşe sebep olur. Toksin alt birimlerini kodlayan genler, Bordetella parapertussis ve Bordetella bronchiseptica genomlarında bulunurken, toksini sadece Bordetella pertussis üretir ve salgılar.



Şekil 3. Pertussis toksin alt birimleri

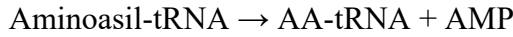
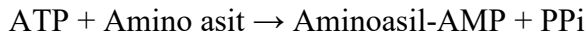
PROTEİN SENTEZİ

Protein sentezi, genlerdeki genetik bilginin ribozomlardaki proteinlere dönüşme sürecidir ve iki ana basamakta gerçekleşmektedir. Sentez başlamadan önce DNA'daki bilginin haberci RNA (mRNA) moleküllerine aktarılması ile (transkripsiyon) gerçekleşir. Transkripsiyonu takiben mRNA'daki bilginin ribozomlarda polipeptid zincirlerine dönüşmesi ile protein sentezi (translasyon) gerçekleşir. Ancak oluşan polipeptid zincirleri aktif hale geçmeden önce çeşitli katlanma aşamalarından geçerek uygun üç boyutlu yapıyı alırlar. Üç boyutlu yapısını ulaşamayan bir protein fonksiyonel hale gelmemiş demektir. mRNA'da dört çeşit nükleotidin üçlü gruplar halinde bir araya gelmesi ile 64 kodon oluşur. Bunlardan 3' ünün aminoasit karşılığı yoktur. Kalan 61 kodon 20 amino asidi belirler. Protein sentezi ribozomlarda gerçekleşir. mRNA'daki kodonların

tamamlayıcısı olan tRNA'daki antikodonları etkileşirken 3'-OH uçlarında taşıdıkları amino asitler polipeptid zincirine eklenir. mRNA'lar 5' den 3' yönüne doğru okunurlar polipeptid zincirleride amino ucundan karboksil ucuna doğru sentezlenirler. Protein sentezi; tRNA'ların kendilerine özgü amino asitler ile yüklenmeleri, başlama evresi, uzama evresi ve sonlanma evresi olmak üzere 4 aşamada gerçekleşir.

tRNA'LARIN KENDİLERİNE ÖZGÜN AMİNO ASİTLER İLE YÜKLENMELERİ

Doğru kodlanmış bir amino asitin polipeptit zincirine katılması, tRNA'ların özgün amino asitler ile yüklenmeleri aminoasil tRNA sentetaz (AA – tRNA) adı verilen bir grup enzim tarafından gerçekleşir. İlk aşamada, amino asit, aminoasil AMP sentetaz ara ürünü vermek üzere ATP ile tepkimeye girerek aktifleşir. Aktif hale geçen amino asit daha sonra tRNA'nın 3' ucuna bağlanır. Enzim, bu aşamada son derece seçicidir herhangi bir yanlışlık durumunda aminoasil-AMP'nin, tRNA'ya bağlanmak yerine hidrolizi gerçekleşir.



Başlama Evresi

Protein sentezi mRNA'nın protein şifreleyen bölümü olan sistronun başında bulunan AUG kodonu ya da eşdeğer kodonlardan biri üzerine başlar. Ribozomun küçük alt birimi, AUG başlangıç kodonuna bağlanır. Başlangıç faktörlerinin etkisi altında mRNA'nın ve özgül başlatıcı amino grubuna HCO-(formil) takılı metiyonin taşıyan tRNA molekülüde (fMET- tRNA) küçük alt birimine bağlanır. Büyük alt biriminde biriminde bu komplekse katılması ile başlama evresi sona erer.

Uzama Evresi

Uzama (elongasyon) evresinde, tRNA'ların taşıdığı polipeptit zincirine yeni bir amino asitin eklenmesi ile ribozom 3'-OH yönünde bir kodonluk kayma hareketi gerçekleştirir. Ribozom üzerinde 3 tane tRNA bağlama bölgesi bulunmaktadır. P (peptidil), A (aminoasil), E (Çıkış) bölgeleri olarak tanımlanırlar. Ribozoma bağlanan her yeni AA-tRNA önce A bölgesine yerleşir. A bölgesinde bulunan kodon, hangi AA-tRNA'nın bu bölgeye yerleşeceğini belirler. AA-tRNA, GTP ile bağlanmış bir uzama faktörü varlığında ribozoma getirilir. Uzama faktörleri, prokaryolarda EF-Tu, ökaryotlarda eEF-1 α ve eEF-2 dir. A bölgesindeki kodonun tamamlayıcısı antikodonu taşıyan AA - tRNA'nın bu bölgeye bağlanması üçlü komplekste bulunan GTP hidrolizini ve GDP

bağlı uzama faktörünün ayrılmasını uyarır. Uzama faktörünün ribozomdan ayrılması ile P yerinde bulunan başlatıcı metyonil tRNA'nın α -COOH grubunun tRNA ile bağlantısı (ester bağı) çözülür ve ikinci aminoasidin α -NH₂ grubu ile peptid bağı oluşur. Bu şekilde bir kimyasal bağı diğerine değişmesine peptidil transferaz tepkimesi denir. Bundan sonraki evreye translokasyon adı verilir. Ribozomun yapısındaki bir değişimle mRNA boyunca 5' den 3' yönüne doğru bir kodonluk kayma hareketi meydana gelir. Bu aşamada, peptidil tRNA A bölgesinden P bölgesine, deasile tRNA'da P bölgesinden E bölgesine aktarılır. Ribozom A bölgesi boş ve P bölgesinde peptidil tRNA bağlı kalır. A bölgesine yeni bir aminoasil tRNA'nın bağlanması E bölgesinden deasile tRNA'nın ayrılmasını uyarır. Peptidil transferaz ve translokasyon tepkimelerinin ardışık olarak sürmesi ile polipeptid zinciri uzamaya başlar.

Sonlanma Evresi

Bu aşama sentezi biten polipeptidin serbest kalması için gerekli tepkimeleri kapsar. UAA, UAG ve UGA anlamsız, sonlandırıcı kodonlardır. Bu kodonlardan biri ribozomun A yerine geldiği zaman bu yere artık yeni bir aminoasil tRNA bağlanamaz. Prokaryotlarda bitiş kodonlarını tanıyan RF-1 ve RF-2 olarak bilinen iki sonlandırma faktörü bulunur. RF-1, UAA veya UAG'yi tanır. RF-2 ise UAA veya UGA'yı tanır. Ökaryotlarda her üç sonlandırıcı kodonu tanıyan tek sonlandırma faktörü (eRF-1) bulunur. Sonlandırma faktörü A bölgesindeki bitiş kodonuna bağlanarak P bölgesindeki polipeptid ve tRNA arasındaki bağı hidrolizini uyarır. tRNA serbest kalır. mRNA ve ribozom altbirimlerinin ayrışması ile protein sentezi sonlandırılır.

Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 (eEF2)

İnsanda ökaryotik elongasyon faktörü 2 (eEF-2), 97 kDa ağırlığında, 857 aminoasitlik tek bir polipeptid zincirinden oluşur. eEF-2'yi kodlayan gen 19.kromozomda yerleşmiştir (19p34). İzoelektrik noktası 6,4–6,6 arasında değişir. eEF-2 GTPaz etkinliğine sahiptir. Yapısında, N terminale yakın bulunan GDP/GTP'nin bağlanabildiği G' bölgesi, ribozom ve toksinler ile etkileşen özgün bölgeler vardır. Türler arası yüksek homoloji gösteren eEF-2 protein sentezindeki uzama aşamasından sorumlu element olup peptidil tRNA'nın translokasyonunu katilizler. Protein sentezi sürecinde uzamakta olan peptid zinciri, ribozomdaki P yerine peptidil-t-RNA olarak bağlı bulunmaktadır. Peptidil-t-RNA'nın karboksil gurubu, ribozomun A yerine yerleşmiş olan aminoasil tRNA'nın amino gurubu ile etkileşir. eEF-2, GTP varlığında ribozoma bağlanarak etkinlik enerji engelini azaltıp, peptid zincirinin P yerinden A yerine aktarılmasını ve ribozom içinde mRNA'nın bir kodon boyunca kaydırılmasını katalizler. Böylece ribozomun A yeri, yeni bir

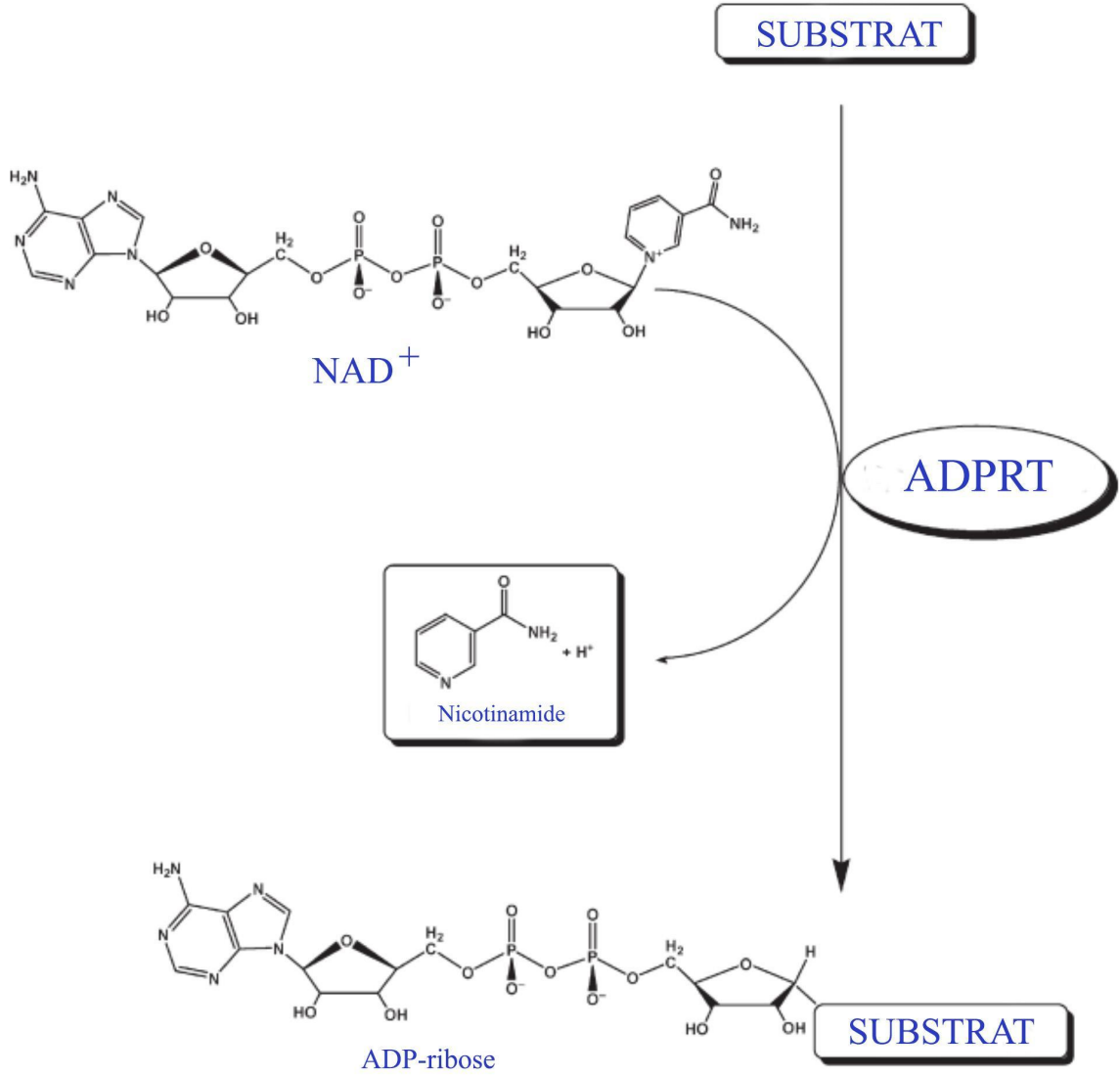
aminoaçıl tRNA için serbestleşmiş olur. Diğer taraftan taşıdığı amino asidi, uzamakta olan polipeptid zincire aktaran tRNA, translokasyon sonunda ribozomdaki E yerinden ayrılır.

eEF-2'nin ADP ribozillenme ve fosforillenme gibi sentez sonrası değişikliklere uğrar. ADP ribozillenme NAD varlığında enzim aracılığı ile ya da enzim etkisi olmaksızın gerçekleşir Tek bir eEF-2 molekülüne bir tane ADP riboz grubu bağlanır. Difteri toksininin katalitik parçası, FA, NAD'ı ADP-riboz kaynağı olarak kullanır. FA endositozla hücreye geçtikten sonra ADP-ribozil transferaz etkinliği ile hedef proteinleri olan $G\alpha$, Rac/Rho, aktin ve eEF-2'ye ADP ribozili aktarır . Çevirim sonrası değişiklik sonucu eEF-2'nin yapısındaki histidin, diftamide dönüşür. Yapısında taşıdığı diftamid ile eEF-2, difteri toksini gibi ADP riboziltransferaz etkinliğine sahip toksinlerin substratı haline gelir. Nikotinamidin ayrılması sonucu diftamid ortaya çıkan oksakarboniyum iyonu arasında elektrostatik bir çekim oluşur ve toksinin katalizlediği geri dönüşümsüz olan ADP-ribozillenme tepkimesi tamamlanır. Böylece eEF-2 ADP-ribozillenerek etkinliğini yitirir ve protein sentezinin polipeptid uzama aşaması durur. Protein sentezi durması sebebiyle hücre ölümü gerçekleşir.

