

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ KULLANILARAK BAZI
ENZİM VE PROTEİNLERİN ALOSTERİK ETKİ İLE İNHİBİSYON VE
AKTİVASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Murat YAŞAR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZİK

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ KULLANILARAK BAZI
ENZİM VE PROTEİNLERİN ALOSTERİK ETKİ İLE İNHİBİSYON VE
AKTİVASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Murat YAŞAR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZİK

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ KULLANILARAK BAZI
ENZİM VE PROTEİNLERİN ALOSTERİK ETKİ İLE İNHİBİSYON VE
AKTİVASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Murat YAŞAR

FİZİK

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu tez
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından FDK-2020-5408 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2022

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ KULLANILARAK BAZI
ENZİM VE PROTEİNLERİN ALOSTERİK ETKİ İLE İNHİBİSYON VE
AKTİVASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Mehmet Murat YAŞAR

FİZİK

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 04/07/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail Hakkı SARPÜN (Danışman)

Prof. Dr. Abdullah KAPLAN

Prof. Dr. Rıza ERDEM

Doç. Dr. Mert ŞEKERCİ

Doç. Dr. Hasan ÖZDOĞAN

ÖZET

MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMLERİ KULLANILARAK BAZI ENZİM VE PROTEİNLERİN ALOSTERİK ETKİ İLE İNHİBİSYON VE AKTİVASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Mehmet Murat YAŞAR
Doktora Tezi, Fizik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail Hakkı SARPÜN

Temmuz 2022; 59 sayfa

Günümüzde birçok alanda olduğu gibi sağlık alanında da moleküler dinamik simülasyon (MDS) yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MDS yöntemleri, çok atomlu sistemlerin incelenmesinde deneysel analizlerde kullanılan sarf malzeme ve harcanan zaman düşünüldüğünde bilim insanları tarafından bir tercih sebebi olmaktadır. MDS yöntemleri ile ilaç tasarımı alanında enzimlerin kataliz fonksiyonlarını araştırmak mümkündür. Bu tez çalışmasında Covid Temel Proteaz (MPro) ve Karbonik Anhidraz II (CA II) enzimlerinin alosterik mekanizma ile inhibe edilip edilemeyeceği MDS hesaplamaları ile araştırıldı. Çalışmada her bir enzimin hem ligandsız hem ligandlı yapıları için Amber-18 Moleküler Dinamik Simülasyon Paketi kullanılarak 200 ns'lik simülasyonlar gerçekleştirildi.

Çalışmaya konu olan enzimlerden biri 6M03 PDB erişim kodlu SARS-CoV-2 virüsünün salgıladığı MPro'dur. Bu enzim viral replikasyon ve transkripsiyon için gerekli olan kritik bir sistein enzimidir. İnhibisyonu, bulaşıcı viral partiküllerin üretimini durdurabilir ve böylece COVID-19 enfeksiyonunun hastalık semptomlarını hafifletebilir. Bu nedenle, salgının başlangıcından bu yana MPro, Sars-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisi için ilaç geliştirme araştırmalarının merkezinde yer almaktadır. Bu amaca yönelik olarak, bu araştırmada DrugBank veri tabanındaki FDA onaylı ilaçlar Moleküler Kenetlenme (MK) tekniği ile sanal tarama deneyine tabi tutuldu. MPro'nun katalitik bölgesinden uzağa güçlü bir şekilde bağlanan ilaçlar MK tekniği kullanılarak belirlendi. En güçlü bağlanma skoruna sahip olan Dihidroergotamin (DHE) ilacı MDS çalışması için seçildi. Bu tez çalışmasına konu olan diğer enzim ise PDB veri bankasında 4QY3 erişim kodlu CA II metalo-enzimidir. Halihazırda başta glokom olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan CA II'nin inhibisyonu temeline dayanan birçok ilaç mevcuttur. Tüm bu ilaçların inhibisyon mekanizmasında inhibitör, CA II'nin aktif bölgesinin içinde bulunan Çinko (Zn) ile yarı kovalent karakterli bağ yapar. Bu çalışmaya konu olan CA II inhibitörü 2-[(S)-benzylsulfinyl]benzoic acid (3G1) ligandının aktif bölge içerisinde Zn atomu ile direkt etkileşim yapmadan aktif bölge dışında bir noktaya bağlanarak inhibisyon gerçekleştirdiği literatürde gösterilmiştir. Bu çalışmada alosterik etki ile CA II'yi inhibe eden 3G1 ligandının inhibisyon mekanizması incelendi.

Alosterik inhibisyon etkisini ortaya koymak için DHE-MPro kompleksi, Apo-MPro, 3G1-CA II ve Apo-CA II sistemlerinin MDS'lerinden elde edilen yörünge dosyaları kullanılarak hidrojen bağlama analizi, dinamik çapraz korelasyon, iletişim eğilimi, dinamik etkileşim amino asit ağ analizi ve transfer entropisi gibi hesaplama araçları kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, DHE'nin Protomer A ve Protomer B arasında yer

alan GLU278 ve THR280 ile hidrojen bağlama etkileşimlerinin, MPro'nun katalitik bölgesinde CYS145'in yan zincirinin yapısını etkilediğini desteklemektedir. CYS145'in katalitik döngüdeki rolü göz önüne alındığında, bu yapısal değişikliğin MPro'yu inhibe etmek için bir mekanizma olması muhtemeldir. CA II enziminde ise TYR7 ve ASN11 amino asitleriyle hidrojen bağı yaparak bağlanan 3G1 ligandının enzimin aktif bölgesinde yer alan GLN92, GLY102, GLN103, GLN104, ASP110, LYS113 ve THR198 amino asitlerin dihedral açılarında belirgin değişimlere yol açtığı gözlemlendi. Aktif bölgesi içinde oluşan bu yapısal değişikliğin H₂O, CO₂, CO₃⁻² ve OH döngüsünü etkilemesi yüksek olasılıklı olduğu değerlendirilebilir. Bu döngünün sekteye uğraması ile inhibisyonun gerçekleştiği düşünülebilir.

Elde edilen bulgular MPro ve CA II enzimlerinin alosterik etki ile inhibe mekanizmaları hakkında hangi amino asitlerin manipüle edilmesi gerektiği hususunda önemli bilgiler taşımaktadır. Bu bilgilerin sözü edilen enzimlerin yeni alosterik inhibitörlerinin tasarımında yararlı olacağı düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Alosterik Etki, CA II, İnhibisyon, Moleküler Dinamik Simülasyon, MPro.

JÜRİ: Prof. Dr. İsmail Hakkı SARPÜN

Prof. Dr. Abdullah KAPLAN

Prof. Dr. Rıza ERDEM

Doç. Dr. Mert ŞEKERCİ

Doç. Dr. Hasan ÖZDOĞAN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INHIBITION AND ACTIVATION OF SOME ENZYMES AND PROTEINS BY ALLOSTERIC EFFECT USING MOLECULAR MODELING METHODS

Mehmet Murat YAŞAR
PhD Thesis in Physics Department

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı SARPÜN

July 2022; 59 pages

Molecular dynamic simulation (MDS) methods are widely used in the field of health, as in many other fields. MDS methods are preferred by scientists considering the consumables used in experimental analyzes and the time spent in the examination of polyatomic systems. It is possible to investigate the catalysis functions of enzymes in the field of drug design with MDS methods. In this thesis, it was investigated whether Covid Basic Protease (MPro) and Carbonic Anhydrase II (CA II) enzymes can be inhibited by allosteric mechanism or not by MDS calculations. In the study, simulations of 200 ns were performed using the Amber-18 Molecular Dynamics Simulation Package for both ligand-free and ligand-based structures of each enzyme.

One of the enzymes subject to the study is MPro secreted by the SARS-CoV-2 virus with the access code 6M03 PDB. This enzyme is a critical cysteine enzyme required for viral replication and transcription. Its inhibition can stop the production of infectious viral particles and thus alleviate the disease symptoms of COVID-19 infection. Therefore, since the beginning of the epidemic, MPro has been at the center of drug development research for the treatment of Sars-CoV-2 infection. For this purpose, FDA-approved drugs in the DrugBank database were subjected to a virtual screening experiment with Molecular Docking (MK) technique in this study. Drugs that bind strongly away from the catalytic site of MPro were identified using the MK technique. The drug Dihydroergotamine (DHE) with the strongest binding score was selected for the MDS study. The other enzyme that is the subject of this thesis is the CA II metallo-enzyme with access code 4QY3 in the PDB database. There are many drugs based on the inhibition of CA II, which are currently used in the treatment of many diseases, especially glaucoma. In the inhibition mechanism of all these drugs, the inhibitor makes a semi-covalent bond with Zinc (Zn) in the active site of CA II. It has been shown in the literature that the CA II inhibitor 2-[(S)-benzylsulfinyl]benzoic acid (3G1) ligand, which is the subject of this study, performs inhibition by binding to a point outside the active site without interacting directly with the Zn atom in the active site. In this study, the inhibition mechanism of 3G1 ligand, which inhibits CA II with allosteric effect, was investigated.

Hydrogen bonding analysis, dynamic cross-correlation, communication bias, dynamic interaction amino acid network analysis using trajectory files obtained from MDSs of DHE-MPro complex, Apo-MPro, 3G1-CA II and Apo-CA II systems to reveal the allosteric inhibition effect. and computational tools such as transfer entropy were used. The obtained results support that the hydrogen bonding interactions of DHE with GLU278 and THR280 located between Protomer A and Protomer B affect the structure

of the side chain of CYS145 in the catalytic site of MPro. Given the role of CYS145 in the catalytic cycle, this conformational change is likely to be a mechanism for inhibiting MPro. In CA II enzyme, it was observed that the 3G1 ligand bound by hydrogen bonding with amino acids TYR7 and ASN11 caused significant changes in the dihedral angles of amino acids GLN92, GLY102, GLN103, GLN104, ASP110, LYS113 and THR198 in the active site of the enzyme. It can be considered that this structural change occurring in the active site is highly likely to affect the H₂O, CO₂, CO₃²⁻ and OH cycles. It can be thought that inhibition occurs with the interruption of this cycle.

The findings have important information about the allosteric effect and inhibition mechanisms of MPro and CA II enzymes, and which amino acids should be manipulated. It is thought that this information will be useful in the design of new allosteric inhibitors of the mentioned enzymes.

KEYWORDS: Allosteric Effect, CA II, Inhibition, Molecular Dynamics Simulation, MPro.

COMMITTEE: Prof. Dr. İsmail Hakkı SARPÜN

Prof. Dr. Abdullah KAPLAN

Prof. Dr. Rıza ERDEM

Assoc. Prof. Dr. Mert ŞEKERCİ

Assoc. Prof. Dr. Hasan ÖZDOĞAN

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının yapılması planlanırken elde edilecek olan sonuçların istenilen doğrultuda çıkıp çıkmayacağı konusunda büyük bir heyecan yaşadım. Bu uzun süreçte gerek protein yapılarının incelenmesinde gerekse yapılan analizlerde karşılaşılan her bir sorun veya engel aşıldığında doğru bir araştırma konusu olduğu hissini taşıdım. Seçilen konu, sağlık başta olmak üzere insanoğlu için bir nebze de olsa fayda sağlıyor olması, çalışma hırslımı daha da arttırmaktadır.

Bu tez çalışmasında benden desteklerini esirgemeyen başta Danışman'ım Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı SARPÜN'e ve hem simülasyon programlarında hem analiz yöntemlerinde hem de yapıların incelenmesinde öncülük eden İkinci Danışman'ım Sayın Prof. Dr. Erol EROĞLU'ya, Tez İzleme Komite'mde bulunan Sayın Prof. Dr. Abdullah KAPLAN'a ve Sayın Prof. Dr. Rıza ERDEM'e, çalışma süresince hep yanımda olan Arş. Gör. Dr. Nuri YORULMAZ ve Arş. Gör. Ekrem YAŞAR'a, manevi olarak başta rahmetli babam Hüseyin YAŞAR olmak üzere eşim Gözde YAŞAR ve diğer aile üyelerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	8
3. MATERYAL ve METOT	12
3.1. Moleküler Dinamik Simülasyon	12
3.2. Kök Ortalama Kare Sapması.....	16
3.3. Kök Ortalama Kare Dalgalanması	17
3.4. Dinamik Çapraz Korelasyon	18
3.5. Amino asit Etkileşim Ağı	18
3.6. Transfer Entropi	19
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	24
4.1 6M03 için RMSD	24
4.2 6M03 için RMSF.....	25
4.3 6M03 için İki Amino asit Arası Mesafe.....	26
4.4 6M03 için Hidrojen Bağı Analizi.....	27
4.5 6M03 için DCC	31
4.6 6M03 için İletişim Eğilimi	33
4.7 6M03 için Amino asit Etkileşim Ağı	36
4.8 6M03 için Transfer Entropi.....	37
4.9 4QY3 için RMSD	41
4.10 4QY3 için RMSF.....	42
4.11 4QY3 için Dinamik Çapraz Korelasyon	42
4.12 4QY3 için İletişim Eğilimi.....	43
4.13 4QY3 için Amino Asit Etkileşim Ağı.....	44
4.14 4QY3 için Dihedral Açısı Analizi.....	45

4.15 4QY3 için Transfer Entropi.....	47
5. SONUÇLAR	50
6. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Moleküler Modelleme Yöntemleri Kullanılarak Bazı Enzim ve Proteinlerin Alosterik Etki ile İnhibisyon ve Aktivasyonlarının Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

04/07/2022

Mehmet Murat YAŞAR

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

$\text{\AA}$	: Angström
τ	: Gecikme Zamanı
r	: Yerdeğiştirme
q	: Elektriksel Yük
V	: Potansiyel
ϵ_0	: Dielektrik Sabiti
F	: Kuvvet
t	: Zaman
m	: Kütle
k_b	: Boltzmann Sabiti
χ_1	: Çi Açısı
Ψ	: Psi Açısı
Φ	: Fi Açısı