ADP-Ribozillenme

ADP ribozillenme poli-ADP ribozun memeli hücre çekirdeğinde bulunduğu Dr.Poul Mendel tarafından göstermesiyle 1963 yılında tanımlanmış, Dr. R.J. Collier ve Dr. A. M. Papanheimer NAD'nin hücre dışı sistemlerde protein sentezinin inhibisyonu için kesinlikle gerekli olduğunu ve özellikle difteri toksinin eEF-2'yi inhibe ettiğini gösterilmiştir. Aynı zamanda NAD'nin eEF-2 inaktifleşmesini önlediği veya geri dönüştürebildiği bildirilmiştir (4). ADP ribozillenme, NAD'nin bir ya da birkaç ADP riboz grubunun alıcı proteine aktarılmasıyla riboz ile bir aminoasit arasında N-veya O-glikozid bağlarından birinin oluşmasını kapsar. Memelilerdeki ADP riboziltransferazlar NAD'den ADP riboz grubunun akseptör proteindeki arginine transferini kataliz ederler. Bununla beraber; ADP-ribozil arginin hidrolazlar serbest arginin yeniden oluşturarak ADP ribozu uzaklaştırırlar ve ADP ribozillenme döngüsü tamamlanır (5).

ADP-ribozillenme mekanizması hem vücudumuz tarafından üretilen enzimler tarafından (Poli ADP-riboz polimerazlar (PARP) hemde ölümcül bir toksin sentezleyen bir aile olan ADP-Ribozilleyen toksinler (ADPRT) tarafından kullanılır. ADPRTler ve PARPlar nikotinamid adenin dinükleotid'i katalizleyen1 iki ana sınıftır. Bunlar NAD'ın nikotinamid ve ADP-riboz'a ayrılmasını katalize eden enzimleri metabolize eder ve ADP-ribozun hedef proteine transferini sağlar (Şekil 4).

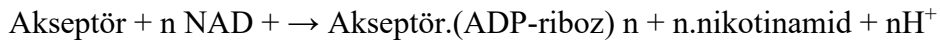


Şekil 4. ADP-riboz katalizleme mekanizması

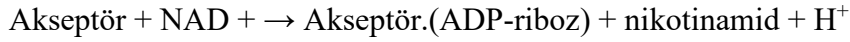
PARPlar çoğu ökaryotta bulunan enzimlerdir ve post-translasyonel protein modifikasyonlarında işlev gördükleri bilinmektedir. Burada ADP-riboz parçası NAD'tan belirli substratlara transfer edilir. İnsan genomunda on yedi putatif PARP sekansı belirlenmiştir, bunların arasında en azından altı enzim vardır: PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, PARP-5a (—ankyrase-1, TNKS-1), ve PARP-5b (tankyrase-2, TNKS-2) (6-9) . Genom korumasında, transkripsiyonal düzenlemede, DNA hasar sensörlerinde ve onarımında, enerji metabolizmasında, hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında, apoptosiste görev alırlar (10). PARP'ların aşırı aktivasyonu hücredeki NAD⁺ ve ATP'nin tüketilmesine neden olur ve iltihaplı yaralara, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve sonunda nekrotik hücre ölümlerine yol açabilir. PARP-1 yıkılmış farelerin normal

bir şekilde geliştikleri görülmüştür, bu da PARP-1'in yaşam için çok gerekli olmayabileceği fikrini vermektedir (11). PARP'ların fazla sentezlenmesi yaşayabilirliğe kanserli hücrelerin genotoksik stres ve DNA'ya zarar veren etmenlere direnci sayesinde bağlanmıştır. PARPların inhibisyonu antikanser terapilerinin etkilerini arttırabilir. Bunu kanser hücrelerinin DNA hasarlarını onarması ve böylece apoptosis yükseltmesiyle yaparlar (12-16). Son zamanlarda metastatik melanoma (17-18) için ,göğüs kanseri ve yumurtalık kanseri (19) gibi güçlü PARP inhibitörlerin faz II denemeleri tamamlanmıştır (20). Bu yüzden PARPlar iltihap, dejeneratif ve vasküler hastalıklar, işemiya ve kanser terapisine yönelik ilaç geliştirmelerinde gelecek vaat eden hedeflerdir (21-22). Hücrelerde mono ve poli ADP ribozil transferazlar tarafından katalizlenen 2 tip tepkime bulunmaktadır. Bu tepkimeler sadece hücresel konumları açısından değil, transfer edilen ADP riboz birimlerinin sayısı ve ADP-ribozil grubunun bağlandığı kalıntı (N-glikosit ya da O glikosit) açısından farklılık gösterir. Poli (ADP-ribozil) lenme ve mono (ADP-ribozil)lenme tepkimeleri aşağıda gösterilmiştir.

poli ADP-ribozillenme:



mono ADP-ribozillenme:



Mono ADP - Ribozillenme

Mono ADP ribozillenme, sentez sonrası bir modifikasyon olup NAD'nin ADP riboz grubunun bir akseptör protein veya aminoaside eklenmesini kapsar. Bu tepkime mono ADP riboziltransferazlar tarafından katalizlenir. Mono ADP ribozil transferazlar prokaryotlardan ökaryotlara kadar birçok organizmada bulunur. Mono ADP ribozillenme tepkimeleri ilk olarak bazı bakteri toksinleri tarafından katalizlenen bir tepkime olarak bulunmuştur. Çeşitli bakteri toksinleri düzenleyici proteinleri ADP ribozillereyerek bazı metabolik yolları değiştirirler.

ADP-ribozil transferaz olarak ilk etkinliği saptanan ilk toksin difteri toksinidir. Difteri toksini hedef proteini diftamit (modifiye histidin) üzerinden ADP riboziller ve omurgalı hücrelerinde eEF-2'nin ADP ribozillenmesini katalizleyerek protein sentezini durdurur. Pertusis toksinlerinden adacık aktifleştiren protein ile Clostridium botulinum toksini hayvan hücrelerinde siklaz sistemindeki G proteinlerini ADP ribozillereyerek adenilat siklazı hücresel denetim dışında bırakacak şekilde aktifleştirir.

ADP Ribozilleyen Toksinler

ADPRT'ler, tehlikeli ve potansiyel olarak ölümcül büyük bir toksin ailesidir. Bunlar patojenik bakteriler tarafından salgılanır ve insanın hedef proteinlerinin fonksiyonlarını engellerler. Yapı temelli çoklu sekans hizalamalarına dayalı olarak ADPRT ailesi, difteri (DT) ve kolera (CT) toksinine bağlanan NAD'a göre iki grupta sınıflandırılırlar(23,24). DT grubu toksinleri, ökaryotik elongasyon (uzatma) faktör 2'yi değiştirip ökaryotik hücrelerde protein sentezini aksatırlar. Bu grubun üyeleri arasında DT, eksotoksin A (ETA) ve cholix toksin vardır. CT grubu toksinleri, konakçı organizmalardaki çeşitli elzem proteinleri hedef alırlar. Mesela CT ve ısıya göre değişen entertoksin, G proteini üzerindeki G_{s-R} üstündeki Arg'yi hedef alır. Bu da kontrolsüz adenilat siklaz simülasyonuna yol açar. Pertussis toksini, G_i üzerindeki Cys'yi hedef alır ve adenilat siklaz yolundaki G proteinlerini birbirinden ayırır. C3bot1 ekzoenzimi üzerindeki Asn41'i hedef alır, bu da aktin hücre iskeletinin dağılmasına yol açar. Bitkisel böcek ilacı protein 2 (VIP2) ve iota toksinleri aktin üzerindeki Arg177'yi hedef alır ve aktin polimerizasyonunu engeller (19-21). Kısacası, ADPRTler bu ölümcül bakterilerin yol açtığı enfeksiyonları tedavi etmek için ilaç hedefleri olarak kullanılırlar (25-31). Sonuç olarak PARP ve ADPRT enzimleri, farklı çeşitlilikte fonksiyonlar ve düşük sekans kimlikleri gösterse de, ortak yapısal ve işlevsel özellikler paylaşırlar. Ortak bir reaksiyonu meydana getirirler, yani ADP-ribosilasyonu, katalize eden çok önemli mekanizmalardır. Böylece nikotinamid ve NAD^+ 'ın N-ribozu arasındaki C-N bağı kopar ve sonra ADP-riboz parçası hedeflere transfer edilir.. İkinci olarak, yapı itibarıyla benzer katalitik alanlara sahiplerdir; NAD^+ bağlayıcı parçalar dahil 3 boyutlu yapıları benzerdir. Üçüncü olarak, bir çoğunun ortak inhibitörleri vardır. Bu inhibitörler NAD^+ nikotinamidinin yapısını taklit eder ve yeni inhibitörlerin tasarımı için taslak sağlarlar.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Tez çalışması öncelikle Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bazı deneysel kısımlar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'da gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar için kullanılacak toksinler daha önceden başka projelerden ticari olarak satın alınarak bu tez çalışması için kullanılmıştır. Kuramsal çalışmalar Anabilim Dalımızda bulunan 16 çekirdekli iş istasyonunun yanı sıra TÜBİTAK bünyesinde mevcut bulunan ulusal bilgi ağı TR-DATA grid süper bilgisayarları kullanılarak yapılmıştır. Bu tez çalışmasında çalışma konusu olan boğmaca hastalığının ana etkeni olan pertussis toksinin yanı sıra karşılaştırılma amacı ile kolera ve difteri toksinleride kullanılmıştır. Toksinlerin ana motif dosyaları (PDB dosyaları) araştırmacılarının kullanımına açık olan Protein Data Bank in Europe, Protein Data Bank Japan ve Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank protein veri bankalarından elde edilmiştir. Çalışma için boğmaca toksini 1PRT, difteri toksini 1TOX ve kolera toksini 1S5E üç boyutlu yapısal motifleri kullanılmıştır. Kuramsal sonuçların deneysel sonuçlarla karşılaştırılması amacı ile elektroforetik teknikler ve thermal shift assay yöntemi kullanılmıştır.