Kısaltmalar

RMSD	: Kök Ortalama Kare Sapması
RMSF	: Kök Ortalama Kare Dalgalanması
DCC	: Dinamik Çapraz Korelasyon
CP	: İletişim Eğilimi
RIN	: Amino Asit Etkileşim Ağı
TE	: Transfer Entropi
MDS	: Moleküler Dinamik Simülasyon
CA	: Karbonik Anhidraz

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

DRN : Dinamik Amino Asit Ağ Analizi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Amber Simülasyon Programının işleyiş algoritması.....	13
Şekil 3.2. 4QY3 erişim kodlu CA II Metallo-enzimi.....	22
Şekil 3.3. 6M03 erişim kodlu Covid-19 Virüsü.....	22
Şekil 3.4. 6M03 erişim kodlu Covid-19 Virüsünün çalışma mekanizması.....	23
Şekil 4.1. 6M03'ün a) heterodimer yapısı; b) DHE bağlanma bölgesi; c) CYS145 ile HIS41 amino asitlerinin konumları.....	24
Şekil 4.2. 6M03 kodlu molekül için RMSD değerleri.....	25
Şekil 4.3. 6M03 kodlu molekülün; a) Protomer A; b) Protomer B için RMSF değerleri.....	26
Şekil 4.4. 6M03 kodlu molekül için HIS41-CYS145 arası mesafe değerleri.....	27
Şekil 4.5. 6M03 kodlu molekül için Hidrojen Bağı değerleri.....	28
Şekil 4.6. 6M03 için CYS145'in dihedral açısı ve CYS145 ile HIS41 arası mesafe.....	30
Şekil 4.7. 6M03'ün; a) DHE-MPro aktif; b) DHE-MPro inaktif; c) Apo-MPro DCC Değerleri.....	32
Şekil 4.8. 6M03'ün; a) DHE-MPro aktif; b) DHE-MPro inaktif; c) Apo-MPro; d) DHE-MPro ile Apo-MPro arasındaki fark durumları için Cp Değerleri.....	34
Şekil 4.9. 6M03 için RIN değerleri.....	36
Şekil 4.10. 4QY3'ün 3G1-CA II kompleksi ve 3G1'in 2 boyutlu yapısı.....	41
Şekil 4.11. 4QY3 kodlu molekül için RMSD değerleri.....	41
Şekil 4.12. 4QY3'ün Apo-CA II ve 3G1-CA II komplekslerinin RMSF değerleri.....	42
Şekil 4.13. 4QY3 a) Apo-CA II; b) 3G1-CA II için DCC değerleri.....	43
Şekil 4.14. 4QY3 a) Apo-CA II; b) 3G1-CA II için CP değerleri.....	44
Şekil 4.15. 4QY3 3G1-CA II ile Apo-CA II arası Fark CP değerleri.....	44
Şekil 4.16. 4QY3'ün bazı amino asitleri için dihedral açı değerleri.....	47
Şekil 4.17. 4QY3 Apo-CA II için TE değerleri.....	48
Şekil 4.18. 4QY3 3G1-CA II için TE değerleri.....	48
Şekil 4.19. 4QY3 3G1-CA II ile Apo-Mpro için TE Fark değerleri.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Amber Simülasyon Programı örnek minimizasyon giriş dosyası.....	14
Çizelge 3.2. Amber Simülasyon Programı örnek ısıtma giriş dosyası.....	14
Çizelge 3.3. Amber Simülasyon Programı örnek üretim giriş dosyası.....	15
Çizelge 4.1. Alosterik ve Katalitik bölgelerde bulunan bazı amino asit çiftleri için CP değerleri.....	34
Çizelge 4.2. Her bir domain için Artan Azalan BC ve L değerleri.....	38
Çizelge 4.3. Apo-Mpro bazı amino asitler için TE değerleri.....	38
Çizelge 4.4. DHE-Mpro bazı amino asitler için TE değerleri.....	39
Çizelge 4.5. DHE-Mpro ile Apo-Mpro arasındaki fark TE değerleri.....	39
Çizelge 4.6. 4QY3 için Artan Azalan ΔBC ve ΔL değerleri.....	45

1. GİRİŞ

Moleküler Dinamik (MD), bir yapıyı oluşturan atomların veya moleküllerin fiziksel hareketlerini ve davranışlarını betimlemek için bilim dünyasında araştırmacılar tarafından kullanılan bir bilgisayar simülasyon yöntemidir. Araştırılması düşünülen yapıların atom ve moleküllerinin belirli bir süre boyunca etkileşmelerine izin verilerek ilgili yapının dinamikleri hakkında durum tespitleri yapılabilmektedir. Binlerce atom veya moleküllerden oluşan yapıların iç dinamiklerine bakıldığında atomlar arasında meydana gelen etkileşimlerden dolayı oluşan kuvvetlerin tanımlanmasıyla sayısal analizler yapılmaktadır. Bu doğrultuda simülasyon yöntemleri, kuvvet alanları kullanılarak sanal ortamda çok atomlu yapıların durumları hakkında bir öngörü sunabilmektedir. Moleküllerin dinamiklerini araştırmak amacıyla kullanılan simülasyon yöntemi 1950 yıllarında geliştirilmiştir ve günümüzde halihazırda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (Frenkel 2002).

Moleküler Dinamik Simülasyon (MDS) yöntemleri, fizik, kimya, biyofizik ve tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle canlıların yaşamları boyunca karşılaşabilecekleri hastalıkları önlemek veya tedavi etmek amacıyla ilaçların geliştirilmesinde kullanılan teknikler arasında yer almaktadır. MDS yöntemler bu bağlamda laboratuvar ortamları gerektirmeyen, deneme yanılma yöntemlerinden ziyade sayısal analizler yapabilmeye olanak sağlamaktadır. Özellikle insan vücudunda çeşitli kimyasal tepkimeleri yapan proteinlerin işleyiş mekanizmalarını ve başka yapılardan etkilenip etkilenmeyeceğini analiz etmede ön plana çıkmaktadır (Schlick 2010).

Moleküler bir yapı göz önüne alındığında binlerce atomdan oluşmakta ve bu gibi çok atomlu sistemlerin analizleri analitik olarak yapılamamaktadır. Birçok etkileşim mekanizmasını bünyesinde barındıran moleküler sistemler incelenirken simülasyon yöntemleri büyük katkı sağlamaktadır. MDS yöntemleri, mikrokronik toplulukların termodinamik özelliklerini inceleme ve araştırma olanağı sunarak karmaşık sistemlerin işleyiş mekanizmalarının anlaşılmasında vazgeçilmez duruma gelmiştir (Kumar 2011).

MDS yöntemleri çok atomlu bir yapıyı belirli bir algoritmaya göre simüle eder. Algoritma birkaç adımdan oluşmaktadır. İlk olarak, yapıyı oluşturan atomların koordinatları gibi temel bilgileri içeren başlangıç verilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin; halihazırda kullanılan bazı simülasyon yöntemleri, incelenecek olan sistemlerin üç boyutlu yapılarını, X-ışını kristalografisi veya Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisinden deneysel olarak elde edilen bilgileri kullanmaktadır. Bu giriş dosyalarında her bir atomun koordinatları, diğer atomlarla oluşturdukları bağlar gibi bilgiler yer almaktadır. Gerekli bilgileri içeren veriler kullanılarak sistem minimize edilir ve sistemi oluşturan atomların hızları değiştirilerek doğal ortamındaki sıcaklığa ulaşacak şekilde simüle edilir. Bu işlemlerin ardından denge durumuna gelen yapıların simülasyon üretim adımlarına geçilir. Moleküllerin sürekli dengede olmasını sağlamak için bu aşamada atomların hızları kontrol edilerek doğal ortamları korunmaya çalışılır. Bir yapı ne kadar doğal simüle edilirse analiz sonuçları o kadar verimli olacaktır. Gerçekleştirilen simülasyon adımlarının belirli bir sürede olması gerekmektedir. Çok uzun olması, yapılan analizlerin aylarca sürmesi anlamına gelirken, çok kısa tutulması da gerçeklikten uzaklaşması demektir. Simülasyon sonunda elde edilen çıktılar çeşitli analiz yöntemleri ile işlenerek incelenen yapılar hakkında istenilen sonuçlar elde edilebilmektedir.

Bir veya daha fazla amino asidin bir araya gelerek zincir şeklinde biyomoleküller veya makromoleküller oluşturması protein olarak tanımlanmaktadır. Proteinler, canlı organizmalar içinde, metabolik faaliyetlerde bulunmak, işlevlerine özgü kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek, hücrelere ve canlı organizmalara ürün sağlamak gibi birçok fonksiyonlara sahiptirler. Vücudumuzda bulunan hücreler, dokular, organlar gibi tüm yapıtaşları, protein olmadan var olamazlar. Kaslarda, ciltte, iskelet sisteminde ve vücudun diğer birçok bölgesinde önemli ölçüde protein bulunmaktadır. Protein, vücudun ağırlık olarak yaklaşık %20'lik kısmını oluşturmaktadır. Bu anlamda vücudumuzda sudan sonra en çok bulunan bileşen proteindir. Enzimler, hormonlar ve antikorlar hepsi birer proteindir. Proteinler aynı zamanda sinir sistemi boyunca kimyasal bilgi taşıyıcı olarak görev yaparlarken kandaki oksijenin taşınmasını da sağlarlar. Her bir protein, kendine özgü yapısından dolayı diğer proteinlerden farklıdır. Bunun yanı sıra proteinler, tek başlarına yapamadıkları belirli bir işlevi gerçekleştirmek için birlikte de çalışabilirler. Proteinler canlı organizmaların temel öğelerinden olup hücredeki birçok reaksiyonda işlevleri vardır. Protein, genellikle kararlı yapıdaki bir biyolojik molekülü belirtmek için kullanılır (Lodish 2004). Proteinler, genlerde kodlanmış bilgiler kullanılarak amino asitlerin bir araya gelmiş halidir. Her proteinin, bu proteini kodlayan genin nükleotid dizisi tarafından belirlenen kendine özgü bir amino asit dizisi vardır. Genetik kod, kodonlar adı verilen üç nükleotitli bir settir ve her üç nükleotit kombinasyonu bir amino asidi belirtir, örneğin AUG (adenin-urasil-guanin) metiyonin kodudur (Van Holde 1995). Proteinler tam olarak katı moleküller olarak tanınmaz. Elastik yapılarından dolayı işlevlerini yerine getirirken birden fazla farklı yapıda bulunabilirler. Bulundukları bu yapılar, konformasyonel değişiklikler olarak tanımlanır. Konformasyonel değişiklikler düşünüldüğünde genellikle bir substrat yapının, bir enzimin aktif bölgesine veya kimyasal tepkimeye katılan proteinin fiziksel bölgesine bağlanmasıyla katalize olur. Buna ek olarak çözelti içinde termal titreşim ve diğer moleküllerle çarpışma yoluyla yapılarında farklılaşmaya da uğrayabilirler (Mathews 1996). Günümüzde herhangi bir proteinin yapısını ve işlevini incelemek için yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında X-ışını kristalografisi ve NMR yöntemleri mevcuttur.

Organizmalarda biyolojik katalizör olarak görev yapan proteinlere enzim denilmektedir. Enzimler kimyasal reaksiyonları hızlandıran yapılardır. Enzim, substratları “ürün” olarak ifade edilen farklı moleküllere dönüştürür. Bir hücredeki yaklaşık bütün metabolik aşamalarda ve bu aşamaların yaşamı sürdürecekt kadar yüksek hızlarda gerçekleşmesi için enzim katalizine ihtiyacı vardır (Stryer 2002). Günümüzde enzimlerin 5000'den fazla biyokimyasal tepkimeyi katalize ettiği bilinmektedir (Schomburg 2013). Enzimler, aktivasyon enerjilerini düşürerek reaksiyon hızını artırma eğilimindedirler. Enzimlerden bazıları substratın ürüne dönüşmesinin daha hızlı gerçekleşmesini sağlayabilir. Kimyasal olarak enzimler katalizöre benzerler ve bunun yanı sıra kimyasal tepkimelerde de tüketilmezler. Bir enzimde meydana gelen aktivite, diğer moleküllerden etkilenebilir. Örneğin; inhibitörler enzim aktivitesini azaltırken aktivatörler aktiviteyi arttırırlar. Tıpta tedavi amacıyla kullanılan birçok ilaç, enzim inhibitörüdür. Enzimler genellikle substratlarından daha büyük yapılara sahiptir. Yapılarının sadece küçük bir kısmı doğrudan katalize görevi yapar ve buna katalitik bölge denir (Furnham 2014). Katalitik bölge, amino asitlerin substratları yönlendirdiği bir veya daha fazla bağlanma bölgesinin yanında bulunur. Katalitik ile bağlanma bölgesi, enzime ait olan aktif bölgeyi oluşturur (Suzuki 2015). Enzimler, küçük bir molekölün bağlanmasıyla meydana gelen aktiviteyi artıran veya azaltan konformasyonel bir

değişikliğe neden olduğu alosterik bölgeler de içerebilir (Krauss 2003).