GEREÇLER

KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

2-Merkaptoetanol (MET) (Sigma)

Akrilamit (Sigma)

Amonyum persülfat (Sigma)

Amonyum sülfat (Sigma)

Asetik asit (Akkimya)

Bis-Akrilamit (N,N'-Metilen-bis-akrilamit) (Sigma)

Brom fenol mavisi (Sigma)

Bromokloroindolfosfat (BCIP) (Sigma)

Difteri toksini (Sigma)

Etil alkol (Sigma)

Gliserin (Sigma)

Glisin (Sigma)

Hidroklorik asit (Sigma)

Metanol (Sigma)

N,N, N',N' tetrametilendiamin (TEMED) (Sigma)

Nitrobluetetrazolium (NBT) (Sigma)

Potasyum fosfat dibazik (Merck)

Potasyum fosfat monobazik (Merck)

Sığır serum albumini (BSA) (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (SDS)(Sigma)

Sodyum fosfat dibazik (Sigma)

Sodyum fosfat monobazik (Sigma)

Sodyum karbonat (Sigma)

Sodyum klorit (Sigma)

Sulfo-NHS-LC biotin (Pierce)

Trizma (Sigma)

KULLANILAN CİHAZLAR

Çalkalayıcı (Yellow Line)

Distile su cihazı (GFL)

Etüv (Sanyo)

Jel elektroforez tankı (Atta)

Girdaplı tüp karıştırıcı (Thermolyne)

Güç kaynağı (EC 105)

Hassas terazi (Mettler)

Jel filtrasyon kolonları (GE Healthcare HiPrep Sefakril S-100 HR ve S-200 HR)

Jel filtrasyon sistemi (GE Healthcare)

Liyofilizatör (Labconco)

Otoklav (ISOLAB)

Sanrifüj (Hettich)

Spektrofotometre (UV 1601 Shimadzu)

Su banyosu (37 °C) (Heidolph)

Derin Dondurucu (AEG)

Otomatik Pipetler (Gilson)

Vorteks (VELP Scientifica)

Thermal Cyclers (Boeco TS-100)

Manyetik Karıştırıcı (Nüve)

KULLANILAN PROGRAMLAR

Visual Studio 2017 (Microsoft)

Linux (Ubuntu Dağıtımı)

Visual Studio Code 1.41 for Ubuntu (Microsoft)

Pymol for evaluation (Schrodinger)

Jmol

Autodock Vina 4.2.6

Python for Linux 3.x

Python for Windows 3.x

Visual Molecular Dynamic 1.9.3 (Illinois University)

NAMD 2.13 (Illinois University)

Discovery Studio 4.0 (BIOVIA)

Chimera 1.14 (California University)

diMol 1.0 (Trakya Üniversitesi Biyofizik)

PIPER Docking (Boston University)

ÇÖZELTİLER

Kolon Kromatografisinde Kullanılan Çözeltiler

Kolon Yükleme Tamponu

0,05 M Sodyum fosfat tamponu pH 7,2

0,15 M NaCl

Sodyum Fosfat Tamponu (pH:7,2)

720 ml 0,2 M Sodyum fosfat dibazik

280 ml 0,2 M Sodyum fosfat monobazik

Kolon Yıkama Tamponu

200 ml Etanol

800 ml dH₂O

PAGE (Poliakrilamit Jel Elektroforezi) İçin Kullanılan Çözeltiler

PAGE Alt Jeli: (%12)

2 ml 1,5 M Tris HCl pH:8,8

3,22 ml Akrilamit/bisakrilamit (30:0,8)

0,075 ml % 10 SDS

30 µl %10 Amonyumpersülfat

15 µl 6,56 M TEMED

2,72 ml d H₂O

PAGE Üst Geli: (%5)

0,625 ml 1 M Tris HCl pH:6,8

0,42 ml Akrilamit/bisakrilamit (30:0,8)

0,025 % 10 Sodyumdodesilsülfat

10 µl % 10 Amonyumpersülfat

5 µl 6,56 M TEMED

1,46 ml d H₂O

PAGE Yürütme Tamponu

Tris bazı	3 g
Glisin	15 g
SDS	1 g d H ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

PAGE Yükleme Tamponu (2x):

1 ml	1 M Tris HCl pH:6,8
1,6 ml	% 99 Gliserin
2 ml	% 10 Sodyumdodesilsülfat
0,4 ml	14 M MET
0,2 ml	% 0,1 Bromfenol mavisi
3,8 ml	dH ₂ O

"Coomassie" Parlak Mavisi ile Gel Boyama Cözeltisi

% 0,2 "Coomassie" parlak mavisi
% 50 Metanol
% 10 Asetik asit

Jelden Boya Cıkarma Cözeltisi

% 25 İzopropil alkol
% 10 Asetik asit

YÖNTEMLER

Kuramsal Çalışmalar

Çalışmamızda X-ışını kristalografisi ve NMR deneysel veri sonuçlarının yüklendiği protein veri bankalarından ADPRT grubunda bulunan toksinlerin motif dosyaları bulundu. Daha önceden

modellenmiş bulunan 1PRT'in veri dosyası doğrulamak amacı ile ilgili veri dosyası MODELLER algoritması kullanılarak kuramsal yollarla elde edilerek karşılaştırıldı. Motifler anabilim dalımızda geliştirilme aşamasında bulunan diMol programı ile katlanma ve yüzey yapıları görüntülendi. Elde edilen dosyalar üzerinde ortak bölgelerin araştırılması işlemi en düşük RMSD (root mean square deviation) değerleri göz önüne alınarak yapıldı. ADPRT'ler ile NAD arasındaki bağlayıcı etkileşimleri analiz etmek için moleküler dinamik (MD) simülasyonları, 300 K ortalama sıcaklık ve pH 7 altında CHARMM ve NAMD programları gerekli motiflerin analizi için kullanıldı. Uzun sürecek hesaplama işlemlerinin bir kısmı ulusal bilgi ağı üzerinde TR-GRID sunucu üzerine yüklenen algoritma tarafından hesaplandı. Protein demirleme (protein docking) çalışmaları Autodock ve FlexX gibi programların haricinde Boston Üniversitesinin Yapısal Biyoinformatik Laboratuvarlarında protein-protein docking sisteminde yüklü bulunan ClusPro 2.0'da simülasyon sisteminde daha önceden motifleri belirlenen proteinler yada peptitler etkileşime sokuldu. ClusPro, Fast Fourier Transform (FFT) korelasyon yaklaşımı temelli sabit bir protein demirleme (docking) programıdır ve çift mantıklı etkileşim potansiyellerini kullanacak şekilde genişletilmiştir. Bu programda olası etkileşimlerde kullanılmak üzere en iyi 1000 enerji konformasyonu kümelendirilmiştir. Öncelikle etkileşim bölgelerini keşfetmek için basitleştirilmiş enerji modeli ile kısıtlı esneklik kuramını kullanarak enerji sahasını geniş çapta araştırılır. Ardından ayrıntılı skorlama (scoring) ve örnekleme (sampling) kullanarak tespit edilen alanlara odaklanılır. Algoritmanın ikinci basamağı alınan yapıların uzaklık ölçümü için çift mantıklı RMSD kullanılarak kümelendirilmesidir. Kümelemenin biyofiziksel anlamı, enerji sahasının oldukça yüklü enerji havzalarını izole etmektir. Bu programda sırasıyla PIPER'a uygulanan çift mantıklı potansiyelleriyle demirleme metodu olan Fast Fourier Transform (FFT), moleküler tanıma potansiyelleri için referans durumları üretmek için bir metot DARS (Decoys as the Reference State), olası konformasyonların keşfi için bir kümeleme tekniği, serbest enerji stabilitesini analiz ederek yerel olmayan kümeleri ortadan kaldırmak ve enerji optimizasyonunu sağlayan Semi-Definite programming based Underestimation (SDU) kullanıldı. Etkileşim yüzeylerinde bulunan sıcak noktalar olarak adlandırılan noktalar arayüzlerin çok ufak bir kısmını oluşturmalarına rağmen bağlanma enerjisinin büyük çoğunluğuna katkıda bulunan amino asitlerdir. On adet etkileşim bölgesi termodinamiksel olarak enerji hesaplamalarına göre değerlendirilerek bağlanma olasılığının en yüksek olduğu bölgeler tespit edildi.

Deneysel Çalışmalar

Çalışmamızda proje kapsamında ticari olarak satın alınan ADPRT ait proteinler ve sentetik moleküller kullanıldı. Deneysel çalışmaların tamamı aşağıdaki yöntemler kullanılarak yapıldı.

ADPRT Alt Birimlerinin Tripsin Kısmi Sindirimi İle Eldesi

PT 60 dakika süreyle 37 °C de tripsin ile molar oranı 1/200 olacak şekilde 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sukroz, 7 mM MET, 0.2 mM PMSF varlığında kısmi olarak sindirimi sağlandı. Reaksiyonu durdurmak için 1:1 oranında soya fasulyesi kaynaklı tripsin inhibitörü eklendikten sonra SDS ile denatüre edildi. Tripsinle ayrıştırılan parçalar elektroforez (SDS-PAGE) sonrası gelden kesidi veya kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı. Örnekler vivaspin tüplerde (V-10.000) ya da liyofilizatör ile konsantre edildi.

Moleküler Elek Analizi

Çalışmada gel filtrasyon kromatografisi için HiPrep Sefakril S-100 (16 x 60 cm) kolon kullanıldı. Kolonun toplam hacmi (V_c) 120 ml, ölü hacim (V₀) 40 ml olarak tespit edildi. Kolon aprotinin (6,5 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (43 kDa), BSA (66 kDa) ve conalbumin (75 kDa) standartlarıyla kalibre edildi, standartların geliş hacimlerine (V_e) göre jel safhası dağılım katsayısı (gel-phase distribution coefficient) olan μ değerleri bulunarak kalibrasyon grafiği çizildi. Mobilite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\mu = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Kalibrasyon işleminden çalışılacak protein örnekleri fragmentlere ayrılarak bu fragmentlerin geliş hacimleri kalibrasyon grafiğinden kontrol edildi. Kolondan örnekler 0,35 mPa basınçta, 0,8 ml/dak hızında ve 0.5 ml olarak kesimlendikten sonra 280 nm de optik yoğunlukları belirlendi. Çalışma sonunda kolonlar % 20'lik etil alkol çözeltisinde saklandı.

Örneklerin Liyofilize Edilmesi

Örnekler ependorf ya da falcon tüp içinde üzerleri parafilm ile kaplanarak -80 °C'de donduruldu. Tüpler cihaza yerleştirilmeden önce hava alabilmesi için iğne yardımıyla delindi. Örnekler yüksek basınç altında vakumlanarak gece boyu liyofilize işlemine tabi tutuldu.

Elektroforez Analizi

Örnekler, Laemmli yöntemine göre sodyum dodesil sülfat poli akrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile test edildi. Cam plakalar arasına silikon ayıraç yerleştirilerek % 12'lik ayırma jeli döküldü. Düzgün bir jel yüzeyi oluşturmak üzere 1 cm'lik su tabakası oluşturulup 30 dakika polimerleşme için beklendi. Jelin üzerindeki su tabakası dökülerek % 5'lik yığınlama jeli eklendi. Örneklerin yükleneceği kuyuları oluşturacak tarak cam plakalar arasına yerleştirildi ve polimerleşme için beklendi. Elektroforeze yüklenecek örnekler, denatüre edici (yükleme) tamponla 1:1 oranında karıştırılıp 2 dakika kaynatıldı. Elektroforez tankı anot ve katot hazneleri yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnek yükleme sırasında bir kuyuya da moleküler ağırlık standartları olarak, molekül ağırlığı 10 kDa ile 260 kDa arasında olan çoklu protein standartı (Fermentas Protein Ladder) kullanıldı. Ayırma jeli için 80 Volt, ayırma jeli için 100 Volt gerilim uygulandı. Elektroforez sırasında kullanılan işaret boyası (Brom fenol mavisi) jelin sonuna geldiğinde akım kesildi. Jel, elektroforez aletinden ve iki cam arasından çıkartılarak Coomassie parlak mavsi ile boyanmaya bırakıldı. Daha sonra jel, % 7 asetik asit ve % 30 metanol varlığında fazla boya uzaklaştırıldı. Protein bantları boyanmış olan jel 3MM Whatman filtre kağıdı üzerine konularak üstü streç filmle sarılarak jel kurutucusunda 80 °C' de 1 saat süre ile vakum uygulanarak kurutuldu.

SDS-PAGE'den Protein Saflaştırılması

Protein yada peptit örnekleri tripsin varlığında kısmi sindirim sonrası SDS-PAGE jeline verildi. Jel dikey olarak iki bölüme ayrıldı. Jelin birinci bölümü Coomassie parlak mavisi ile boyandıktan sonra %10 asetik asit ile boyası çıkarılarak kurutuldu. İkinci bölümü ise jelin birinci bölümündeki sonuçlara göre, 1 mm' lik aralıklarla dilimlenerek (50 mM Tris -HCl, pH:7,5, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA ve 0,1 mg/ml BSA) içerisinde oda ısısında gece boyu homojenleştirildi. Silikon kaplı cam pamuğu ve konik tüpler kullanılarak 3000 xg'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra sıvı kısım alındı. Üzerine 4 hacim soğuk aseton ilave edilerek -20 °C çöktürüldü. Pellet üzerine 100 µl 6 M guanidin hidroklorür ilave edildikten sonra renatürasyon çözeltisine (50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, % 20 gliserol) karşı gece boyu diyalizlendi. Diyaliz sonrası, 10 µl örnek alınarak ADP-ribozillenme ile protein ya da peptit örneği miktarı belirlendi. Örnek vivaspin tüplerle (V-10.000) konsantre edildi.

Protein-protein Etkileşimi Tespiti

Kuramsal yöntemlerle elde ettiğimiz protein protein etkileşimi sonuçları oluşturulan deney ortamında moleküler elek (jel filtrasyon), elektroforez ve thermal shift assay yöntemleri kullanılması ile deneysel metotlarla ispatlanmaya çalışıldı.