Canlı organizmalarda bulunan biyolojik moleküller arasındaki etkileşimler, genellikle bu moleküllerin şekline ve yapısına bağlıdır. Birçok etkileşim enzimlere bağlıdır ve bu enzimlerin bazı biyolojik reaksiyonları inhibe veya aktive etme kabiliyeti, enzimin farklı bir kısmına bağlanan başka bir molekülden kaynaklanabilir. Buna alosterik etki denir. Böyle bir etki, enzimin şeklinde değişikliklere neden olarak işlevini bozabilir. Alosterik etki, özellikle biyokimyada moleküllerin ve enzimlerin meydana getirmiş olduğu kimyasal tepkimeleri değiştirmek için kullanılır. Örneğin; tedavi amacıyla kullanılacak olan bir ilaç, bir enzimin aktif bölgesine bağlanırken bir substratın o enzime bağlanmasını engelleyerek enzim aktivitesinde bir azalmaya neden olur. Fakat alosterik etkide ise bir etkileyici bileşik, enzimin alosterik bölgesine (aktif bölgeden uzak bir bölge) bağlandığında enzim aktivitesinde değişiklik meydana getirir. Alosterik inhibitörler veya aktivatörler, enzimde konformasyonel (özellikle aktif bölgenin şeklinde) bir değişikliğe yol açarak aktivitesinde bir deformasyonun meydana gelmesine neden olur. Bu sayede alosterik etki gösteren yapılar, enzim aktivitesinde bir artışa neden olan aktivatör veya enzim aktivitesinde bir azalmaya neden olan inhibitör olarak görev alabilirler (Abdel 2015). Alosterik etki gösteren bölgeler, tedavi edici ilaç tasarımları için kullanılabilir. Klasik inhibisyon mekanizmalarına karşı tercih edilen tedavi edici ilaç olarak alosterik inhibitörlerin kullanılmasının avantajları yadsınamayacak boyuttadır. Günümüzde kullanılan klasik yöntemleri temel alan ilaçların meydana getirdiği birçok yan etki, alosterik etki gösteren ilaçlar sayesinde elimine edilebilir.

2020 yılının ilk çeyreğinden itibaren küresel bir pandemiye neden olan virüs Coronaviridae ailesine ait tek sarmallı bir RNA (+ssRNA) virüsüdür (Hu vd. 2021). Koronavirüs genomunun boyutu 26 ila 32 kb aralığındadır ve 9680 amino asit poliproteinini kodlayan 6-11 açık okuma çerçevesi (ORF, Open Read Frame) içerir. İlk ORF, 16 yapısal olmayan proteini (nsps) kodlayan genomun yaklaşık %67'sini oluştururken, kalan ORF'ler aksesuar ve yapısal proteinleri kodlar (Guo vd. 2020; Kumar vd. 2020). Kodlanmış 16 nsps arasından iki viral sistein proteazı, yaygın olarak 3CLPro veya MPro olarak adlandırılan ana proteaz (nsp5) ve papain benzeri proteazın (nsp3) SARS-CoV-2'nin replikasyon sürecinde kritik rol oynadığı bilinmektedir. ORF'ler, nsps'nin yanı sıra dört ana yapısal proteini de kodlar: Sivri yüzey çıkıntısı (S), zar (M), nükleokapsid proteini (N), zarf (E) ve yardımcı proteinler. N-terminal glikosillenmiş ektodomain, üç transmembran alanından (TM) ve uzun bir C-terminal CT alanından oluşan M proteininin N-terminal ucunda bulunur (Chan vd. 2020). Viral enfeksiyonun bu ilk kritik adımı, bir tip I membran proteini olan ve bir trimer oluşturan trimerik spike S glikoproteini tarafından katalize edilir, transmembran segmenti tarafından viral membrana sabitlenir ve virion yüzeyini büyük ektodomain ile süsler (Zhang vd. 2021). Replikasyon döngüsü için, SARS-CoV-2'nin bir konakçı hücreye giriş mekanizması, bir konakçı hücrenin S proteininin aracılık ettiği ACE2 reseptörüne demirlenmesiyle başlar, ardından proteolitik aktivasyonu, endositozu ve membran füzyonu gelir (Jackson vd. 2022). ACE2'ye bağlanmanın yanında, S proteini, membran füzyonunu desteklemek için konformasyonel değişime uğrar (Zhou vd. 2020). Viral enfeksiyondaki önemli rolleri ve enfeksiyon sırasında konakçılarda koruyucu humoral ve hücre aracılı bağışıklık tepkileri ortaya çıkarması nedeniyle (Duan vd. 2020), S proteini, yeni antiviral terapötikler tasarlanmasının yanı sıra mevcut aşılar için birincil hedeflerden biridir (Amanat vd. 2020). SARS-CoV-2'nin S proteini, enfekte hücrelerde furin gibi proprotein dönüştürücüler

tarafından S1 ve S2 alt birimlerine bölünür (Hoffmann vd. 2020). S proteininin bölünmüş alt birimleri (S1 ve S2), farklı işlevlerle kovalent olmayan bir şekilde birbirleriyle ilişkili kalır: yeni hedef hücrede, S1 alt birimi reseptörü bağlarken, diğer yandan S2 alt birimi, S proteinini virion zarına tutturur ve membran füzyonuna aracılık eder (Jackson vd. 2022).

SARS-CoV-2 virüsünün ana proteazı (MPro veya 3CLPro olarak adlandırılır), viral replikasyon ve transkripsiyon için kritik olan bir sistein enzimidir. Bu nedenle, inhibisyonu, bulaşıcı viral partiküllerin üretimini durdurabilir ve böylece COVID-19 enfeksiyonunun hastalık semptomlarını hafifletebilir (Anand vd. 2003; Ullrich ve Nitsche, 2020). MPro, katalitik merkezinde bir sistein-histidin dyad içerir ve viral poliproteinleri, pp1a ve pp1ab'yi, bölünme sekansları LQ↓(S,A,G) ile 11 farklı bölgede bölerek 12 küçük fonksiyonel protein üretir (Lee vd. 1991; Chan vd. 2020; Zhang vd. 2020; Ziebuhr vd. 2000). MPro, üç farklı alt alandan (alan I, II ve III) oluşan 306 amino asitlik bir uzunluğa sahiptir. Substrat bağlama bölgesi, antiparalel β -katman yapılarından oluşan ortak bir kıvrımı paylaşan alan I (8–101 amino asitleri) ve alan II (102–184 amino asitleri) arasındaki bir yarıktadır bulunur (Zhang vd. 2020). Alan III (201–303 amino asitleri), beş α -helisinden oluşan bir antiparalel küresel kümeden oluşur ve MPro aktivitesi için gerekli olan MPro dimerizasyonunda rol alır. Model substrat olarak Ac-VAL-LYS-LEU-GLN-ACC polipeptidi kullanılarak MPro'nun proteolizinin moleküler mekanizmalarını araştırmak için bir QM/MM modelleme çalışması yapılmıştır (Świderek ve Moliner 2020). Sonuçlar, dört adımda gerçekleşen MPro'nun etki mekanizmasının, diğer sistein proteazlarından biraz farklı olduğunu göstermiştir. Katalitik döngünün ilk adımı, substrat S1 cebinin etrafına geldiğinde polarize olan CYS145'in kükürt atomuna (SG) bağlı hidrojenin, HIS41'in imidazol halkasının azotuna (NE2) aktarılmasıyla başlar. Geçmişte incelenen koronaviral hedefler arasında MPro, özellikle 2000'lerin başındaki ilk SARS-CoV salgınının ardından büyük ilgi görmüştür (Anand vd. 2003; Ullrich ve Nitsche 2020). S proteini, RNA'ya bağlı RNA-polimeraz (RdRp, nsp12), NTPase/helikaz (nsp13) ve papain benzeri proteaz (PLPro) da alternatif koronaviral ilaç hedefleri olarak kabul edilmektedir (Wu vd. 2020).

COVID-19 salgınının başlangıcından bu yana, küçük moleküllerin kimyasal veri tabanlarının sanal tarama yöntemi kullanılarak taranmasını içeren ve bunları MPro'ya karşı öngörülen bağlanma enerjisine göre sıralamayı içeren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu strateji, deneylerde sentezlenecek, elde edilecek veya değerlendirilecek en iyi adayların seçilmesinde oldukça faydalıdır. Bu sanal tarama çalışmalarının çoğunda, MPro'nun katalitik bölgesi öncelikle uygun kovalent veya kovalent olmayan bağlayıcıları bulmayı hedeflemiştir (Banerjee vd. 2021; Macip vd. 2022). Bazı çalışmalarda, MPro'nun dimerizasyon sürecini önlemek için küçük moleküllerin bağlanma hedefi olarak MPro'nun protomerleri arasındaki arayüz bölgesi seçilmiştir. Çünkü MPro sadece dimerik formdayken işlevini yerine getirebilir (Goyal vd. 2020; Liang vd. 2020; Ton vd. 2020; Gupta vd. 2021). MPro inhibisyonuna dayalı ilaç geliştirme çalışmaları, günümüzde çeşitli araştırma grupları tarafından deneysel ve in silico yöntemler kullanılarak yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Bu çalışmalardaki en son durum yakın zamanda Lv vd. (2022) tarafından derleme makalede verilmiştir.

Bu araştırmayı başlatmaktaki ana motivasyon, MPro'nun alosterik inhibitör bölgelerine sahip olabileceği varsayımına dayanarak bu enzimin alosterik inhibitörlerini araştırmaktır. Çünkü alosterinin tüm dinamik proteinlerin içsel bir özelliği olduğu ve bir proteinin konformasyonel topluluğunun yeniden dağılımından kaynaklandığı literatürde

yer almaktadır. Proteinlere ligand bağlanması neticesinde bir pertürbasyon ortaya çıkar bu durum popülasyonun yeniden dağılımına yol açar (Gunasekaran vd. 2004). Bu çalışmadaki ana hedef, MPro'nun olası alosterik bölgelerini aramak ve bu bölgelere bağlanan halihazırda onaylanmış ilaçların (başka hastalıkların tedavisi için onaylanmış) bu enzimi alosterik etki ile inhibe edip edemeyeceğini araştırmaktır. Yaklaşım olarak katalitik bölge dışındaki MPro ceplerine bağlanan ilaçları filtrelemek için DrugBank veri tabanındaki ilaçlara bazı doğrulama araçları kullanılarak kör yerleştirme prosedürü uygulandı.

Bu tez çalışmasına konu olan diğer enzim ise Karbonik Anhidraz olup, bu enzim tüm canlılarda var olan bir metalo-enzimdir. CA II enziminin en temel fonksiyonu dokularda



reaksiyonunu katalize etmektedir. Bu reaksiyonun vücuttaki birçok fizyolojik süreçte önemli fonksiyonu vardır. Halihazırda CA enziminin inhibisyonu temeline dayanan altı adet ilaç mevcuttur. CA'nın katalitik aktif bölgesinde çinko (Zn^{+2}) iyonu vardır. Çinko iyonu, enzimin inhibisyonu esnasında genellikle inhibitör ile yarı kovalent karakterli tetrahedral bir bağ yapısı gerçekleştirir. Mevcut ilaçların tamamının etki mekanizması bu şekildedir (Alterio vd. 2012). Bunun haricinde üç farklı inhibisyon mekanizması daha olduğu x-ışınları kristalografisi çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu üç mekanizmadan birincisinde, inhibitör aktif bölge içerisindeki Zn^{+2} iyonuna bağlı su molekülü ile hidrojen bağı yapmaktadır. İkincisinde enzim aktif bölgesinin ağzına inhibitör polar, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları ile bağlanarak, aktif bölge içerisine girip çıkan H^+ iyonu ve su trafiğini bozarak inhibisyon gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Üçüncüsünde ise inhibitör aktif bölge dışına yerleşmesine rağmen inhibisyon gerçekleştirmektedir. Bu mekanizmada, inhibitörün enzim aktif bölgesine proton akışında aktif rol oynayan HIS64 amino asidinin konformasyon değişimini engelleyerek inhibisyon yaptığı düşünülmektedir. Bunlara ilaveten bir de bilinmeyen mekanizma(lar) mevcuttur. Bu inhibitörlerin enzimin hangi noktasına bağlandığı henüz bilinmemektedir. Ancak bu moleküllerden birçoğu bulk yapılarından dolayı sterik engellere uğrayarak enzim aktif bölgesi içerisine yerleşmesi mümkün olmadığı açıkça ortadadır. Bu nedenle enzimi inhibe edebilecek olan inhibitörlerin aktif bölgeden belirli bir mesafede başka amino asitlere bağlanarak aktif bölgedeki amino asitleri alosterik etki ile dolaylı yollardan etkileyebilir.

İlaçların çoğunun vücut içindeki hedefi hücrel proteinlerdir. İlaç, hücre içerisine ulaştığında ilgili protein ile seçici şekilde etkileşimi neticesinde tedavi veya teşhis etkisi ortaya çıkar. 2002 yılında tamamlanan insan genoması çalışmaları sonuçlarına göre (Golden 2003), insan geni tarafından üretilen 6000 ile 8000 arasında farmakolojik açıdan ilaç hedefi olabilecek proteinin varlığı tahmin edilmiştir (Landry 2008). 2003 yılında yapılan bir çalışma, insan genoması çalışmalarında ortaya konulan proteinler arasından sadece 273 proteinin o günkü mevcut ilaçların hedefi olduğunu göstermiştir (Golden 2003). Günümüzde 330 civarında ilaç hedefi protein vardır ve bunlardan 270 kadarı insan genoması tarafından üretilen proteinler iken geriye kalanları ise patojen organizmalar (bakteri, virüs, mantar vs.) tarafından üretilenlerdir. CA, ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan popüler enzimlerden birisidir (Supuran 2008).