Termal Kayma Deneyi (Thermal Shift Assay)

Termal Kayma Deneyi (Thermal Shift Assay), floresan boya (SYPRO orange) varlığında ve tipik bir gerçek zamanlı (real-time) PCR cihazı kullanılarak proteinlerin termal denatürasyonunun gösterilmesidir. Floresan yoğunluk sıcaklığın bir fonksiyonu olarak çizilir ve bu fonksiyon, 2 aşamalı geçiş (two-state transition) ile tanımlanan sigmoidal bir eğri oluşturur. Geçiş eğrisinin dönüm noktası (T_m) Boltzmann eşitliği ile hesaplandı. Analiz için, PCR cihazı ve ona uygun “96 kuyu plate” kullanıldı. Her bir örnek 3 kez tekrar edilerek deney gerçekleştirildi. Kolşisin uygulanan gruplara da SYPRO Orange ilavesi öncesi artan miktarlarda kolşisin uygulandı. Floresan yoğunluk 15 °C ile 90 °C arasında 0.5 °C’de bir 10 saniye süre (0.5 °C/15 sn) ile 450-490 nm eksitasyon, 560-580 nm deteksiyon olmak üzere ölçüldü.

Hücre Canlılık Testi (MTT testi)

Deneyin gerçekleştirilme aşamasında ilk olarak HELA hücre hatlarının yetiştirilmesi için gerekli olan kültür ortamı hazırlandı. Bu hücreler bulunduğu ortama yapışarak çoğalan hücrelerdir. Bunun için 73 cm² ‘lik hücre kültürü flask’ları kullanıldı. Bu flasklara DMEM/F-12 (Dulbecco's modified Eagle medium ve Ham's F-12 medium), FBS (Fetal Bovine Serum) ve Penicillin-Streptomycin sırasıyla % 94, %5 ve %1 oranında karıştırılmış hücre ortamı solüsyonu (Complete Medium -CM) hazırlanıp ilave edildi ve hücrelerin bu ortamda yeterli sayıya erişmesi beklendi. Hücreler yeteri kadar çoğaldıktan sonra hücre kazıyıcı ile kazınıp ve santrifüj edildi. Santrifüjden elde edilen hücreler CM ilave edilerek homojen hale gelene kadar pipetaj yapıldı. Bu aşamadan sonra MTT deneyi için gerekli aşamalar gerçekleştirildi. MTT ayıracı, canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığına bakıldı. Bu kapsamda her bir hücre hattı, 96- örneklilik kültür kaplarında (plate) 10.000-50.000/kuyucuk olacak şekilde otomatik multipipetler ile ekildi. Bir gece (yaklaşık 16 saat) süre sonunda toksin uygulamaları yapılarak 6, 12 ve 24 saat süresince inkübasyona bırakıldı. MTT canlılık analizlerinde gruplar 11 kuyucuktan oluşturuldu ve kontrol gruplarında eklendi . Toksin dozları 9 farklı konsantrasyonlarda kullanılacak, etkinlik durumuna göre daha düşük konsantrasyonları da analiz edildi. İnkübasyon sonrası hücre sağkalım (viyabilite) analizleri için MTT testi yapıldı. Bunun için 5 mg/ml dozunda

hazırlanan “Yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)” test solüsyonu 20 µl/kuyucuk olacak şekilde tüm kuyucuklara pipetlendi. Daha sonra plateler 2 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında kuyucukların içindeki medyum uzaklaştırdı, her bir kuyucuğa 1000 µl ultra saflıkta DMSO eklendi ve karanlıkta uygun oda koşullarında 2 saat bekletildi. Bu süre sonunda plateler Biotek ELx800 Plate Reader okuyucu ile 492 ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Kontrol grubundan elde edilen değer % 100 canlılık olarak alınarak karşılaştırmalı ölüm oranı şeklinde belirlendi.

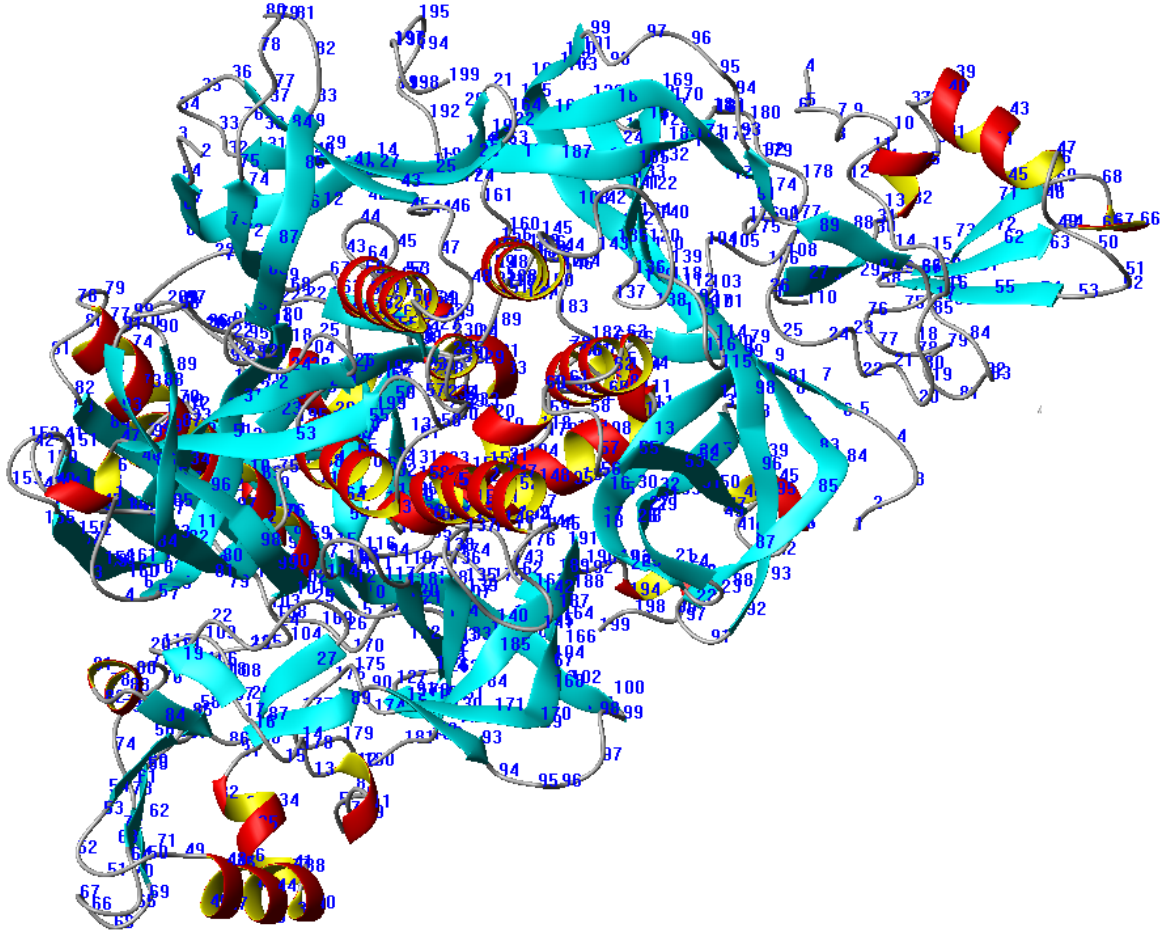
BULGULAR

KURAMSAL ÇALIŞMALAR

PDB Dosyalarının Eldesi

Proje kapsamında çalışılacak olan insan ve farklı türlere ait ADPRT'lere ait olan veri dosyaları (PDB dosyaları) RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) ve The European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>) veri bankları kullanılarak elde edildi. Bu veri veri dosyalarına ait motiflerin bulunabilecekleri en olası konformasyonları bulabilmek için nano saniye düzeylerinde su atomları ile etkileşime sokularak gerekli esneklik hesaplamaları yapıldı. Bu etkileşimleri gözleyebileceğimiz simülasyon analizleri için TÜBİTAK bünyesinde bulunan TR-Data Grid bilgisayar sistemleri kullanıldı. Veri bankasında mevcut bulan PT' e ait motifin sınanması amacı ile, PT'e ait amino asit dizisi elde NCBI veri bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) elde edilerek Homoloji (Benzeşim) Modelleme yöntemi kullanılarak modellendi. Elde edilen motifler üzerinde gerekli Root-mean-square deviation (RMSD) hesaplamaları yapılarak ortak yapısal motif araştırıldı. Elde edilen ve ortak yapısal motif olduğunu düşündüğümüz yapının bağlanma enerjileri yüksek bağlanma noktaları (hot spots) tespit edildi.

Pertussis Toksin



Şekil 5. Pertussis toksinin ikincil yapısı

PT Veri Dosyalarının Eldesi ve Dizilerin Karşılaştırılması

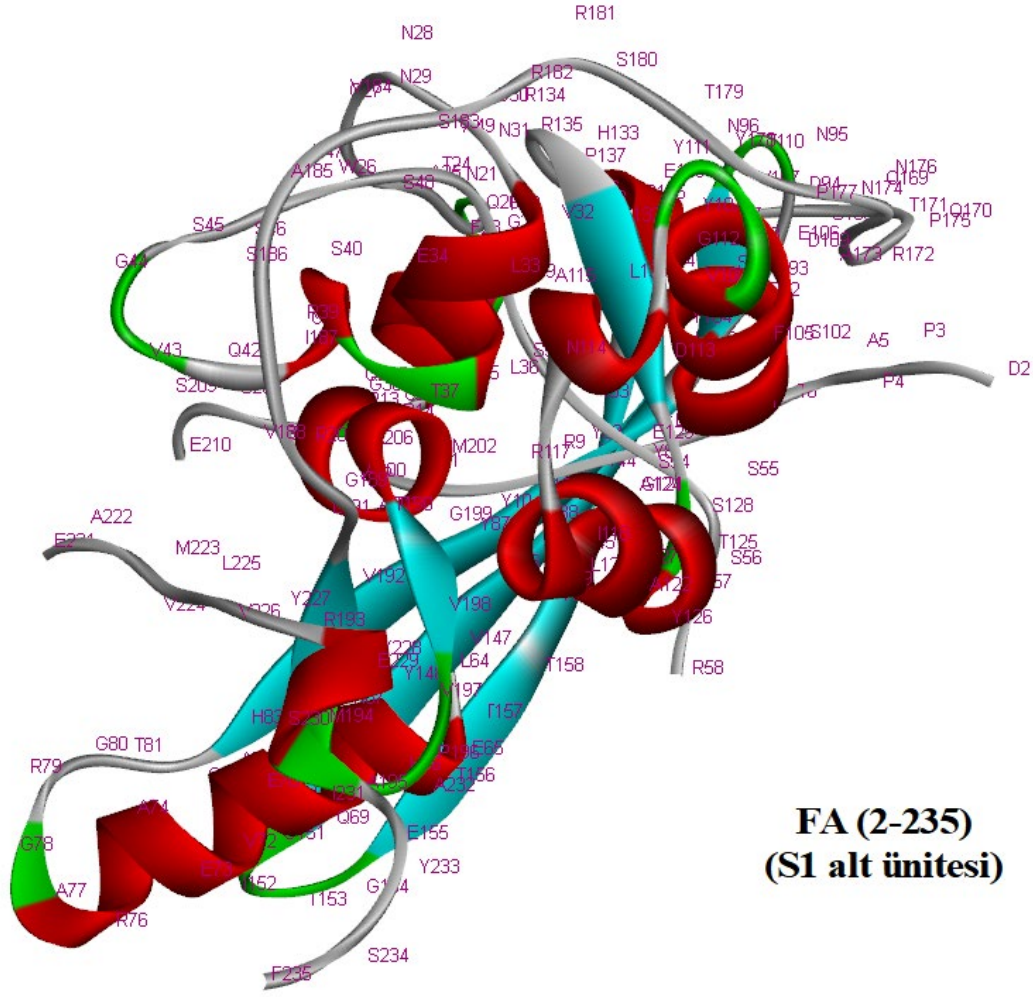
Hem PARP'lar hem ADPRT'ler NAD'ın nikotinamid ve ADP-riboz'a ayrılmasını katalize eden enzimleri metabolize eder ve ADP-ribozun hedef proteine transferini sağlar. PARPlar çoğu ökaryotta her yerde bulunan enzimlerdir ve post-translasyonel protein modifikasyonlarında işlev gördükleri bilinmektedir. Bu sebepten NAD'yi tanıyan ortak motifinde türler arasında da benzerlik gösterebileceğini düşündüğümüzden ADPRT dizileri karşılaştırıldı. PT üzerindeki karşılaştırmalar (Şekil 5) sonucu bağlanma bölgeleri (active site) ve bağlanma enerjileri diğerlerine göre daha yüksek olan bağlanma noktaları (hot spots) tespit edildi..