CA enzimin inhibisyonu temeline dayanan ilk ilaçlar 1950-1960 yılları arasında piyasaya çıkmıştır. Bunlar halihazırda kullanılmakta olan Acetazolamide, Methazolamide, Ethoxzolamide, Sulthiame ve Dichlorophenamide'dir. Bunlar diüretik (idrar söktürücü) ve antiepileptik (epilepsi tedavisi ilacı) olarak kullanılırken CA enzimi inhibisyonunun Glukoma (göz tansiyonu) tedavisinde de kullanılabileceğinin farkına varılmıştır (Supuran 2008). Bu bahsedilen ilaçlar halen göz tansiyonu tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten 1990'lı yıllarda damla formunda kullanılabilen iki göz tansiyonu ilaç daha piyasaya çıkmıştır. Bunlar Dorzolamide ve Brinzolamide olup öncekilere göre çok daha az istenmeyen yan etkiye sahiptir. Bu ilaçların tamamı sülfonamid fonksiyonel grubu içermekte olup, enzim aktif bölgesi içerisinde kofaktör olarak bulunan, katalitik merkezdeki Çinko atomu ile koordinasyon bağı yaparak inhibisyon işlevini yaptığı X-ışınları kristalografisi sonuçlarından görülmektedir. Ancak, D'Ambrosio (2015)'in yaptığı bir çalışmada, x-ışınları kristalografisi ve enzim kinetiği ölçümlerine göre bir molekülün (2-(Benzylsulfiny) benzoic acid) (3G1) CA enzimini yukarıda bahsedilen ilaçlardan farklı bir mekanizma ile inhibe ettiği gösterilmiştir. X-ışınları kristalografisi sonuçlarına göre yukarıda bahsedilen molekülün (inhibitör) klasik ilaçlar gibi çinko atomu ile bağ yapmayıp, 14 Å kadar uzak bir noktada polar etkileşimler ve (TYR7 ve ASN11 amino asitleri ile) hidrojen bağları yaparak bağlandığı gösterilmiştir. Buna ilaveten, Alp vd.'nin (2012)'de yaptığı çalışmada ikincil sülfonamid (tosilat grubu) içeren bazı moleküllerin CA I, II ve VI nolu izoenzimlerine karşı güçlü inhibitör etkisi gösterdiği rapor edilmiştir. Bu moleküller hakkında yapılan yorumda bulk yapılarından dolayı enzim aktif bölgesi içerisine girmesinin mümkün olmadığı ve diğer sülfonamid türevleri gibi çinko ile bağ yapmasının mümkün olamayacağı belirtilmiştir (Supuran 2015). Yukarıda bahsedilen moleküller, Supuran (2015) tarafından inhibitör mekanizması bilinmeyen moleküller olarak sınıflandırılmıştır.

Yapılan bir yayında bir inhibitörün (2-[(S)-benzylsulfiny]benzoic acid) CA II aktif bölgesi dışına bağlandığı x-ışınları kristalografisi çalışmasında gösterilmiştir (D'Ambrosio 2015). Bu ligantın alosterik etki ile inhibisyon yaptığı anlaşılmaktadır. Bu çalışmada bu alosterik etkinin mekanizmasının nasıl çalıştığı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Alosterik iletişim, herhangi bir proteinin bir bölgesindeki eylemin ya da hareketin, proteinin aktivitesini gerçekleştirdiği başka bir alana iletildiği işlemi tarif eder. Başka bir ifade ile birbirinden belirli bir uzaklıkta bulunan ve doğrudan bağlı olmayan iki amino asidin birbiriyle iletişim halinde olup olmadığını ve eğer bir iletişim varsa bu iletişimden kaynaklı durumların analizi entropi transferi ile açıklanabilmektedir (Hacısuleyman ve Erman 2017a). Entropi transferi, herhangi bir ana olay ya da durum altında birbirinden bağımsız iki alt olay ya da durumun dolaylı yollarla asimetric zaman içinde tek yönlü bilgi aktarımını ölçen istatistiksel bir yöntemdir (Schreiber 2000). Entropi transferi, bilim dünyasında birçok alanda uygulanan istatistiksel bir yöntem olup aynı zamanda moleküler araştırmalarda da herhangi bir sistemi oluşturan alt yapılar arasındaki etkileşimleri incelemek için de kullanılabilmektedir. Konum olarak birbirinden uzak olan herhangi iki amino asidin dalgalanmaları değerlendirilebilir ve bir amino asitten diğerine bilgi aktarımının olup olmayacağı araştırılabilir.

Bu doktora tez çalışmasının hedeflerinden biri sanal tarama sonucu MPro'nun dimer yapısının protomerleri arasına yerleşen DHE ilacının alosterik etki ile katalitik dyad (HIS41 ve CYS145) yapısına etki edip etmediğinin ortaya konulmasıdır. Bir diğer

hedef ise CA II aktif bölgesi dışına bağlandığı deneysel çalışma ile ortaya konulan 3G1 inhibitörünün nasıl alosterik etki gösterdiğinin mekanizmasının ortaya konulmasıdır. Bu hedefler vasıtasıyla, adı gecen enzimlerin alosterik inhibitörlerinin tasarımında alosterik etkiden ne şekilde yararlanılabileceğine dair önemli bilgiler edinilmesi amaçlanmıştır.

.



2. KAYNAK TARAMASI

Alp (2012) tarafından yapılan bir çalışmada iki insan sitozolik CA izoenzim I, II ve insan serum izozim VI'nın, bir dizi tosile edilmiş aromatik amin türevleri olan benzenesulfonamidler ile inhibisyonu üzerine araştırma yapılmıştır. Tosile edilmiş aromatik amin türevlerinin CA I, II ve VI izozimleri için inhibitör oldukları tespit edilmiştir. İnsan eritrosit CA I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması, Sepharose-4B-anilin sülfanilamid afinite jel kromatografisi basit tek aşamalı yöntem kullanılarak benzenesülfonamidler (1-14) ve AZA'nın CA esteraz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkileri üzerine olan ilk çalışma gerçekleştirilmiştir.

Birkaç yıl önce proteinlerde alosterik iletişimin varlığı üzerine Hacısüleyman ve Erman tarafından 2017'de yapılan bir çalışmada, proteinlerin Gauss Ağ Modeliyle birlikte Schreiber'in entropi kavramı kullanılarak proteinlerdeki bilgi aktarımının farklı yollarla gerçekleşebildiği bulunmuştur. Model incelendiğinde alosterik iletişimi belirlemek için yalnızca entropi bilgisinin yeterli olmadığı ve proteinlerde zaman gecikmeli korelasyonlara dayanan ek bilgilerin sunulması gerektiği vurgulanmıştır. Çalışmada, entropi hedef-kaynak ilişkileri amino asit çiftlerine uygulanmak için kullanılabilen basit bir araç olduğu yaklaşımıyla protein aktivitesinin kontrol edilmesi için bazı amino asitlerin manipülasyonunun gerekliliği belirtilmiştir. 600 ns'lik yapılan moleküler dinamik simülasyon çalışmasında Ubiquitin, Piruvat Kinaz ve PDZ proteinleri için alosterik iletişimin açıklanabilmesi için amino asitler arasında transfer entropinin ve tüm protein için net transfer entropinin uygulanabildiği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak moleküler dinamik simülasyonların ve deneysel verilerin uyum içinde olduğu anlaşılmıştır (Hacısüleyman ve Erman 2017b).

MDS çalışmalarında kanser tedavilerinde kullanılacak olan birçok ilaç çalışması gerçekleştirilmiştir. Özellikle son yıllarda kullanılan ilaçların oluşturduğu yan etkileri azaltma konusunda tasarımlar gerçekleştirilmektedir. Örneğin; 90kDa (Hsp90) proteini özellikle kanser için uygulanabilir bir ilaç hedefi olduğu görülmüştür. Son yıllara kadar ATPase alanını hedefleyen tasarlanmış inhibitörler, güçlü anti-proliferatif etkiler sergilemektedir. Ama yüksek seviyelerde ilişkili toksisite nedeniyle klinik deneylerde başarısız olmuştur. Bu durumun önüne geçilebilmesi için alosterik aktivasyon/inhibisyon yoluyla proteinin modülasyonu araştırılmaya başlanmıştır. Penkler ve Bishop (2019) yeni bir yaklaşımla inhibitör yerleştirme amacıyla alosterik ilaç hedefleme bölgelerini tanımlamak için dinamik amino asit ağı analizi ve amino asit pertürbasyon taraması üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında alosterik kontrol elemanları ile örtüşen ilaç, uygulanabilen alanlar için insan Hsp90α'nın açık konformasyonunu araştırıp varsayılan üç doğal bileşik için alosterik modülatör tanımlamışlardır. Bu ligandlar; Cephalostatin 17, 20 (29) Lupene 3β-isoferulate ve 3'-Bromorubrolide F olarak belirlenmiştir. Bu ligandların alosterik inhibisyon ile proteinin konformasyonel dinamikleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Ligand bağlanmasına yanıt olarak Hsp90'ın kapalı duruma doğru biçimsel geçişinin seçici alosterik aktivasyonu ve inhibisyonu için kanıtlar bulunmuştur. Yapılan çalışmada GROMACS 5.1.2 simülasyon programı, CHARMM 36 kuvvet alanı, 1,5 nm boyutunda ortohombik periyodik kutu ve TIP3P su modeli uygulanarak kullanılmıştır.

Alterio (2012) yılında CA metallo-enziminde aktif bölge dışına bağlanan inhibitörler üzerine yapılan bir çalışmada 2-benzilsülfonilbenzoik acid'in klasik

inhibisyon yöntemleri dışında alosterik etki ile proteinin aktif bölge dışında başka bir bölgeye bağlandığı ve ligandın bu bölgeden inhibisyonda bulunduğunu göstermiştir. Çalışmada inhibitörün, alosterik bölgede birkaç polar etkileşimle kararlı duruma geldiği, karboksilat kısmının bir oksijeni, TYR7 amino asitinin omurga nitrojen atomundan bir hidrojen bağı olarak kabul edilmişken, başka bir oksijenin ASN11 amino asitinin ND2 atomu ile etkileşime girdiği ve karboksilat grubunun her iki oksijen atomu, TRP5 amino asitinin omurga oksijenine ve HIS64'ün ND1 atomuna bağlı olan su molekülleri ile iki güçlü hidrojen bağı yaptığı gözlenmiştir. Buna ek olarak inhibitörün kavite içindeki organik iskelesini kararlı duruma getirdiği, özellikle fenil halkası, GLY6, TYR7, GLY8, PHE231 ve GLU239 amino asitleri ile bir dizi güçlü Van Der Waals bağı oluştururken, benzisülfinil kısmının PHE231 ve ASN232 amino asitleri ile etkileşime girdiği de gözlenmiştir. Elde edilen bulgular çerçevesinde karboksilik asitlerin CA'lara karşı farklı inhibisyon mekanizmalarında bulunabileceği gösterilmiştir (Alterio 2012).

Hacısüleyman ve Erman (2017a) alosterik iletişim üzerine yaptıkları bir çalışmada Gunasakaran (2004) tarafından alosterik etkinin bazı proteinlerin kendine özgü bir özelliği olabileceği öne sürülmesinden sonra bir proteindeki alosterik aktiviteyi belirleyebilen ve ölçebilen bir hesaplama yöntemi geliştirmişler. Schreiber'in transfer entropi formülasyonuna dayanan yaklaşımlarıyla protein için entropi hedeflerinin ve kaynaklarının varlığını gösteren ve amino asit çiftlerinin entropi transferini kullanarak birbirleriyle iletişim kurduğunu açıklayan bir bilgi aktarım modeli sunmuşlar. Modele göre herhangi bir amino asidin dalgalanmalarına neden olan amino asitlerin belirlenebilmesinden yola çıkarak yakın zamana kadar alosterik aktivitesi bilinmeyen Ubiquitin proteinine uygulanmış ve proteinin aktiviteleriyle ilişkili olan amino asitler arasında sistematik entropi yollarının ve bilgi transferinin olduğunu göstermişlerdir. Ubiquitin'in insan polimeraz iyota ile kompleksi için 600 ns'lik moleküler dinamik yörüngeleri kullanılmış ve tüm Ubiquitin amino asit çiftleri arasındaki entropi transferi değerlendirilmiştir. Ubiquitin'in konformasyonel hareketleri, entropi transferi açısından açıklanmış ve alosterik iletişimde yer alan önemli amino asitler için elde edilen verilerin, NMR deneylerinin sonuçlarıyla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ek olarak, etkileşen iki amino asit dalgalanmalarının zaman gecikmeli korelasyonunun, hangi amino asitin etkileşimi kontrol ettiğini ve hangisinin kontrol edildiğini, aynı zamanda zaman gecikmeli korelasyonların, entropi transferinin proteinlerdeki alosterik iletişimi açıklayabildiğini göstermişlerdir.

İlaçların çoğunun vücut içindeki hedefi hücresel proteinlerdir. İlaç, hücre içerisine ulaştığında ilgili protein ile seçici şekilde etkileşimi neticesinde tedavi veya teşhis etkisi ortaya çıkar. 2002 yılında tamamlanan insan genoması çalışmaları (Golden 2003) sonuçlarına göre, insan geni tarafından üretilen 6000 ile 8000 arasında farmakolojik açıdan ilaç hedefi olabilecek proteinin varlığı tahmin edilmiştir (Landry ve Gies 2008).

Shcherbinin'in (2019) yapmış olduğu bir çalışmada karmaşık sistemlerin topolojisini ve dinamiklerini analiz etmek için yaygın olarak kullanılan ağ tanımından yola çıkarak RIN'ın bağlantıları (kenarları) ile bir dizi düğüm (node) olarak proteinin üç boyutlu yapısını temsil ettiği ifade edilmiştir. RIN'dan hesaplanan topolojik parametrelerin protein yapısı ve fonksiyonunun çeşitli yönleriyle ilişkili olduğunu, fonksiyonel olarak önemli amino asitlerin ve ligand bağlanma bölgelerinin analizi ve tahmini için RIN uygulamalarını, protein-protein etkileşimlerini, alosterik iletişimi, nokta mutasyonların proteinlerin yapısı ve dinamikleri üzerindeki etkisini incelemiştir.

TE ile ilgili 2020 yılı içinde yapılan bir çalışmada Sembolik Bilgi Akışı Ölçümü yazılımı kullanılarak herhangi bir dinamik sistemin farklı bileşenlerinin veya farklı dinamik sistemler arasındaki bilgi akışının hesaplanabileceği araştırılmıştır. Zaman serileri, dinamik bir sistemin zaman-evrim yörüngesini temsil ettiği, makine öğrenimi yaklaşımı ve gömme parametrelerinin hesaplanması kullanılarak kaba taneye dayalı zaman serilerinin sembolik bir analizini gerçekleştirmek için bir yöntem sunulmuştur. Bilgi akışı, yerel ve ortalama sembolik transfer entropileri cinsinden ölçülerek sembolik analize dayalı yeni bir karşılıklı bilgi ölçüsü analiz edilmiştir. Çalışmada bahsi geçen sembolik transfer entropisi hesaplamaları yapan program kullanılarak karşılıklı bilgi ve yerel transfer entropisi hesaplanabilmektedir. Uygulama sırasında eklenen bilgisayar programının bazı işlevleri arasında taşınabilirlik, ayarlanabilir hesaplama hassasiyeti, verimli bellek yönetimi, kullanışlı ve pratik veri yönetimi sistemi ve MPI protokolü kullanılarak hesaplamaların paralelleştirilmesi de yer almaktadır (Nebiu ve Kamberaj 2020).

SARS-CoV-2 virüsünün ana proteazı, viral replikasyon ve transkripsiyon için kritik olan bir sistein enzimidir. Bu nedenle, inhibisyonu, bulaşıcı viral partiküllerin üretimini durdurabilir ve böylece COVID-19 enfeksiyonunun hastalık semptomlarını hafifletebilir (Anand vd. 2003; Ullrich ve Nitsche 2020). MPro, katalitik merkezinde bir sistein-histidin dyad içerir ve viral poliproteinleri, pp1a ve pp1ab'yi, bölünme sekansları LQ↓(S,A,G) ile 11 farklı bölgede bölerek 12 küçük fonksiyonel protein üretir (Chan vd. 2020; Lee vd. 1991; Ziebuhr vd. 2000; Zhang vd. 2020). MPro, üç farklı alandan (alan I, II ve III) oluşan 306 amino asitlik bir uzunluğa sahiptir. Substrat bağlama bölgesi, antiparalel β -sarmal yapılarından oluşan ortak bir kıvrımı paylaşan alan I (8–101 amino asitleri) ve alan II (102–184 amino asitleri) arasındaki bir bölgede bulunur (Zhang vd. 2020). Alan III (201–303 amino asitleri), beş α -helisinden oluşan bir antiparalel küresel kümeden oluşur ve MPro aktivitesi için gerekli olan MPro dimerizasyonunda rol alır. Model substrat olarak Ac-VAL-LYS-LEU-GLN-ACC polipeptidi kullanılarak MPro'nun proteolizinin moleküler mekanizmalarını araştırmak için bir QM/MM modelleme çalışması yapılmıştır (Świderek ve Moliner, 2020). Sonuçlar, dört adımda gerçekleşen MPro'nun etki mekanizmasının, diğer sistein proteazlarından biraz farklı olduğunu göstermiştir. Katalitik döngünün ilk adımı, substrat S1 çukurunun etrafına geldiğinde polarize olan CYS145'in kükürt atomuna (SG) bağlı hidrojenin, HIS41'in imidazol halkasının azotuna (NE2) aktarılmasıyla başlar. Geçmişte incelenen koronaviral hedefler arasında MPro, özellikle 2000'lerin başındaki ilk SARS-CoV salgınının ardından büyük ilgi görmüştür (Anand vd. 2003; Ullrich ve Nitsche, 2020). S proteini, RNA'ya bağlı RNA-polimeraz (RdRp, nsp12), NTPase/helikaz (nsp13) ve papain benzeri proteaz (PLPro) da alternatif koronaviral ilaç hedefleri olarak kabul edilmektedir (Wu vd. 2020).

Literatür incelendiğinde, COVID-19 salgınının başlangıcından bu yana, küçük moleküllerin kimyasal veri tabanlarının sanal tarama yöntemi kullanılarak taranmasını içeren ve bunları MPro'ya karşı öngörülen bağlanma enerjisine göre sıralamayı içeren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu strateji, deneylerde sentezlenecek, elde edilecek veya değerlendirilecek en iyi adayların seçilmesinde oldukça faydalıdır. Bu sanal tarama çalışmalarının çoğunda, MPro'nun katalitik bölgesi öncelikle uygun kovalent veya kovalent olmayan bağlayıcıları bulmayı hedeflemiştir (Banerjee vd. 2021; Macip vd. 2022). Bazı çalışmalarda, MPro'nun dimerizasyon sürecini önlemek için küçük moleküllerin bağlanma hedefi olarak MPro'nun protomerleri arasındaki arayüz bölgesi

seçilmiştir. Çünkü MPro sadece dimerik formdayken işlevini yerine getirebilir (Goyal ve Goyal, 2020; Gupta vd. 2021; Liang vd. 2020; Ton vd. 2020). MPro inhibisyonuna dayalı ilaç geliştirme çalışmaları, günümüzde çeşitli araştırma grupları tarafından deneysel ve in silico yöntemler kullanılarak yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Bu çalışmalardaki en son durum yakın zamanda (Lv vd. 2022) tarafından gözden geçirilmiştir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Moleküler Dinamik Simülasyon

Günümüzde moleküler modelleme yapılırken birçok program kullanılmaktadır. Bu programlar, moleküllerin doğal durumlarının en iyi şekilde simüle edilmesi için her geçen gün yenilenmektedir. Simülasyon programları sayesinde bir molekülde meydana gelen fiziksel veya kimyasal olaylar incelenebilmektedir. Bu tez çalışmasında 1970 yılından bu yana sürekli yenilenen Amber Biyomoleküler Simülasyon Programı kullanıldı. Amber iki unsuru temel alır: Birincisi, biyomoleküllerin modellenmesi için bir dizi moleküler mekanik kuvvet alanı kullanılır. İkincisi ise kaynak kodu ve demo paketleri barındırır. Amber’de kuvvet alanları, beş terimden oluşan Amber Potansiyeli’ne bağlı olarak oluşmaktadır. Herhangi bir molekülün simülasyonu yapılmak istendiğinde molekülde meydana gelebilecek potansiyel etkileşimler hesaba katılarak yapılmaktadır. Amber Potansiyeli;

$$\begin{aligned}
 V_{AMBER} = & \sum_i^{n_{bağ}} b_i (r_i - r_{i,denge})^2 + \sum_i^{n_{açı}} a_i (\theta_i - \theta_{i,denge})^2 \\
 & + \sum_i^{n_{dihedral}} \sum_n^{n_{i,maks}} (V_{i,n}/2) [1 + \cos (n\phi_i - \gamma_{i,n})] + \sum_{i<j}^{n_{atom}} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\
 & + \sum_{i<j}^{n_{atom}} \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned} \quad (3.1)$$

ile ifade edilmektedir. Denklem (3.1); beş terimden oluşmakta ve birinci terim birbirine bağlı atomların bağ uzunluklarını, ikinci terim bağ bükülmelerini, üçüncü terim bağların torsiyon bükülmelerini, dördüncü terim bağ yapmayan atomların Van Der Waals etkileşimlerini ve beşinci terim de elektrostatik etkileşimleri temsil etmektedir. Newton hareket denkleminde yola çıkarak;

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i \quad (3.2)$$

$$\vec{F}_i = -\nabla_i V \quad (3.3)$$

$$-\frac{dV}{dt_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (3.4)$$

ifadesi elde edilir. Burada V ; Amber Potansiyeli r_i ise i ’inci atomun yer değiştirme vektörüdür. Denklem (3.4)’te yer alan yer değiştirme vektörü için ilgili konum verileri “Protein Data Bank” (Anonymous 2) veri tabanından temin edilen “pdb” uzantılı dosyalarda yer almaktadır. Amber-18’de kullanılan ff19SB ve ff14SB kuvvet alanları birinci dereceden protein modelidir. Yeni ff19SB kuvvet alanı, sarmal eğilimler gibi amino aside bağımlı özellikleri geliştirip, amino aside özgü CMAPS kullanılarak yine amino aside özgü Ramachandram Haritası’ndaki farklılıkları yeniden üretmiştir. Ff19SB, daha doğru olan OPC su modeliyle en iyi şekilde uyumaktadır. Ff14SB modeli, TIP3P su ile kullanılmak üzere tasarlanmış olup ff14Sbonlysc ile aynı modeldir. Ama TIP3P

için ampirik omurga düzeltmeleri yoktur. Ff15ipq kuvvet alanı, tutarlı bir fiziksel model ile geliştirilmiş olup proteinler için neredeyse tüm yük, açılma, burulma ve bazı Van-Der Waals parametrelerini yeniden oluşturmaktadır. Ff15FB “Kuvvet Dengesi” kuvvet alanı, birden fazla bilgi kaynağına dayalı olarak bağlı parametrelerin başka bir yeni türevidir (Anonymous 1).

Amber-18, her program gibi belirli bir algoritmaya göre simülasyon gerçekleştirmektedir (Şekil 3.1). Algoritma üç ana aşamadan oluşur: Birincisi minimizasyon, ikincisi ısıtma ve üçüncüsü ise üretilir. Bu aşamalar göz önünde bulundurularak simülasyonda sırasıyla;

- Simülasyonu yapılacak olan biyomolekülün başlangıç koordinatlarını içeren pdb uzantılı veri dosyası “Protein Data Bank” (Anonymous 2) veri tabanından elde edilir.
- Molekül, yaklaşık bin adımlık bir işlemle minimize edilir.
- Doğası gereği hareket halinde olduğu düşünülerek yapı içindeki her bir atom için bir “ilk hız” atanır.
- İlgili molekül doğal ortamında hangi sıcaklıkta bulunuyorsa o sıcaklığa ulaşması için ısıtma dinamiği gerçekleştirilir.
- Molekülün denge durumuna gelmesi için “Denge Dinamiği” uygulanır.
- Molekülün sıcaklığı değerlendirilir. Eğer istenilen sıcaklıkta değilse tekrar “Denge Dinamiği” uygulanır.
- Sıcaklık uygunsa “Üretim Dinamiği” ne geçilir.
- Üretim Dinamiği’nin ardından üretilen çıktı dosyası olan ilgili moleküle ait “trajektör (trajectory) dosyası” analiz edilir.



Şekil 3.1. Amber Simülasyon Programının işleyiş algoritması

Amber-18 Programı’nda bahsedilen her bir ana aşama için bir giriş (input) dosyası hazırlanır. Giriş dosyalarında her bir aşama için programın kullanacağı parametreler yer alır. İncelenen moleküle bağlı olarak değişmekle birlikte genel olarak bir minimizasyon aşaması için giriş dosyası içindeki parametreler Çizelge 3.1’de ve ısıtma

aşaması için giriş dosyası içindeki parametreler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Üretim aşaması için giriş dosyası içindeki parametreler ise Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.1. Amber Simülasyon Programı örnek minimizasyon giriş dosyası

Parametre	Açıklama
imin=1,	Minimizasyon seçer.
Ntx=1,	Koordinatları okur ve ASCII formatlı rst7 koordinat dosyasından hızları okur.
irest=0,	Simülasyonu yeniden başlatmaz. (minimizasyon için geçerli değildir).
Maxcyc=2000,	Maksimum minimizasyon döngüsü.
Ncyc=1000,	İlk 0-ncyc döngüleri için en dik iniş algoritması, daha sonra ncyc-maxcyc döngüleri için eşlenik gradyan algoritmasını değiştirir.
Ntpr=100,	Her ntpr döngüsünde Amber mdout çıktı dosyasına yazdırır.
Ntwx=0,	Amber mdcrd yörünge dosyası yazılmaz (minimizasyon için geçerli değildir).
Cut=8.0,	Angstrom cinsinden toplam alan sınırı (8.0’ın altına düşmemek kaydıyla daha yüksek sayılar biraz daha iyi doğruluk sağlar).

Çizelge 3.2. Amber Simülasyon Programı örnek ısıtma giriş dosyası

Parametre	Açıklama
imin=0,	Minimizasyon adımı olmayan bir moleküler dinamik (MD) çalışması seç.
Nstlim=10000,	Çalışmadaki MD adımlarının sayısı (nstlim * dt = ps cinsinden çalışma uzunluğu).
Dt=0.002,	Pikosaniye (ps) cinsinden zaman adımı. Her bir MD adımının zaman uzunluğu.
Ntf=2,	Kısıtlı bağlar için kuvveti hesaplamama ayarı.
Ntc=2,	Hidrojen içeren tüm bağları kısıtlamak için SHAKE’i etkinleştir.
Tempi=0.0,	K cinsinden ilk termostat sıcaklığı.
Temp0=300.0,	K cinsinden son termostat sıcaklığı.

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.2'in devamı.

Ntwx=100,	Her ntwx adımımda Amber yörünge dosyası mdcrd dosyasına yaz.
Ntb=1,	Sabit hacim için periyodik sınırlar.
Ntp=0,	Basınç kontrolü yok.
Ntt=3,	Langevin termostatlı sıcaklık kontrolü.
Gamma_ln=2.0,	Langevin termostat çarpışma frekansı.
Nmropt=1,	NMR kısıtlamaları ve ağırlık değişikliklerini oku.
ig=-1,	Rastgele sayı üretici için çekirdeği rastgele hale getir [bir simülasyon probleminde hata ayıklanmadığında bu komutu kullanmak her zaman olumludur].

Çizelge 3.3. Amber Simülasyon Programı örnek üretim giriş dosyası

Parametre	Açıklama
ntx = 5,	Biçimlendirilmemiş rst7 koordinat dosyasından koordinatları ve hızları oku.
irest = 1,	Önceki MD çalışmasını yeniden başlat [Bu, hızların rst7 dosyasında beklendiği ve başlangıç atom hızlarını sağlamak için kullanılacağı anlamına gelir].
Temp0 = 300.0,	Termostat sıcaklığı. 300K'da çalıştır.
Ntb = 2,	Sabit basınçlı periyodik sınır koşulları kullan.
Ntp = 1,	Sabit basınç simülasyonu için Berendsen barostatını kullan.