PT'nin Kuralsal Olarak Analiz Edilmesi

Tez kapsamında kokobasil bir bakteri olan Bordetella tarafından sentezlenen PT üzerinde çalışıldı. PT'in toksik kısmı 235 amino asitten oluşan bir polipeptid zincirdir. PT diğer alt domainlerinden kırılmasının ardından katalitik etkinliği olan domein fragment A, geriye kalan polipeptid 4 kısım reseptörü tanıyan fragment B olarak isimlendirilir. Toksik kısmının haricindeki diğer peptitler sinyal peptit olarak adlandırılır. PT'nin 3 fonksiyonel bölgesi vardır. Bu bölgeler reseptör bağlanan bölge (R), enzimatik bölgenin konakçı hücre içine translokasyonunu idare eden bölge (T bölgesi) ve ADP-riboz transferinde etkili olan katalitik bölge (C bölgesi)'dir. C bölgesi fragment A (S1), R ve T bölgesi fragment B (S2, S3, S4, S5) olarak adlandırılır. Toksini oluşturan 5 alt ünite sırasıyla S1 (26.024 Da), S2 (21.924 Da), S3 (21.873 Da), S4 (12.058 Da) ve S5 (11.013 Da)'dir. Çalışmamızda amino asit dizileri baz alındığında S2 ve S3 alt üniteler %75 benzerlik göstermektedir. PT'in Toksik bölgesi olan FA (S1 Bölgesi) (Tablo 1)'in üç boyutlu ikincil yapısı belirlenerek diMol programında analiz edilerek görüntülenmiştir (Şekil 6).

Tablo 1. PT toksik kısmının amino asit dizilimi

10	20	30	40	50
DDPPATVYRY	DSRPPEDVFQ	NGFTAWGNND	NVLDHLTGRS	CQVGSNSAF
60	70	80	90	100
VSTSSRRYT	EWYLEHRMQE	AVEAERAGRG	TGHFIGYIYE	VRADNNFYGA
110	120	130	140	150
ASSYFEYVDT	YGDNAGRILA	GALATYQSEY	LAHRRIPPEN	IRRVTRVYHN
160	170	180	190	200
GITGETTTTE	YSNARYVSQQ	TRANPNPYTS	RRSVASIVGT	LVRMAPVIGA
210	220	230		
CMARQAESSE	AMAAWSERAG	EAMVLWYYES	IAYSF	



Şekil 6. PT katalitik kısmının (S1) ikincil yapısı

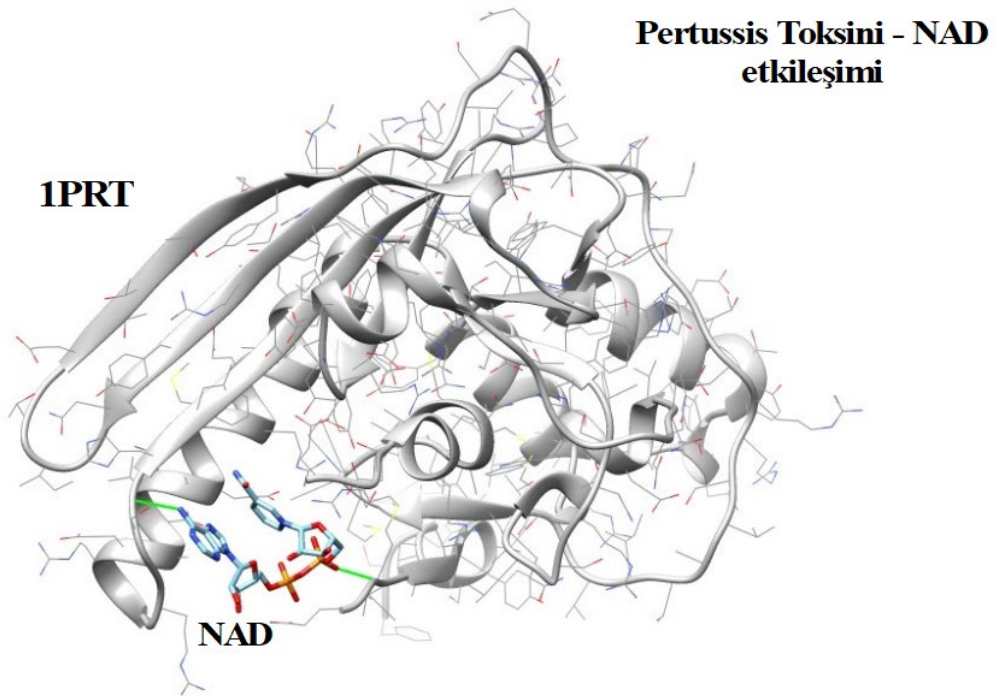
PT ile NAD Etkileşimin incelenmesi

PT bilgisayar ortamında en ideal şartlarda NAD ile autodock programı kullanılarak etkileşime sokulmadan önce bir dizi veri seti hazırlama sürecine geçildi. Çalışmada, hem modellenen hemde veri bankalarından elde edilen PT ait PDB (Protein Data Bank File) dosyaları kullanarak reseptör gridleri oluşturulmuştur. Daha sonra ki aşamada, LigPrep programı kullanarak NAD için ligand kimyasal yapısı hazırlandı.. Hazırlanan veri setlerinden sonra PT2nin NAD'I katalizleyebilmesi için NAD'yi tanıyan ortak motifin etkileşim bölgelerini belirleyebilmek amacıyla bu ortak motifin etkileşim arayüzünün NAD bölgesine bağlanabilmesi için gerekli bağlanma enerjisi tespiti için gerekli docking işlemleri yapıldı. Docking işlemi sonucunda PIPER

skorlama tekniği kullanılarak bağlanma ihtimali en yüksel olan etkileşim bölgeleri tespit edilebilmesi için bağlanma enerjileri hesaplandı. Yapılar arası etkileşimler hesaplanırken, bağ esnekliği, bükülme açıları, dihedral aılar, amino asitlerin buldukları sıvı ortamdaki H atomları ile yaptıkları etkileşimler, amino asitleri oluşturan atomlar arasındaki Van der Waals etkileşimleri ve atomların yüklerinden kaynaklanan elektrostatik etkileşimler göz önüne alındı. Çalışma sonunda bundan sonraki kuramsal ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere, PT-NAD ile etkileşime girme ihtimali en yüksek olan bölgeler ve bu bölgeler ait amino asit dizilimleri tespit edildi. Kuramsal çalışmalarımız sonucunda PT'in toksik kısmından R58 (Arjinin 58), E61 (Glutamat 58) ve R143 (Arjinin 143) noktalarından NAD'ide bağlanıp (Şekil 7) gerekli katalizlenme mekanizmasını sağladığı gözlemlendi. Gerekli bağlanma enerjileride bağlanma yüzeyi üzerinden hesaplandı (Tablo 2).

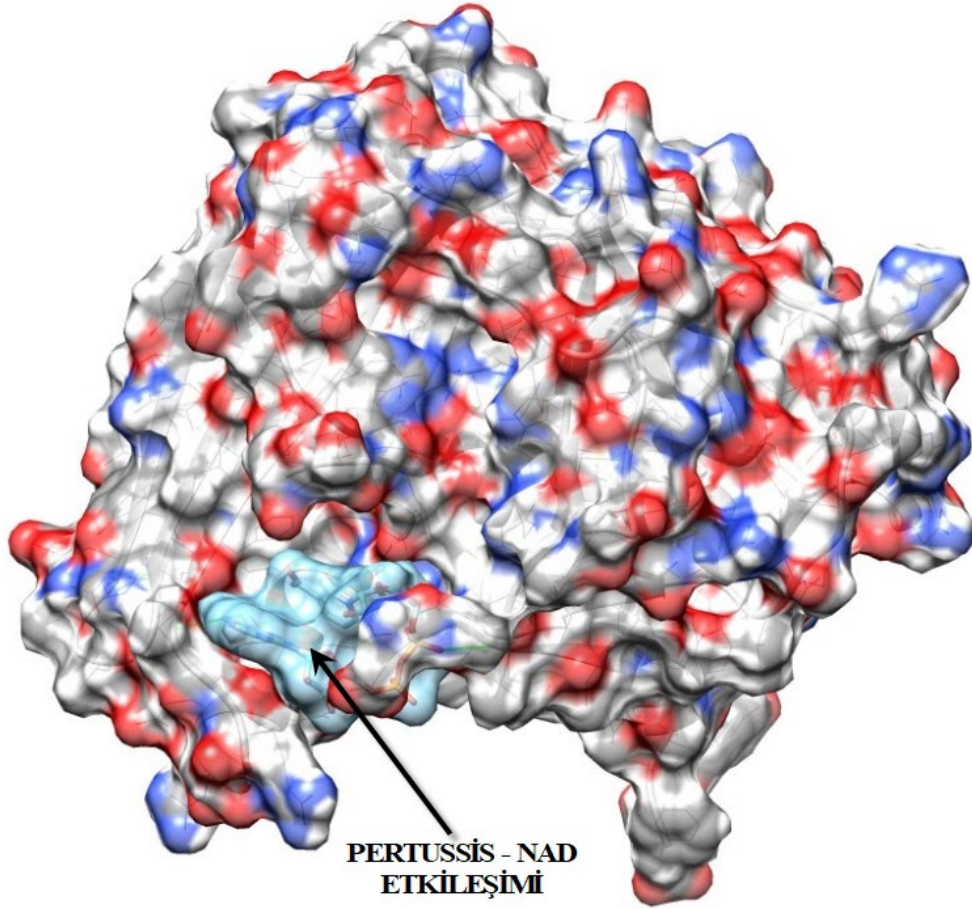
Tablo 2. Bağlanma Enerjileri

Id	ΔG (Coulomb)	ΔG (vdw)	ΔG (Kovalent)	ΔG (Bağlanma)
1PRT	-43.382 kcal/mol	-57,098 kcal/mo	12.398 kcal/mo	-62.268 kcal/mo



Şekil 7. Pertussis toksini-NAD etkileşimi

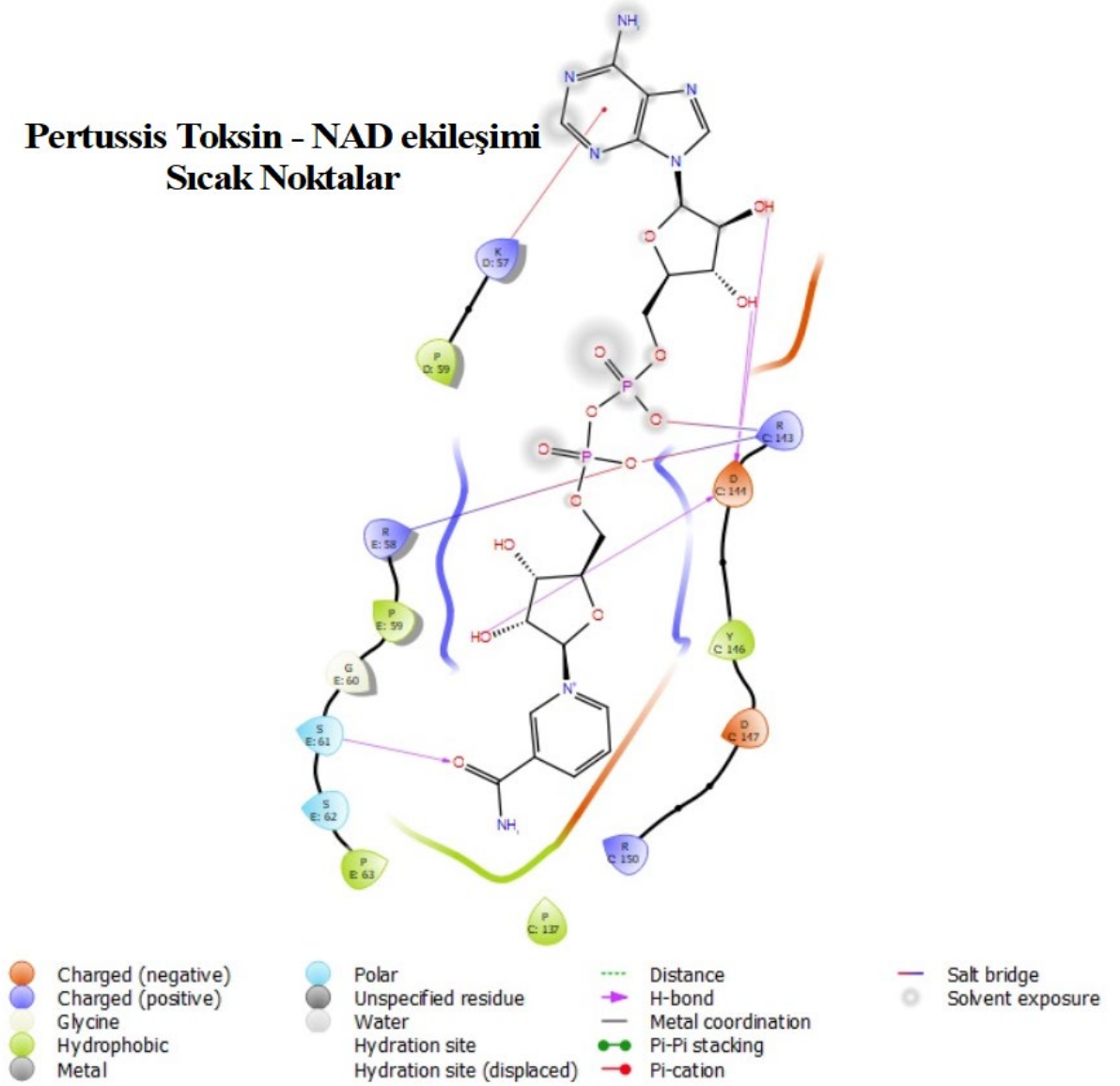
Elde edilen etkileşim bölgeleri gauss yüzeyi oluşturularak görüntüledi (Şekil 8).