Çizelgelerde bahsedilen parametrelerin sayısal verileri incelenen biyomoleküle göre değişiklik gösterebilmektedir. Amber Simülasyon Programı kullanılarak ilgili parametrelere verilen değerler eşliğinde sırasıyla; minimizasyon, ısıtma ve üretim aşamaları gerçekleştirildikten sonra çıktı dosyasındaki verilere istenilen analizler uygulanabilir.

Moleküler yerleştirme ve MD simülasyonları için MPro'nun kristal yapı koordinatı (6M03 erişim numarasıyla PDB'de depolanmıştır) kullanılmıştır. Homodimer koordinatları, COVID-19 Proteins Library of CHARMM-GUI Arşivi'nden elde edilmiştir (Anonymous 3). Hedef olarak MPro homodimer kullanılarak, DrugBank veri tabanından 2500'den fazla FDA onaylı küçük molekülü ilaç, PyRx yazılımı kullanılarak sanal tarama deneyine tabi tutulmuştur (Dallakyan ve Olson 2015; Wishart vd. 2018). PyRx (Dallakyan ve Olson 2015; Morris vd. 2009) tarafından geliştirilen AutoDock 4

yerleştirme simülasyon motorunun uygulandığı sanal bir tarama yazılımıdır. Birincil amaç, enzim içindeki bağlanma yerini dikkate almadan yüksek bağlanma afinitesine sahip ilaçları belirlemek olduğundan kör yerleştirme yaklaşımı kullanıldı. Docking skoru yüksek olan ilaçlardan bağlanma afinitesi (K_d) -10 kcal/mol'den düşük olan dört ilaç (Paliperidon, Dihydroergotamin (DHE), Balanol Analog 2 ve Tadalafil) ileri analiz için seçildi. Bu sıkıca bağlanmış ilaçların her biri, bir stabilite kontrolü için 20 ns MD simülasyonlarına tabi tutuldu. Dört ilaç arasında DHE, 20 ns MD simülasyonu sırasında en stabil bağlanma profilini sergiledi ve bu nedenle MPro'ya yönelik alosterik inhibisyon potansiyelini araştırılması için seçildi.

DHE-MPro dimer kompleksi ve Apo-MPro dimer, Amber-18 yazılım paketi kullanılarak MD simülasyonlarına tabi tutulmuştur (Salomon-Ferrer vd. 2013). TIP3P su modeli ile doldurulmuş kübik solvasyon kutuları ve titre edilebilir amino asitlerin protonasyon durumları H++ web sunucusu (Anonymous 4) kullanılarak hazırlandı. Sistemi elektrostatik olarak nötralize etmek için uygun sayıda Na^+ iyonu eklendi. Tüm simülasyonlar ff14SB kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Maier vd. 2015). DHE için genel amber kuvvet alanı (GAFF) parametreleri Antechamber ve parmchk2 programları kullanılarak elde edilmiştir (Wang vd. 2004; Wang vd. 2006). Parametreleme için gerekli olan kısmi atomik yükler (AM1-BCC teori seviyesi) Gaussian 16 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır (Jakalian vd. 2000; Frisch vd. 2016). Simülasyon kurulumlarının her biri için iki kısımda 20000 iterasyon ile minimizasyonlar yapılmıştır. İlk kısımda, tüm ağır atomların konumları harmonik kısıtlamalar uygulanarak sabitlenirken en dik 10000 adımını içeren minimizasyon yapıldı ve ardından herhangi bir kısıtlama olmadan konjugat gradyanının 10000 adımı daha çalıştırıldı. Minimize edilmiş sistemler, kademeli olarak 0 K'dan 310 K'ya yükseltildi ve NVT grubunda 1 ps'lik bir sıcaklık eşleme sabitine sahip bir Langevin termostatu uygulanarak 300 ps'nin üzerinde dengelendi. Yoğunluk dengelemeleri (1 ns) ve üretim çalışmaları (200 ns) bir sabit basınç grubu (NPT) kullanılarak gerçekleştirildi, basınç bir Berendsen barostat kullanılarak sabit tutuldu. Tüm simülasyonlar, periyodik sınır koşulları ve 2-fs zaman adımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uzun menzilli elektrostatik etkileşimler, 9 Å'luk bir mesafede bağlanmamış bir kesime sahip parçacık ağı Ewald yöntemi kullanılarak hesaplandı ve katı kısıtlamaları uygulamak için SHAKE algoritması kullanıldı. Elde edilen MD yörünge dosyalarının RMSD, RMSF, hidrojen bağı ve dihedral açı analizi, Amber-18 yazılım paketinin CPPTRAJ modülü kullanılarak yapıldı. (Roe ve Cheatham 2013).

3G1-CA II ve Apo-CA II sistemleri için PDB data bankasında 4QY3 erişim kodu ile verilen koordinatlar kullanıldı. Simülasyon dosyalarını hazırlama süreci yukarıda MPro için anlatılan adımlar bu sistem içinde benzer şekilde gerçekleştirildi.

3.2. Kök Ortalama Kare Sapması

Kök Ortalama Kare Sapması (RMSD), bir model veya olayda tahmin edilen değerler ile gözlemlenen değerler arasındaki farkların olup olmadığını araştırmak için kullanılan bir ölçüm analizidir. RMSD, tahmin edilen değerler ile gözlemlenen değerler arasındaki farklılıkların ikinci dereceden ortalamasını betimler. RMSD, ölçeğe bağlı olduğundan belirli bir veri kümesi için farklı model veya yapıların olası hatalarını karşılaştırmak için bir doğruluk analizidir. RMSD, pozitif veya negatif değerler almakla

beraber nadiren de olsa sıfır değeri alabilir. RMSD'nin sıfır değerini alması; tahmin ile gözlemlenen arasında herhangi bir fark olmadığını, mükemmel bir uyum ya da benzerlik olduğunu ifade eder. RMSD'nin almış olduğu değerler büyüdükçe korelasyon yapılan gruplar arasındaki benzerlik azalır.

RMSD, birçok bilimsel alanda olduğu gibi biyoenformatikte de kullanılan bir analiz yöntemidir. Moleküler yapılar düşünüldüğünde ilgili yapıları oluşturan atomların konumlarının denge durumundan sapma miktarlarını ifade eder. RMSD, proteinleri oluşturan amino asitlerdeki atomlar arasındaki ortalama mesafenin bir ölçüsüdür. Bununla birlikte RMSD, MDS yöntemlerinde kullanılan bir analiz yöntemi olup, araştırılan birçok atomik yapıda meydana gelebilecek konformasyonların incelenmesine olanak sağlar. MDS yöntemlerle gerçekleştirilen simülasyon sonuçlarında elde edilen atomik pozisyonlardan yola çıkarak RMSD;

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N [m_i * (X_i - Y_i)]}{M}} \quad (3.5)$$

ile ifade edilebilir. Denklem (3.5)'te N ; yapıyı oluşturan atomların sayısını, m_i ; i 'inci atomun kütlelerini, X_i ; i 'inci hedef atomun koordinat vektörünü, Y_i ; i 'inci referans atomun koordinat vektörünü ve M ; yapıyı oluşturan atomların toplam kütlelerini ifade eder.

RMSD, MDS yöntemlerinde simülasyon süresince kaydedilen atomik konumlardan yola çıkarak incelenen yapıda zamanla meydana gelebilecek konformasyonel değişiklikler hakkında bilgi sunar. Örneğin bir moleküler sisteme mevcut aktivitesini bozmak için eklenen liganın sisteme herhangi bir etkisinin olup olmadığı RMSD analizi ile de irdelenebilmektedir.

3.3. Kök Ortalama Kare Dalgalanması

Kök Ortalama Kare Dalgalanması (RMSF), istatistiksel mekanikte bir parçacığa veya atoma ait konumun, bir referans konuma göre zaman içindeki sapmasının bir ölçüsüdür. Atomun rastgele hareketinin uzaysal kapsamının en yaygın ölçülerinden birisidir. Dinamik bir sistem, referans alınmış bir ortalama konum etrafında dalgalandığında RMSF ile tanımlanmaktadır. Bu atomik dalgalanmanın boyutu, önemli fiziksel bilgiler sağlamaktadır. RMSF, moleküler bir yapıda atomların referans konumlarından boyutsal ve düzlemsel olarak salınım oranlarını sunmaktadır. Biyomoleküler yapılar incelendiğinde yapıyı oluşturan atomların rotasyon ve öteleme hareketleri sonucunda meydana getirdikleri salınımlarla konformasyonel değişiklikler ve davranışlar RMSF analizleriyle irdelenebilmektedir. Moleküler bir yapıda atomlar arası potansiyellerden kaynaklı kuvvetlerin etkisiyle her bir atom bulunduğu koşullar altında farklı salınım hareketleri yapabilir. Eğer sisteme ek bir müdahale varsa veya yeni bir alt yapı müdahil olursa bu durumda atomların mevcut salınımlarından farklı konformasyonel değişiklik oluşabilecektir. Buna benzer salınım hareketlerinin incelenmesinde RMSF analizi fiziksel davranışlar hakkında öngörü sunmaktadır. RMSF, analiz olarak RMSD'ye benzerdir. Ama aralarında küçük bir fark vardır. RMSF, her bir amino asidin esnekliğini veya MDS yöntemlerinde simülasyon boyunca her bir amino asidin dalgalanma miktarını

ölçer. Bu sayede bir biyomoleküler yapıda veya proteinde her bir amino asidin ana yapıyı harekete geçirme olayındaki katkısını ifade eder. RMSD analizi, bir yapıdaki ilgilenilen atomun her bir zaman dilimindeki konumunun referans konumundan sapma miktarını gösterirken, RMSF analizi ise her bir amino asitte bulunan aynı atomun dalgalanma hareketini amino asit boyutunda gösterir. RMSD’de değişken zamana bağlı konum iken, RMSF’de amino asittir.

3.4. Dinamik Çapraz Korelasyon

MDS’de herhangi bir protein yapısı içindeki atomların veya amino asitlerin uzaysal hareketleri analiz edilmektedir. Sistemi oluşturan alt yapılar arasındaki etkileşimler bir kuvvet alanı varlığında simüle edilebilir ve simülasyonun öngördüğü potansiyellere bağlı olarak Newton’un hareket denklemlerinin uygulanmasının ardından, alt yapıların dinamik hareketlerine karşılık gelen anlık görüntüleri (frame) elde edilir. Yörüngeler, simülasyon boyunca belirli zaman aralıklarında (nanosaniye) atomik koordinatları sunarak tüm sistemin anlık görüntülerini temsil eder. Bu, sistemin zaman içindeki dinamik değişikliklerinin incelenmesine olanak sağlar. MDS yöntemlerde birçok analiz mevcuttur. Bu analiz yöntemlerinden biri olan Dinamik Çapraz Korelasyon (DCC), sisteme ait olan yörüngeleri değerlendirerek tüm alt yapıların birlikte hareket etme derecelerini gösterir. DCC, -1 ile +1 arasında değerlere sahip olan bir harita oluşturarak atomlar veya amino asitler arasındaki korelasyonları belirlemeye çalışır. Bu noktada eğer DCC değeri +1 ise korelasyonları değerlendirilen iki amino asidin senkronize hareket gerçekleştirdiği, -1 ise asenkron hareket ettiklerini ve 0 ise ilgili iki amino asit arasında herhangi bir korelasyon olmadığını ifade eder. Bir protein yapısı veya kompleksi düşünüldüğünde DCC, amino asitler arasında var olan uyumun ya da uyumsuzluğun belirlenmesi, inhibisyon veya aktivasyon mekanizmalarının araştırılması için kullanılabilir bir analiz yöntemidir.

$$DCCM_{i,j} = \frac{\langle \vec{d}_i, \vec{d}_j \rangle}{\sqrt{\langle d_i^2 \rangle \langle d_j^2 \rangle}} \quad (3.6)$$

Denklem (3.6)’da $DCCM_{i,j}$; bir protein yapısında mevcut olan her iki amino asit arasındaki DCC değerlerini içeren matrisi ifade eder. Bu değerler; elde edilirken ikili korelasyonlarda i . ve j . amino asitlerin d_i ve d_j yerdeğiştirme vektörlerinin bulunma olasılıkları hesaba katılarak oluşturulan matrislerdir. Hesaplama sonucunda matrislerdeki değerler +1 ile -1 arasında olup birlikte hareket etme durumları hakkında bilgi sunmaktadır.

3.5. Amino Asit Etkileşim Ağı

Amino Asit Etkileşim Ağı (RIN), karmaşık sistemlerin etkileşim dinamiklerini analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu analiz yönteminde herhangi bir protein kompleksinde mevcut olan amino asitler arasındaki etkileşim bağlantılarını, kenar ve düğüm noktaları belirtilerek proteinin üç boyutlu yapısı temsil edilmeye çalışılır. RIN

kullanılarak hesaplanan topolojik parametreler, ilgili proteinin yapısı ve davranış fonksiyonlarıyla ilişkilidir. Bu noktada, RIN analizi ile fonksiyonel olarak proteinin kimyasal tepkimelerinde önemli rol oynayan amino asitlerin ve ligand bağlanma bölgelerinin belirlenmesi, protein-protein etkileşimleri, alosterik inhibisyonu veya aktivasyonu gibi mekanizmaların araştırılması mümkündür. MDS yöntemlerinde gerçekleştirilen RIN analizlerinde kenar (edge) ve düğüm (node) olmak üzere iki unsur vardır. Düğüm, herhangi bir biyomoleküler yapıdaki amino asitleri, genleri veya daha küçük yapıdaki proteinleri, kenar ise mevcut olan düğümler arasındaki etkileşimleri temsil eder (Shcherbinin 2019).

3.6. Transfer Entropi

Bir karmaşık sistemin işleyiş mekanizmasının araştırılmasında sistemi karakterize eden değişkenler analiz edilerek incelemeler gerçekleştirilebilir. Birçok bilim alanında olduğu gibi moleküler dinamikte de binlerce atomdan oluşan yapılar karmaşık bir sistem olup, sistemi oluşturan alt yapılar arasındaki ilişkileri anlamak işleyiş mekanizması hakkında bilgi sunabilmektedir. MDS yöntemlerle araştırılan protein gibi çok atomlu sistemlerde her bir amino asidin kendine özgü hareketi, aynı yapı içindeki başka bir amino asidin davranışını zaman gecikmeli olarak etkileyebilir. Bu etkileyiş mekanizmasının olup olmadığı transfer entropi (TE) analiziyle irdelenebilmektedir. Özellikle birbiri ile doğrudan bağlantılı veya etkileşimli olmayan durumların incelenmesinde TE vazgeçilmez bir analiz yöntemidir. Örneğin MDS yöntemlerde bir proteinin aktivitesini inhibe etmek için kullanılan ligandların alosterik etki ile bağlandığı durumlarda ilgili ligandın aktif bölgedeki kimyasal tepkimeyi etkileme mekanizması TE ile açıklanabilmektedir. Karmaşık bir sistemdeki alt yapılar arasında asimetric bir bilgi aktarımı varsa, her bir alt sistemin entropisini hesaba katarak toplam entropide bir değişim meydana geliyorsa bu noktada TE analizi yapılmaktadır. TE analizlerine dayanarak amino asit çiftleri arasındaki etkileşimler tanımlanabilmektedir. Bu sayede mekânsal olarak birbirinden uzak olan iki amino aside ait dalgalanmaların zaman yörüngesi değerlendirilebilir ve bir amino asidin yörüngesinden bir diğerinin yörüngesine bilgi aktarımının olup olmadığı araştırılabilir.

Biyomoleküller gibi karmaşık bir sistemde TE'nin oluşması için her iki amino asidin birbiri ile ilişkili olması ve eğer varsa bilgi akışının asimetric olması gerekmektedir. Bilgi akışı iki yönlü aynı değerde olursa bu noktada TE'den bahsedilemez. Ayrıca iki amino asit arasındaki TE incelenecekse bir amino asidin meydana getirdiği salınım veya dalgalanma meydana geldikten belli bir süre sonra diğerinin etkilenmesi beklenir. Yani zamansal anlamda bir gecikme olması beklenir. Etkileşimli iki alt sistem düşünüldüğünde aralarındaki zaman gecikmeli korelasyon;

$$C_{ij}(t, t + \tau) \neq C_{ji}(t, t + \tau) \quad (3.7)$$

ile ifade edilir. Burada C_{ij} ; i 'inci amino asit ile j 'inci amino asit arasındaki korelasyonu, C_{ji} ; j 'inci amino asit ile i 'inci amino asit arasındaki korelasyonu, t ; dalgalanma süresini ve τ ise gecikme zamanını temsil eder. Denklem (3.7) değerlendirildiğinde karmaşık sistemlerde meydana gelen zaman gecikmeli korelasyonlar asimetric ise aktarılan net bilgi TE açısından ölçülebilir.

Biyomoleküllerde alosterik etki ile meydana gelen inhibisyon mekanizmalarında bilgi transferi, sadece sistemdeki dalgalanmaların genlikleri ve sıklıklarındaki değişimlere bağlı olarak gerçekleşir. MDS yöntemlerinde kullanılan biyomoleküllere ait giriş dosyalarındaki veriler göz önünde bulundurulduğunda, moleküllerde bulunan her bir atoma ait simülasyon süresince dalgalanma hareketi yaparak değişen konum bilgileri bu dosyalarda mevcuttur. Moleküler dinamikte her bir atomun dalgalanma olasılığına bağlı olarak entropi;

$$Ent = -k_B \sum_{i=1}^N p_i \ln p_i \quad (3.8)$$

ifadesi ile tanımlanabilir (Shannon 1948). Burada k_B ; Boltzmann Sabiti, N ; sistemde mevcut atom sayısı, p_i ; i 'nci atomun dalgalanma olasılığıdır. Herhangi iki atomlu veya amino asitli molekül düşünüldüğünde sistemi oluşturan alt yapılarda meydana gelen dalgalanmalar birbirinden bağımsızsa, birbirlerinden etkilenmiyorlarsa, sistemin toplam entropisi, sistemi oluşturan atom veya amino asitlerin entropileri toplamına eşittir.

$$S_{toplaml} = S_i + S_j \quad (3.9)$$

Bu duruma karşın molekülü oluşturan alt yapıların dalgalanmaları arasında bir ilişki varsa sistemin toplam entropisi;

$$S_{toplaml} = S_i + S_j - I_{ij} \quad (3.10)$$

Denklem (3.10) ile tanımlanır ve sistemin toplam entropisi, yapısında bulundurduğu her bir alt sistemin toplam entropisinden farklı sonuç verir. Burada I_{ij} etkileşim halinde bulunan iki alt sistem arasında oluşan bilgi aktarımını ifade eder.

Moleküler bir sistem düşünüldüğünde sistemdeki her bir atomun konumu;

$$R(t_m) = R(R_1(t_m), R_2(t_m), R_3(t_m), \dots, R_N(t_m)) \quad m = 1, 2, 3 \dots n_T \quad (3.11)$$

ile ifade edilir. Burada R_{tm} her bir toplam yer değiştirme vektörü, m moleküler dinamik simülasyondaki adım sayısı, T ise toplam süredir.

Simülasyon süresi boyunca sistemin toplam denge pozisyonu;

$$\bar{R} = R(\bar{R}_1, \bar{R}_2, \bar{R}_3, \dots, \bar{R}_N) \quad (3.12)$$

ise t_m zamanında bir molekülün ani dalgalanma durumu;

$$\Delta R(t_m) = R(t_m) - \bar{R} \quad (3.13)$$

$$\Delta R(t_m) = \Delta R(\Delta R_1(t_m), \Delta R_2(t_m), \Delta R_3(t_m), \dots, \Delta R_N(t_m)) \quad (3.14)$$

ile ifade edilir. Denklem (3.14); her bir atomun denge durumu referans alınarak dalgalanma miktarını gösterir. N atomlu bir sistem düşünüldüğünde her bir atomun dalgalanma olasılığı;

$$p(\Delta R_i) = \int_0^\infty \dots \int_0^\infty \dots \int_0^\infty p(\Delta R_1, \Delta R_2, \dots, \Delta R_N) d\Delta R_1, \dots, \Delta R_N \quad (3.15)$$

ve sistemdeki her iki atomun birlikte dalgalanma olasılığı ise;

$$p(\Delta R_i, \Delta R_j) = \int_0^\infty \dots \int_0^\infty p(\Delta R_1, \Delta R_2, \dots, \Delta R_N) d\Delta R_1, \dots, \Delta R_N \quad (3.16)$$

ile ifade edilir. Dalgalanma olasılığından yola çıkarak bir moleküldeki iki alt yapı arasındaki entropi;

$$S_{ij} = -k_B \sum_m \sum_l p_{ij}(m, l) \ln p_{ij}(m, l) = -k_B \langle \ln p_{ij} \rangle \quad (3.17)$$

$$S_{ij} = -k_B \langle \ln \left(\frac{p_{ij}}{p_i p_j} p_i p_j \right) \rangle \quad (3.18)$$

$$S_{ij} = S_i + S_j - I_{ij} \quad (3.19)$$

ile ifade edilir. Burada S_{ij} iki alt sistemin toplam entropisini, S_i i 'inci alt sistemin entropisini, S_j j 'inci alt sistemin entropisini belirtirken

$$I_{ij} = k_B \langle \ln \left(\frac{p_{ij}}{p_i p_j} \right) \rangle \quad (3.20)$$

ise sistemin ortak bilgisini ifade eder. Her bir alt sistem, çevresi ile enerji alışverişinde bulunan kanonik bir topluluk olarak ele alınabilir. Bahsi geçen alt sistemler bir moleküler yapıdaki, atom veya amino asit formundaki yapılar olabilir. i 'inci yapıda meydana gelen konformasyonel bir değişiklik j 'inci yapıda bir değişiklik meydana getirmiyorsa karşılıklı bilgi aktarımı sıfırdır. Bunun aksine, karşılıklı bilgi aktarımı her zaman sıfırdan farklı değer alacaktır. Moleküllerdeki alt yapılar düşünüldüğünde, birbirini etkileyen alt yapıların varlığında sistemin genel entropisinde azalma söz konusudur.

Karmaşık sistemlerin entropisinden yola çıkarak, sistemi oluşturan alt yapılar arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığının araştırılmasında TE analizi yapılarak etkileşim mekanizmaları irdelenebilir. Bu gibi sistemlerde alosterik etki ile bir etkileşim mekanizması mevcutsa herhangi bir alt yapının hareketinden belirli bir süre sonra başka konumdaki diğer bir alt yapının hareketi de değişiklik gösterecektir.

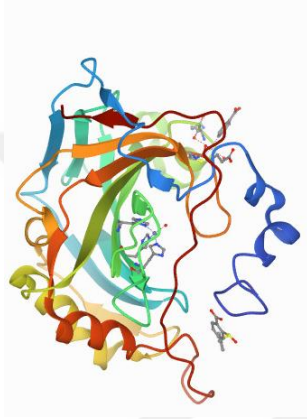
$$T_{i \rightarrow j}(\tau) = S(\Delta R_i(t + \tau) | \Delta R_i(t)) - S(\Delta R_j(t + \tau) | \Delta R_i(t), \Delta R_j(t)) \quad (3.21)$$

$$\begin{aligned} T_{i \rightarrow j} = & -\langle \ln p(\Delta R_j(0), \Delta R_j(\tau)) \rangle + \langle \ln p(\Delta R_i(0), \Delta R_j(0), \Delta R_j(\tau)) \rangle \\ & + \langle \ln p(\Delta R_j(0)) \rangle - \langle \ln p(\Delta R_i(0), \Delta R_j(0)) \rangle \end{aligned} \quad (3.22)$$

Denklem (3.22)'de $T_{i \rightarrow j}$ i 'nci alt sistemden j 'nci alt sisteme olan TE'yi ifade eder. i 'nci alt yapıda meydana gelen bir hareket veya konformasyon τ zaman sonra j 'nci alt yapıda

bir değişiklik meydana getiriyorsa bu noktada transfer entropiden bahsedilebilir. Belirli bir mesafede bulunan iki alt sistem arasında bir ilişki varsa $T_{i \rightarrow j}$ değeri sıfırdan farklı değerler alır. Eğer herhangi bir etkileşim yoksa $T_{i \rightarrow j}$ değeri sıfırdır.

Bu tez çalışmasında 4QY3 erişim kodlu (Anonymous 2) CA II metalo-enziminin (Şekil 3.2) ve 6M03 erişim kodlu (Anonymous 1) Covid-19 virüsünün (Şekil 3.3) her birine farklı ligandlar dahil edilerek alosterik etki ile inhibisyon mekanizması araştırıldı. Amber Biyomoleküler Simülasyon Programı kullanılarak her bir biyomolekölün hem ligandlı hem de ligandsız formları için sırasıyla minimizasyon, vücut sıcaklığında (310 K) ısıtma ve 200 ns'lik üretim aşamaları gerçekleştirildi. Elde edilen verilere RMSD, RMSF, DCC, RIN, CP ve TE analiz yöntemleri uygulandı.



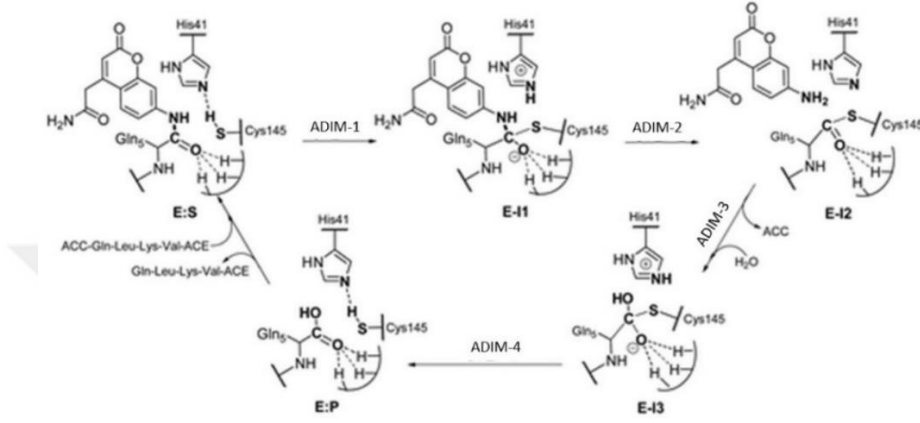
Şekil 3.2. 4QY3 erişim kodlu CA Metalo-enzimi



Şekil 3.3. 6M03 erişim kodlu Covid-19 Virüsü

4QY3 erişim kodlu CA II metalo-enzimin aktif bölgesinde meydana gelen hem HIS64 amino asitinin enzim aktif bölgesine proton taşımalarını inhibe etmek hem de aktif bölgede bulunan diğer amino asitlerde meydana gelebilecek inhibisyon veya aktivasyon durumlarını incelemektir. Eğer aktif bölgeden belirli bir mesafede bulunan bir bölgeye hidrojen bağlarıyla bağlanan 3G1 ligandı alosterik etki ile başta HIS64 amino asiti olmak üzere aktif bölgedeki amino asitlerin işleyiş mekanizmasını etkiliyorsa bu durum, bahsi geçen analiz yöntemlerle ortaya konulmuş olacaktır.