Şekil 8. Pertussis-NAD etkileşimi yüzey görünümü

Etkileşim bölgesi için gerekli diyagram hesaplamaları yapıldı.

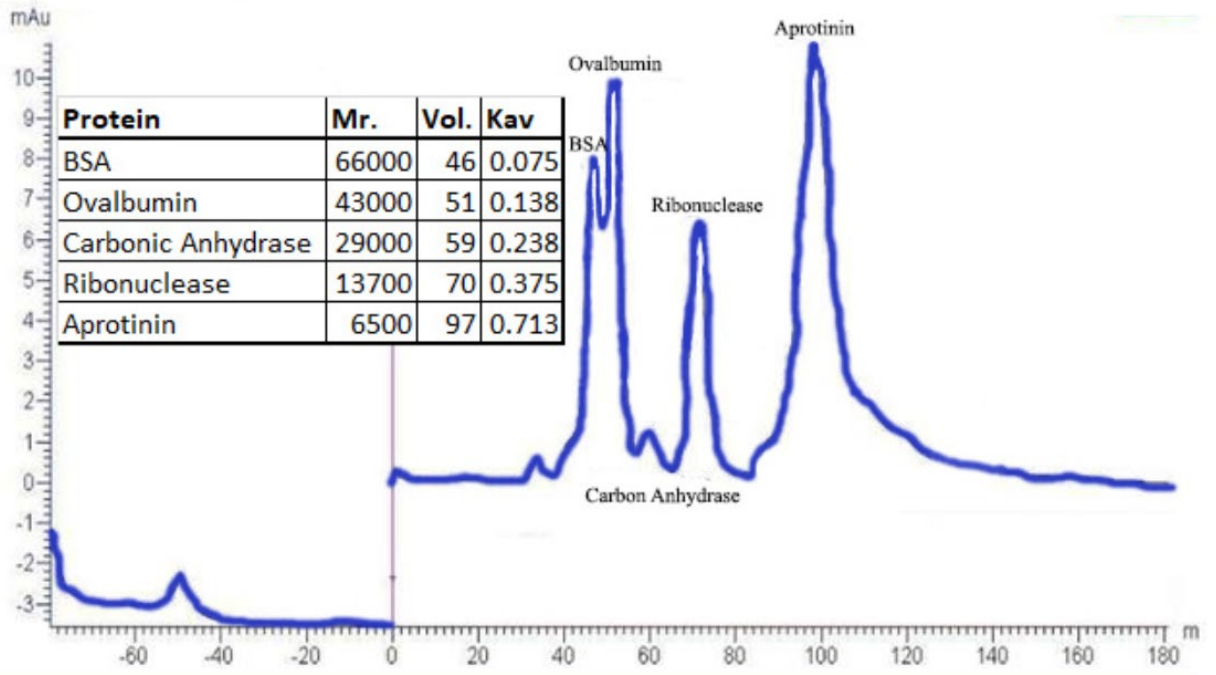
Pertussis Toksin - NAD ekileşimi Sıcak Noktalar



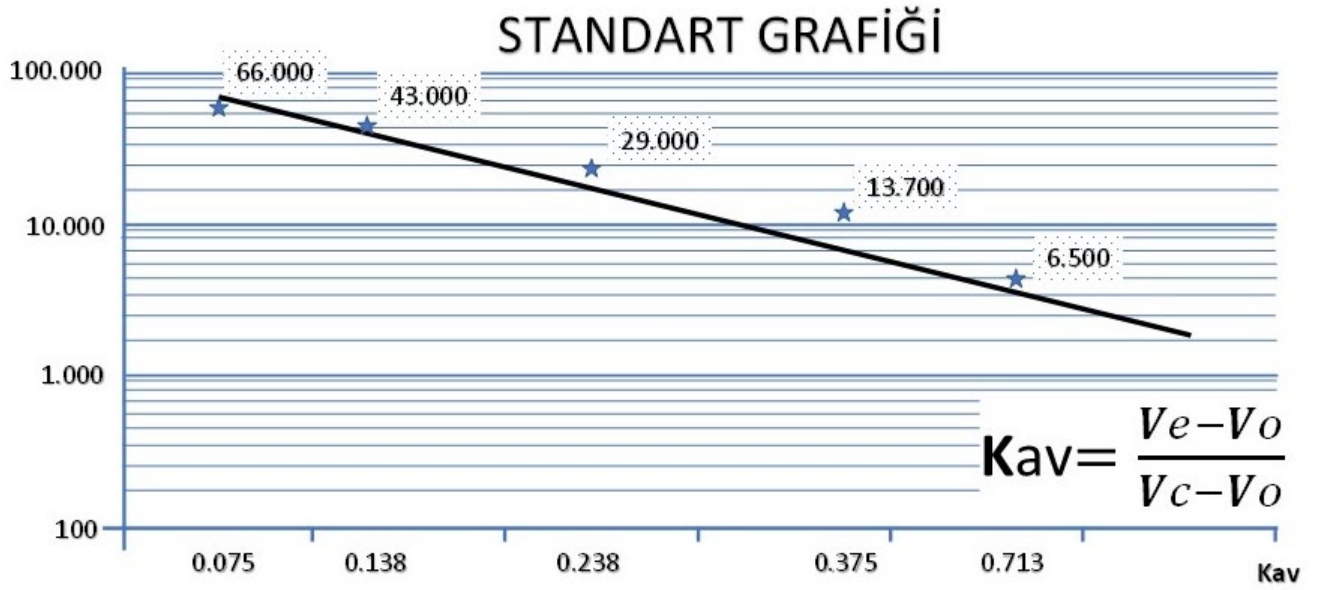
Şekil 9. Pertussis toksin-NAD etkileşimi sıcak noktaları

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Kuramsal çalışmalardan elde ettiğimiz sonuçların test edip sınanabilmesi için deneysel çalışmalarına geçildi. Bu amaçla Anabilim Dalımızda mevcut bulunan Bio-Rad marka kromatografi cihazı kullanılarak çalışmalara başlandı. Cihaz üzerine kolon hacmi 120 ml, 0,1-5 ml arası örnek yüklenebilen, dakikada 0,5-1 ml arasında akış hızı olan ve 0,5 MPa basınca dayanıklı Sephacryl S-100 High Resolution kolonu takıldı. Sistemi test etmek amacıyla 5 adet protein karışımı ve 1693 Da ağırlığında peptit parçalı sisteme yüklendi. (Şekil 9). Molekül ağırlıklarına göre sisteme yüklenen proteinlerin geliş hacimleri hesaplandı (Şekil 10 ve Şekil 11).



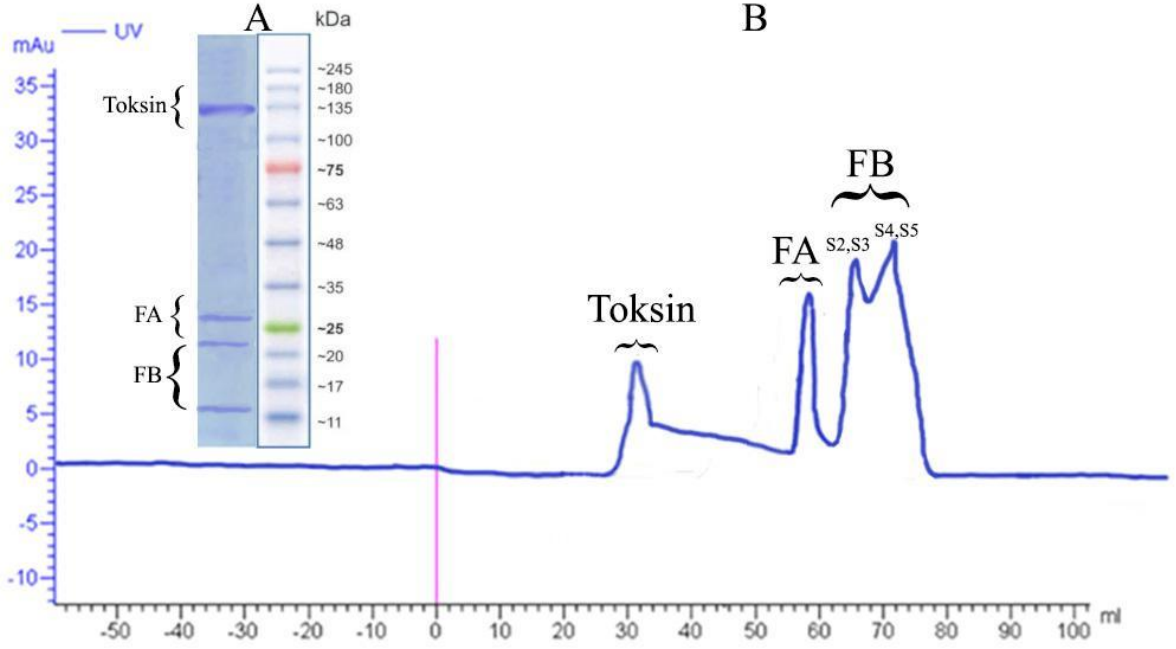
Şekil 10. Jel filtrasyon kromatografisi kalibrasyon grafiği



Şekil 11. Standart grafiği

PT, ilk olarak R bölgesi aracılığı ile hücre yüzey reseptörüne bağlanır, bu aşamadan sonra toksinin FB fragmenti hücredeki reseptöre bağlanarak FA fragmentinin endositozla hücreye girişini sağlar. FA, ADP-ribozil transferaz etkinliğine sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda

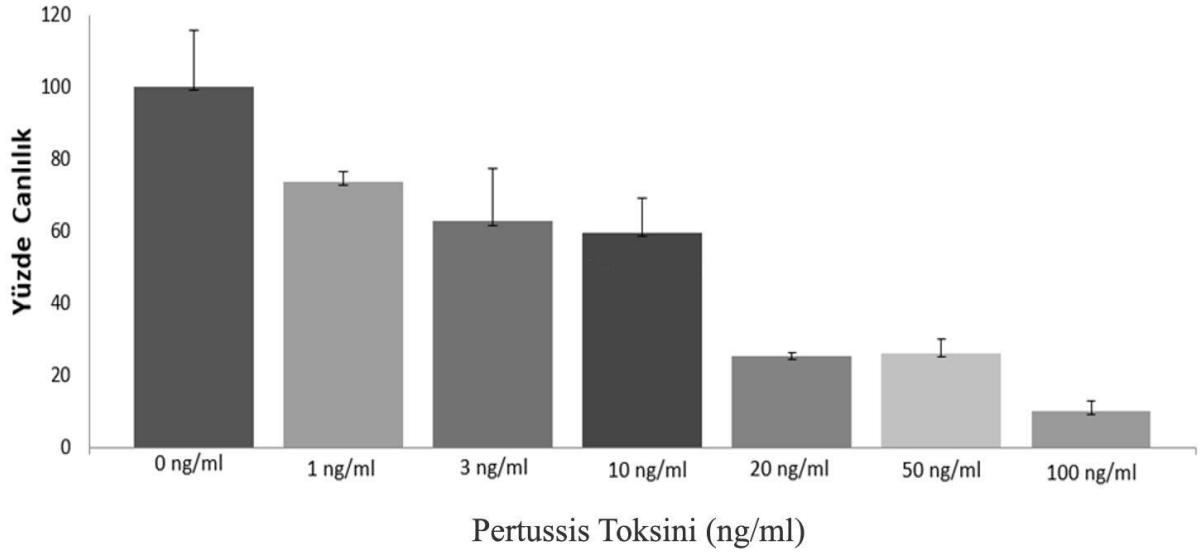
PT, tripsin ile molar oranı 1/ 200 olacak şekilde 30 dakika sindirildi. Triptik parçalar kromatografik ve elektroforetik yöntemler ile ayrıştırıldı (Şekil 12).



Şekil 12. Pertussis toksinin kromatografik yöntemlerle eldesi

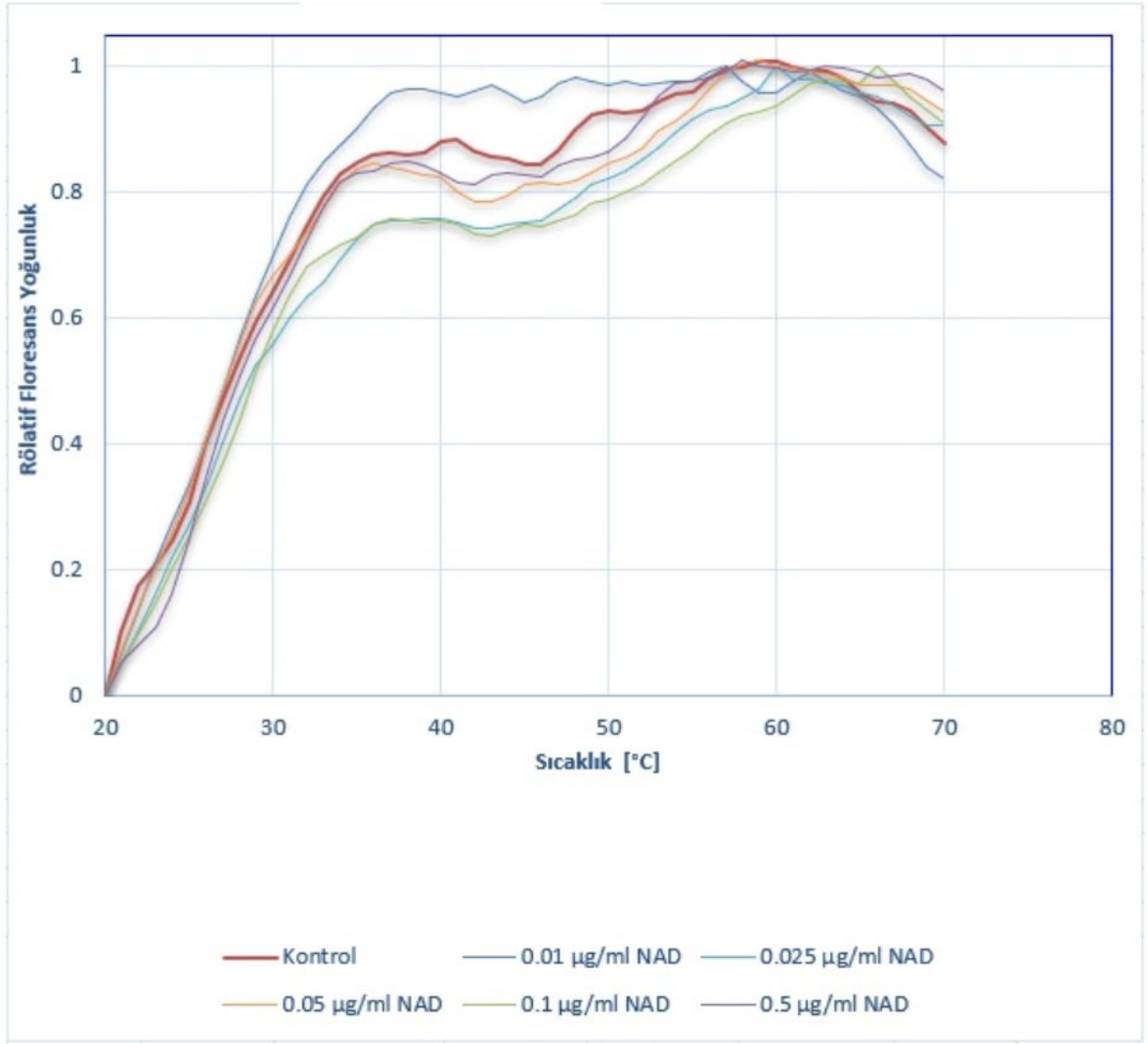
PT'nin fragmanlarına ayrıştırılması. **A.** (1) Protein ağırlık markırı, (2) Toksin kırıldıktan sonra, (10 µg) SDS/PAGE'de ayrıştırıldı. **B.** Safakril S-100 kromatografisinde yöntemlerde anlatıldığı gibi tripsinle kısmi sindirilen difteri toksini (0.2 mg). Akış hızı 0.8 ml/dak., örnek hacmi 0.5 ml. Ölçüm A₂₈₀ nm.

Deneylerde kullandığımız PT toksitesi serviks kanseri (HELA) hücreleri üzerinde sınıandı.



Şekil 13. PT yüzde canlılık deneyleri

Kuramsal metotlarla belirlenen S1 bölgesinin bulunduğu FA fragmenti bir protein-ligand etkileşim yöntemi olan termal shift assay yöntemi ile sınıandı (Şekil 13). Floresan temelli termal kayma deneyi, gereç ve yöntemlerde bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. FA sabit tutularak artan miktarlarda NAD ve SYPRO Orange varlığında çalışıldı. Protein yapısında sıcaklığa bağlı çözülme (termal etki) ligant (NAD) bağlandığında azalmaktadır. SYPRO Orange'ın proteine bağlanması denatürasyonla artmaktadır. Her bir NAD konsantrasyonu için, sıcaklık artırılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) cihazında denatürasyon eğrisi oluşturulup, erime dereceleri (T_m) hesaplandı. FA'nın termal stabilitesinin NAD ile etkileştiğinde arttığı görüldü. FA-NAD etkileşimi sonrası lineer bölgeden ölçülen termal stabilite grafiklerinden yola çıkılarak, Boltzman eşitliğinden T_m değerleri GraphPad ve Excel ile hesaplandı.



Şekil 14. PT FA(S1) - NAD etkileşimi ısı kayma ölçümü

PT FA(S1) - NAD etkileşimi thermal shift assay ile sınıandı (Şekil 14). SYPRO Orange varlığında 10 µg/ml FA ve artan konsantrasyonlarda NAD uygulaması sonrası, floresan yoğunluk 20 °C ile 90 °C arasında 0.5 °C'de bir 10 saniye süre (0.5 °C/15 sn) ile 580 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrole NAD uygulanmadı.

TARTIŞMA

Yirminci yüzyılın başlarında tüm dünyada en sık görülen çocukluk çağı enfeksiyonlarından biri haline gelmiş ve çocukluk çağı morbiditesinin en büyük sebebini oluşturan PT, ADPRT ailesinin önemli bir üyesidir ve ailenin diğer üyeleri gibi insanlık tarihi boyunca çok insanlar için önemlik bir tehdit olmuştur. Hastalığının etkeni küçük gram negatif kokobasil olarak görünen Bordatella türleridir. B.bronchiseptica, B.parapertussis, B.avium, B.hinzii, B.holmesii, B.trematum, B.petrii ve B.ansorpii bilinen diğer bordotella türleridir. B.pertussis ve B.parapertussis insanlardaki boğmaca kliniğinin en sık etkenleridir. B.pertussis'in insanlar dışında bilinen hayvan rezervuarı yoktur (32).

Diğer bordatella türleri daha çok hayvanlarda tanımlanmış olup, hasta hayvanlarla temas eden bağışıklık sistemi zayıf bireylerde de hastalık yapabildiği gözlenmiştir. PT, adenilat siklaz toksini ile patogenezden birinci derecede sorumlu molekül olarak tanımlanmaktadır. PT hastalığının sistemik bulgularının büyük bölümünden, solunum yolu bulgularına neden olan epiteliyal hasardan ve lenfositlerden sorumludur. Ayrıca, konak hücrenin immün sistemini etkileyerek konak savunmasının bozulmasına neden olur. Monosit ve NK hücreleri ile alveolar makrofajların oksidatif aktivitelerini inhibe eder. B.pertussis, yerleştiği yerlerde inflamasyon ve lokal nekroza neden olan dermonekrotik toksin (letal toksin, heat-labil toksin) üretmektedir. Bu toksin DNA ve protein sentezini stimüle ederek polinükleasyona neden olmaktadır. Güçlü vazokonstriktif etkisi vardır. Trakeal sitotoksin ve lipoproteinler ile ilişki kurarak solunum yollarında doku hasarına neden olmaktadır (33).

PT'in üye olduğu ADPRT'ler insan metabolizması tarafından sentezlenen PARP ailesi ile aynı mekanizmayı kullanırlar ve gerek yapısı gerekse etkisi açısından diğer toksin gruplarına göre daha iyi tanımlanmış bir toksin grubudur. Bu gruptan özellikle pertussis toksini sınırlı proteolitik

sindirim sonrası toksin iki parçaya ayrılmaktadır. Toksin, N-terminal ucuna karşılık gelen, enzimatik işlevi olan (ADP-riboziltransferaz) A fragmenti (S1) ve holotoksinin hücreye bağlanmasını sağlayan B fragmentinden (S2, S3, S4, S5) oluşur. Toksinin enzimatik parçası (FA, S1), endositik süreçte sitoplazmaya ulaşmaktadır. CT grubu toksinler, konakçı organizmalardaki çeşitli elzem proteinleri hedef alarak etki ettiği hücreleri apoptoz ya da nekroza sürükleyen yapılardır. PARP ve ADPRT enzimleri, farklı çeşitlilikte fonksiyonlar ve düşük sekans kimlikleri gösterse de ortak yapısal ve işlevsel özellikler paylaşırlar. İlk olarak, ortak bir reaksiyon, yani ADP-ribosilasyonu, katalize ederler. İkinci olarak, yapı itibarıyla NAD⁺ bağlayan benzer katalitik alanlara sahiplerdir. Biz çalışmamızda PT - NAD bağlayan ortak motiflerini araştırdık. Çalışmamız sonucunda PT'in toksik kısmından R58 (Arjinin 58), E61 (Glutamat 58) ve R143 (Arjinin 143) noktalarından NAD'ide bağlanıp gerekli katalizlenme mekanizmasını sağladığı gözlemlendi. Kuramsal çalışmalar sonunda belirlenen katalitik bölgeleri içeren kısımları içeren deneysel çalışmalarımızda bu sonuçları doğrular niteliktedir. PT-NAD etkileşimi son yıllarda önemli kullanım alanı bulan termal sitabilite (thermal shift assay - TSA) çalışmaları ile gösterdik. Natif proteine ligant bağlanması sonrası termal etkiye dayanıklılık artmaktadır. NAD bağlanması sonrası denatürasyon eğrilerinden T_m değerleri Boltzman eşitliğine göre saptandı. Ligandın proteine ilgisi artıkça denatürasyon sıcaklığı artmaktadır. Çalışmamızda NAD derişimin artırılması durumunda protein-ligand etkileşimine gire PT'in stabilitesinin arttığı gözlenmiştir.

SONUÇLAR

PT oldukça etkili ve ölümlere neden olabilen bir toksindir. PT etki ettiği hücrelerde toksin, gösterdiği sitotoksik etki sebebiyle protein sentezinin durduğu ve hücre iskeletinin yıkılarak hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. Hücre ile etkileşime giren PT, S-S bağlarının parçalanmasıyla iki parçaya ayrılır. PT'in N-terminal bölümüne karşılık gelen FA (S1) ADP-riboziltransferaz etkinliğine sahiptir, FB (S2,S3,S4,S5) ise holotoksinin hücreye bağlanmasını sağlamaktadır. Toksin hücre yüzeyindeki reseptöre bağlandıktan sonra FA sitoplazmaya ulaşır. Endozomlardan dışarı salınan FA, ökaryotik elangasyon faktör 2 (eEF2)'yi ADP ribozilleyerek protein sentezinin durmasına neden olur. Protein sentezi duran hücre programlı hücre ölümüne sevk eder.

Bu çalışma etkileşimin hangi bölgeler ve amino asitler üzerinden gerçekleştiğini ortaya koymak için tasarlandı.. Biz çalışmamamızda moleküler docking gibi kuramsal metotlar kullanarak PT'in R58 (Arjinin 58), E61 (Glutamat 58) ve R143 (Arjinin 143) noktalarından NAD'ide bağlanıp gerekli katalizlenme mekanizmasını sağladığı tespit ettik.

PT öldürücülüğü sınamak için HELA hücre hattında %canlılık testine tabi tutularak ADP-Ribozillenme mekanizmasını kullanan bu toksinin öldürücülüğü sınadık. Çalışma sonunda toksinin artan konsantrasyonlarda öldürücülüğünün arttığı belirledik.

PT ile NAD invitro ortamlarda yapılan thermal shift assay deneylerinde NAD derişimin armasının PT ine bağlanmayı arttırdığı ve gittikçe stabil ve sağlam hale gelen toksinin bozunma eğrilerinin gittiçe sağa doğru yaklaşarak etkileşim miktarını arttırdığını gözlemledik.

Bu çalışma sonunda PT'in toksik kısmının (FA) hücre içine, diğer 4 alt üniteden oluşan (FB) reseptör yapısını kullanarak girdiğini ve burada NAD'ı katalizleyerek eEF2'yi inhibe edip

protein sentezini durdurduğunu ve bununda etki ettiği hücrelerde ölümcül sonuçlar meydana getirdiğini düşünmekteyiz.

Biz bu tez çalışmasının aynı katalizleme mekanizmaları kullanan ADPRT ve PARP ailelerinin ortak motiflerinin belirlenmesinin geleceğe yönelik ilaç ve inhibitör çalışmalarına katkıda bulunacağına inanmaktayız. Bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlardan bulmayı düşündüğümüz inhibitör ve ilaçların IC₅₀ değerleri saptandıktan sonra hücre ve hayvan modellerinde sitotoksosite çalışmaları yapılacak CC₅₀ değerleri belirlenecektir. Bu inhibitörlerin bazı kanser türlerinde etkinliği kombine (radyasyon ve ya kemotrapik druglar) çalışmalarla hücre soylarında ve hayvan modelinde denenmesi planlanmaktadır.

ÖZET

Boğmaca, akciğerler ve hava yollarında, özellikle bebekler ve çocuklarda yaygın şekilde görülen ve insan patojeni olarak *Bordetella pertussis*'in sebep olduğu yüksek bulaşıcılığa sahip bir bakteri enfeksiyonudur. Hastalık etkeni 133 kDa molekül ağırlığına sahip ve 5 alt birimden oluşan Pertussis Toksinidir. Hastalık etkeni olan Pertussis Toksin ADP-Ribozilleyen ölümcül bir toksin ailesine aittir. ADP-ribozilleyen toksinler; mono(ADPRT) önemli ilaç hedefli toksin ailesidir. Bu toksin ailesi NAD'ı katalizleyerek nikotinamid ve ADP-riboza ayrılmasını ve bu sayede ADP-ribozun hedef proteine transferini sağlar. ADP-ribozillenme proteinlerin özgün enzimler tarafından katalizlenmesi sonucu oluşan bir modifikasyondur. Bu mekanizma sayesinde, Pertussis Toksin, ADP-Ribozun eEF-2'ye transferini sağlar ve inhibe olan eEF-2 sayesinde protein sentezi durarak hücre ölümü gerçekleşir. Biz bu tez çalışmamızda Pertussis Toksininin NAD'a hangi bölgeden bağlandığını araştırdık. Çalışmamızın ileride bu konuda yapılacak olan başka inhibitör ve ilaç tasarım çalışmalarına katkıda bulunacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Pertussis Toksin, eEF2, NAD, Protein Etkileşimi, ADP-Ribozillenme

ANALYSING OF ADP RIBOZYLATION MECHANISM IN THE CONTEXT OF PERTUSSIS TOXIN BY EXPERIMENTAL AND THEORETICAL METHODS

SUMMARY

Whooping cough, which is commonly seen especially in infants and children, is a highly contagious bacterial infection in the lungs and airways, caused by *Bordetella pertussis* known as a human pathogen. The cause of the disease is Pertussis Toxin which has a molecular weight of 133 kDa and consists of 5 subunits. Pertussis Toxin, the cause of the disease, belongs to a family of ADP-Ribosylating deadly toxins. ADP-ribosylating toxins; Mono (ADPRT) is an important drug-targeted toxin family. This toxin family catalyses NAD so as to separate nicotinamide and ADP-ribose; thereby it provides an opportunity for transferring ADP-ribose to the target protein. ADP-ribosylation is a modification becoming the result of catalyzed proteins by specific enzymes. Thanks to this mechanism Pertussis Toxin enables the transfer of ADP-Ribose to eEF-2 and protein synthesis stops and cell death occurs by means of inhibiting eEF-2. In this thesis we have investigated in which region Pertussis Toxin is bound to NAD. We believe that our study will contribute to further inhibitor and drug design studies in the future.

Keywords: Pertusis Toxin, eEF2, NAD, Protein Interaction, ADP-Ribosylation

KAYNAKLAR

1. Long SS. Pertussis. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, ed. Nelson Textbook of Pediatrics. 18th ed. Saunders: Philadelphia; 2007:1178-82.
2. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Pertussis (Whooping Cough). The Microbiol World. 2005:1-5.
3. Stein, P.E., et al., The crystal structure of pertussis toxin. Structure, 1994. 2(1):p. 45-57.
4. Bektaş M, Nurten R, Ergen K, and Bermek E. Endogenous ADP-ribosylation for eukaryotic elongation factor 2: evidence of two different sites and reactions. Cell Biochem Funct 2006; 24:369-380.
5. Okazaki IJ, Zolkiewska A, Takada T, Moss J. Characterization of mammalian ADP-ribosylation cycles. Biochemie 1995; 77:319-325.
6. Okazaki IJ, Moss J. Mono ADP-ribosylation: a reversible posttranslational modification of proteins. Adv Pharmacol 1996; 35:247-280.
7. Ame, J.C.; Spenlehauer, C.; deMurcia, G. The PARP superfamily. BioEssays 2004, 26, 882-893.
8. Otto, H.; Reche, P.A.; Bazan, F.; Dittmar, K.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. In silico characterization of the family of PARP-like poly (ADP-ribosyl) transferases (pARTs). BMC Genomics 2005, 6, 139-161.
9. Hassa, P. O.; Hottiger, M. O. The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. Front. Biosci. 2008, 13, 3046-3082.

10. Till, S.; Diamantara, K.; Ladurner, A. G. PARP: a transferase by any other name. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008, 15, 1243-1244.
11. Eliasson, M. J. L.; Sampei, K.; Mandir, A. S.; Hurn, P. D.; Traystman, R. J.; Bao, J.; Pieper, A.; Wang, Z. Q.; Dawson, T.M.; Snyder, S. H. Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.* 1997, 3, 1089-1095.
12. Bryant, H. E.; Schultz, N.; Thomas, H. D.; Parker, K. M.; Flower, D.; Lopez, E.; Kyle, S.; Meuth, M.; Curtin, N. J.; Helleday, T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005, 434, 913-917.
13. Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C. J.; Tutt, A. N. J.; Johnson, D. A.; Richardson, T. B.; Santarosa, M.; Dillon, K. J.; Hickson, I.; Knights, C. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005, 434, 917-921.
14. Rubinstein, W. S. Hereditary breast cancer: pathobiology, clinical translation, and potential for targeted cancer therapeutics. *Fam. Cancer* 2008, 7, 83-89.
15. Opar, A. Novel anticancer strategy targets DNA repair. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2009, 8, 437-438.
16. Daniel, R. A.; Rozanska, A. L.; Thomas, H. D.; Mulligan, E. A.; Drew, Y.; Castelbuono, D. J.; Hostomsky, Z.; Plummer, E. R.; Boddy, A. V.; Tweddle, D. A. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 enhances temozolomide and topotecan activity against childhood neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 1241-1249.
17. Donawho, C. K.; Luo, Y.; Luo, Y.; Penning, T. D.; Bauch, J. L.; Bouska, J. J.; Bontcheva-Diaz, V. D.; Cox, B. F.; DeWeese, T. L.; Dillehay, L. E.; Ferguson, D. C.; Ghoreishi-Haack, N. S.; Grimm, D. R.; Guan, R.; Han, E. K.; Holley-Shanks, R. R.; Hristov, B.; Idler, K. B.; Jarvis, K.; Johnson, E. F.; Kleinberg, L. R.; Klinghofer, V.; Lasko, L. M.; Liu, X.; Marsh, K. C.; McGonigal, T. P.; Meulbroek, J. A.; Olson, A. M.; Palma, J. P.; Rodriguez, L. E.; Shi, Y.; Stavropoulos, J. A.; Tsurutani, A. C.; Zhu, G.-D.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L.; Frost, D. J. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13, 2728-2737.
18. Penning, T. D.; Zhu, G.-D.; Gandhi, V. B.; Gong, J.; Liu, X.; J.; Bontcheva-Diaz, V.; Bouska, J. J.; Osterling, D. J.; Olson, A. M.; Marsh, K. C.; Luo, Y.; Giranda, V. L. Discovery of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methyl-pyrrolidin-2-yl]-1H-

- benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.* 2008, 52, 514-523.
19. Thomas, H. D.; Calabrese, C. R.; Batey, M. A.; Canan, S.; Hostomsky, Z.; Kyle, S.; Maegley, K. A.; Newell, D. R.; Skalitzky, D.; Wang, L.-Z.; Webber, S. E.; Curtin, N. J. Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Mol. Cancer Ther.* 2007, 6, 945-956.
 20. Plummer, R.; Lorigan, P.; Evans, J.; Steven, N.; Middleton, M.; Wilson, R.; Snow, K.; Dewji, R.; Calvert, H. First and final report of a phase II study of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide (TMZ) in patients with metastatic malignant melanoma (MM). *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 8013.
 21. Peralta-Leal, A.; Rodriguez-Vargas, J. M.; Aguilar-Quesada, R.; Rodriguez, M. I.; Linares, J. L.; de Almodovar, M. R.; Oliver, F. J. PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radical Biol. Med.* 2009, 47, 13-26.
 22. Jagtap, P.; Szab, C. Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2005, 4, 421-440.
 23. Holbourn, K. P.; Shone, C. C.; Acharya, K. R. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. *FEBS J.* 2006, 273, 4579-4593.
 24. Fieldhouse, R. J.; Merrill, A. R. Needle in the haystack: structure-based toxin discovery. *Trends Biochem. Sci.* 2008, 33, 546-556.
 25. Yates, S. P.; Merrill, A. R. A catalytic loop within *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A modulates its transferase activity. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 35029-35036.
 26. Roberts, T. M.; Merrill, A. R. A re-evaluation of the role of histidine-426 within *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochem. J.* 2002, 367, 601-608.
 27. Armstrong, S.; Merrill, A. R. Toward the elucidation of the catalytic mechanism of the mono-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemistry* 2004, 43, 183-194.
 28. Parikh, S.; Schramm, V. Transition state structure for ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2 catalyzed by diphtheria toxin. *Biochemistry* 2004, 43, 1204-1212.

29. Zhou, G.; Parikh, S.; Tyler, P.; Evans, G.; Furneaux, R.; Zubkova, O.; Benjes, P.; Schramm, V. Inhibitors of ADP-ribosylating bacterial toxins based on oxacarbenium ion character at their transition states. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 5690-5698.
30. Jorgensen, R.; Merrill, A. R.; Yates, S.P.; Marquez, V. E.; Schwan, A. L.; Boesen, T.; Andersen, G. R. Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry. *Nature* 2005, 436, 979-984.
31. Jorgensen, R.; Wang, Y.; Visschedyk, D.; Merrill, A. R. The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. *EMBO Rep.* 2008, 9, 802-809.
32. Ner Z, Ross LA, Horn MV, Keens TG, MacLaughlin EF, Starnes VA, et al. *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2003;7(5): 413-7.
33. Rogel A, Meller R, Hanski E. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem* 1991;266(5):3154-61.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa
Şekil 1. Bordetella pertussis	3
Şekil 2. İnsan İnteraktomu	7
Şekil 3. Pertussis toksin alt birimleri	9
Şekil 4. ADP-riboz katalizleme mekanizması	13
Şekil 5. Pertussis toksinin ikincil yapısı	28
Şekil 6. PT katalitik kısmının (S1) ikincil yapısı	30
Şekil 7. Pertussis toksini-NAD etkileşimi	31
Şekil 8. Pertussus-NAD etkileşimi yüzey görünümü	32
Şekil 9. Pertussis toksin-NAD etkileşimi sıcak noktaları	33
Şekil 10. Gel filtrasyon kromatografisi kalibrasyon grafiği	34
Şekil 11. Standart Grafiği	34
Şekil 12. Pertussis toksinin kromotografik yöntemlerle eldesi	35
Şekil 13. PT yüzde canlılık deneyleri	36
Şekil 14. PT FA-NAD etkileşimi ısı kayma ölçümü	37

TABLULAR

Tablo 1. PT toksik kısmın amino asit dizilimi	29
Tablo 2. Bağlanma Enerjileri	31

ÖZGEÇMİŞ

Ad:	Fatih
Soyad:	Dallar
Doğum Yeri:	Bulgaristan / Rousse
Doğum Tarihi:	12/12/1974
Görev Yeri:	Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik A.D.
Yabancı Dil:	İngilizce,Bulgarca,Rusça
E-Posta Adresi	fnice1@gmail.com
Tarih	Eğitim
7/7/1997	Trakya Üniversitesi Makina Müh. Bölümü
Varsa, İyi Klinik Uygulamalar Kapsamında Aldığı Eğitimler.	
Akademik Ünvanları	
İş Tecrübesi	
1997 - 2004	Gama Reklam Ar-Ge
2004 - halen	Firma Sahibi
Varsa, Araştırmacı Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	
Varsa, Monitör/İzleyici Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	
Varsa, Saha Görevlisi Olarak Katıldığı Klinik Araştırmalar	

EKLER