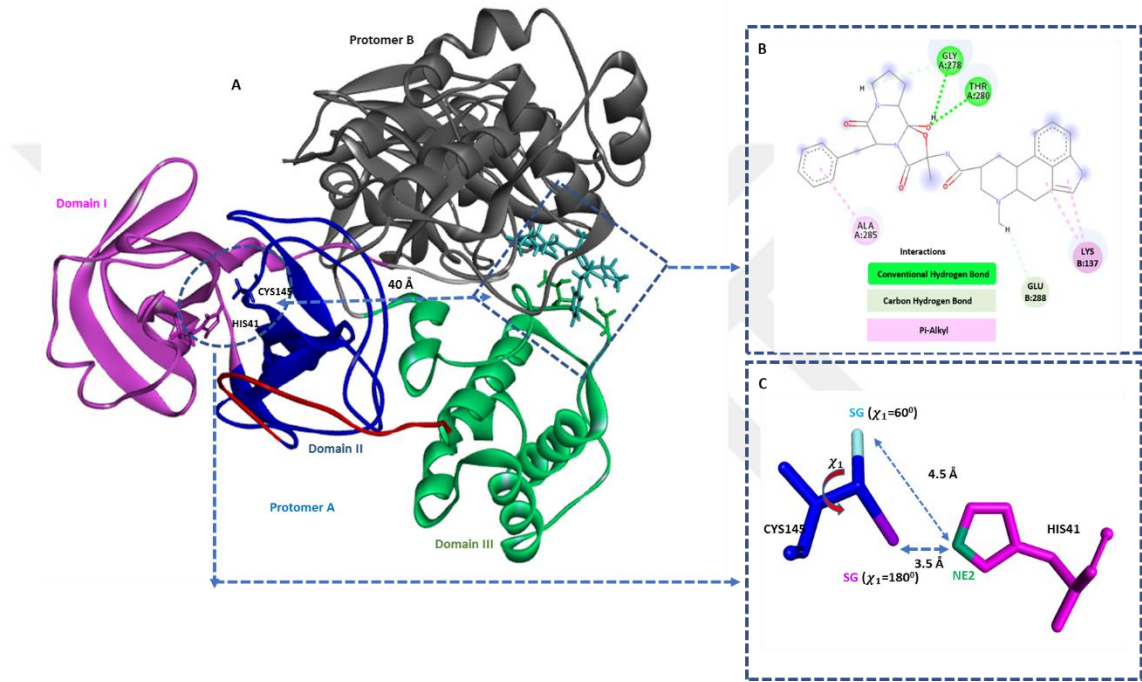
Çalışmaya konu olan diğer enzim yapısı Covid-19 virüsüne ait bir enzim yapısı olup çalışma mekanizması Şekil 3.4'teki gibidir. İlgili yapıda HIS41 ile CYS145 bir makas gibi birbirine yaklaşıp uzaklaşmaktadır. Bu çalışma mekanizmasından dolayı HIS41 ile CYS145 arasındaki mesafenin artış gösterdiği durumlarda araya giren yapıyı mesafenin azalmasıyla keserek virüsün çoğalmasına yol açmaktadır. 4QY3'te olduğu gibi 6M03 kodlu yapıda aktif bölgenin belirli bir mesafesinde hidrojen bağlarıyla bağlanan DHE ligandının alosterik etki ile bu mekanizmayı bozup bozmadığı çalışmada bahsedilen analiz yöntemleri kullanılarak gözlemlenmiş olacaktır.



Şekil 3.4. 6M03 erişim kodlu Covid-19 Virüsünün çalışma mekanizması

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

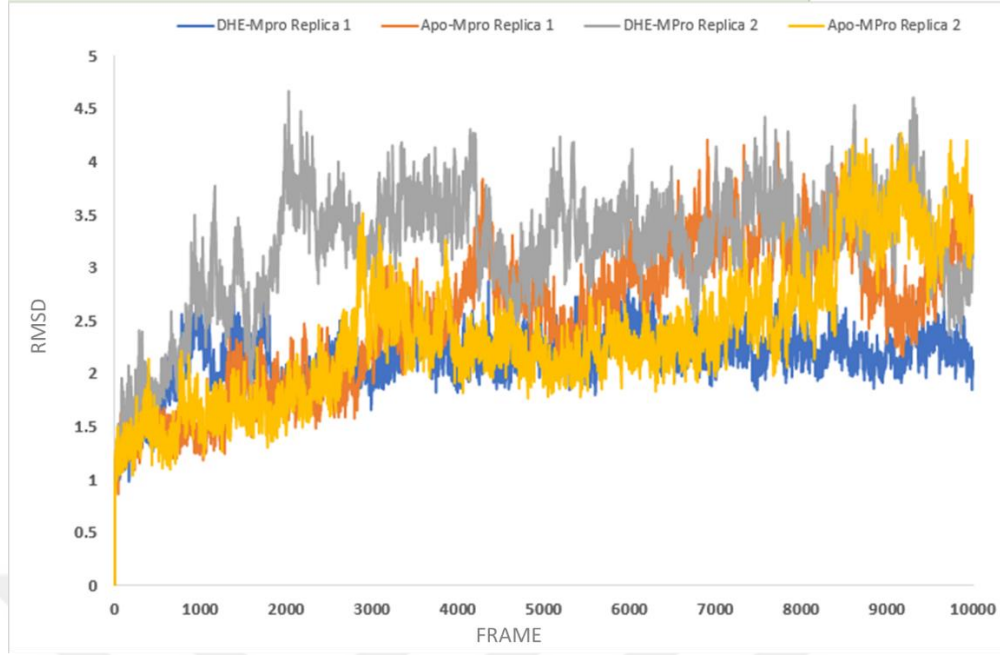
6M03 erişim kodlu hem DHE-MPro hem de Apo-MPro dimer sistemleri için 200 ns MD simülasyonu iki replika olarak gerçekleştirildi. Şekil 4.1 (a), protomer A ve protomer B'den (koyu gri) oluşan DHE-MPo heterodimer sistemini göstermektedir. Her protomer, Şekil 4.1 (a)'da protomer A için farklı renklerle sunulan üç alan içerir. Birbirinden yaklaşık 40 Å ayrı olan DHE bağlanma yeri ve katalitik bölge (HIS41/CYS145) konumları, sırasıyla Şekil 4.1 (b) ve Şekil 4.1 (c)'de yakınlştırılmış görüntüler olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.1. 6M03'ün **a)** Heterodimer yapısı; **b)** DHE bağlanma bölgesi; **c)** CYS145 ile HIS41 amino asitlerinin konumları

4.1. 6M03 için RMSD

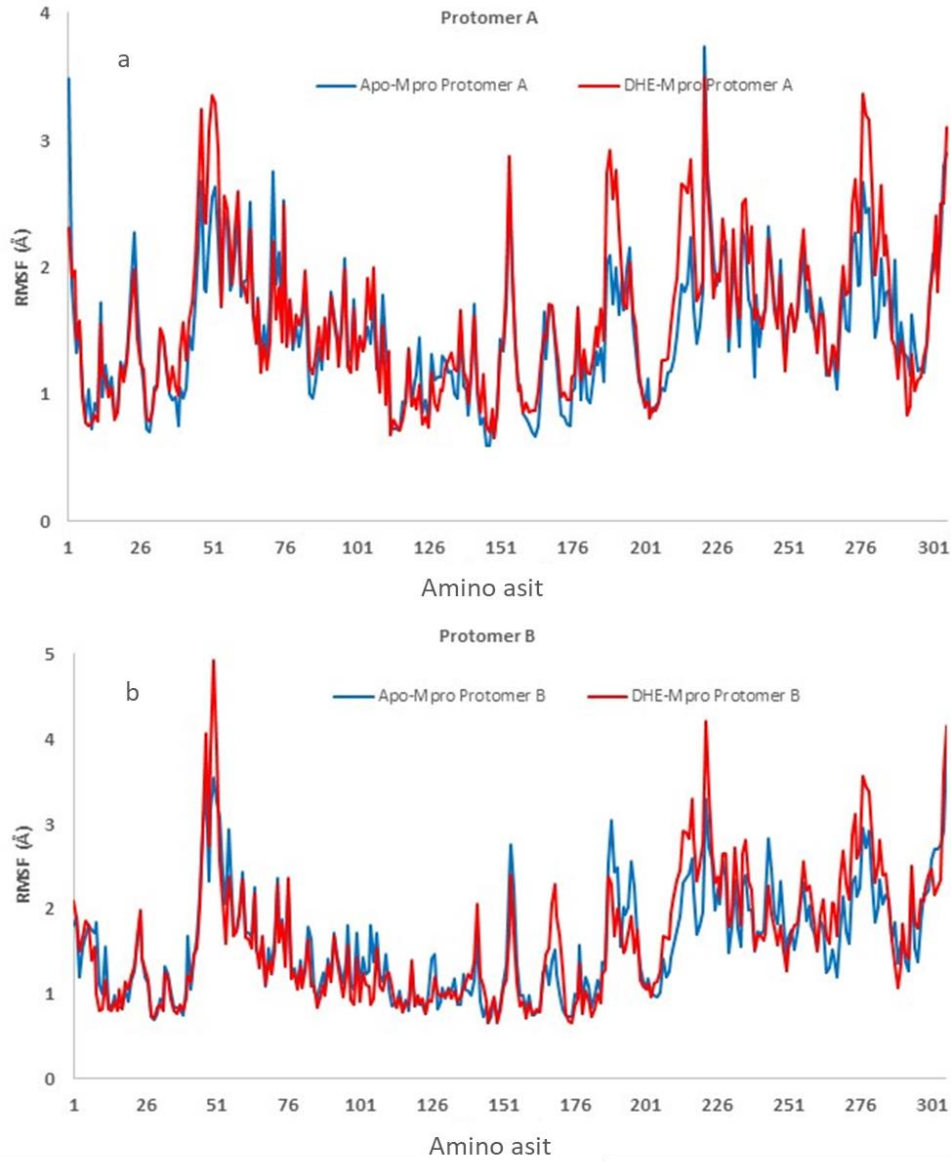
Şekil 4.2, her iki replika için DHE-MPro kompleksinin ağır atomları ve Apo-MPro dimer sistemleri için RMSD çizimlerini göstermektedir. Görülebileceği gibi, her iki replika da benzer sonuçlar sergilemektedir, bu nedenle bundan sonra yörüngenin kalan analizleri birinci replikanın verileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. 6M03 kodlu MPro için RMSD değerleri

4.2. 6M03 için RMSF

Şekil 4.3 (a) ve (b) 'deki protomer A ve B karşılaştırıldığında, MPro'ya DHE bağlanmasının Protomer A ve Protomer B'deki amino asit dalgalanmalarını farklı şekilde etkilediği görülmektedir. En belirgin fark, alan II ve alan III arasında yer alan bazı köprü (linker) amino asitlerin dalgalanmalarında ortaya çıkmıştır. DHE'nin bağlanması, Protomer A'daki köprü amino asitlerdeki dalgalanmaları artırıyor gibi görünse de aksine, Protomer B'deki köprü amino asitlerdeki dalgalanmaları stabilize ettiği gözlenmiştir. Arayüz bölgesindeki ligand etkileşimlerinin katalitik bölgenin yapısını etkileyip etkilemediğini ve bu etkileşimler nedeniyle katalitik bölge amino asitlerin yapısında meydana gelen herhangi bir yapı değişikliği belirlenmeye odaklanıldı.

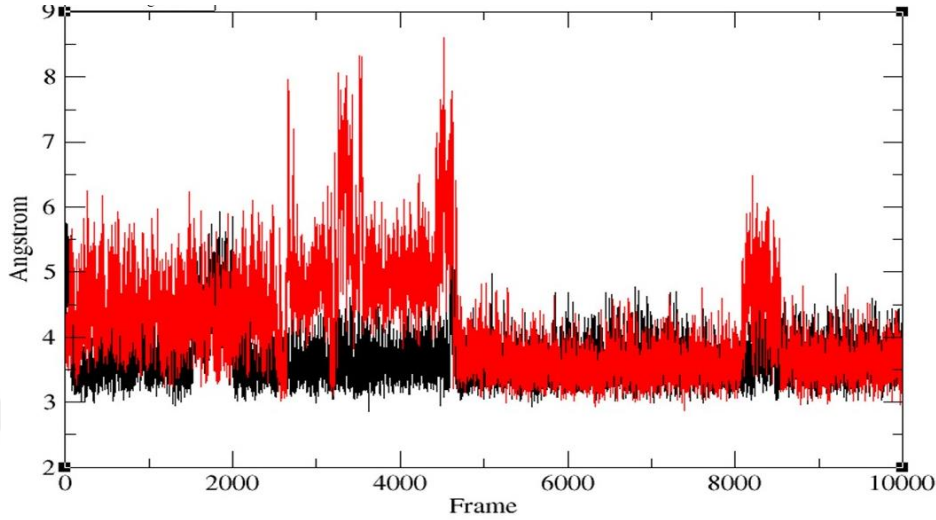


Şekil 4.3. 6M03 kodlu molekülün; a) Protomer A; b) Protomer B için RMSF değerleri

4.3. 6M03 için İki Amino Asit Arası Mesafe

6M03 kodlu moleküler yapının işleyiş mekanizması göz önünde bulundurularak HIS41 ile CYS145 amino asitleri arasındaki mesafenin değişimi, yapıya entegre edilen ligandın alosterik etki oluşturup oluşturmadığını gözlemlene noktasında önem arz etmektedir. Bahsedilen iki amino asit arasındaki mesafenin artması, ligandın alosterik etki ile 6M03'ün işleyiş mekanizmasını manipüle ettiği anlaşılmış olacaktır. Bu doğrultuda Şekil 4.4 incelendiğinde siyah ile belirtilen ligandsız, kırmızı ile belirtilen ligandlı yapının HIS41-CYS145 amino asitleri arasındaki mesafe değerlerindeki değişim görülmektedir. Grafik incelendiğinde 10.000 framelik bir zaman diliminde ligandsız durumdayken iki amino asit arasındaki mesafe ortalama 3,5 Å iken DHE bağlandığı durumda simülasyonun 1 ile 4800 ve 8000 ile 8500 frameler arasındaki zaman dilimlerinde iki

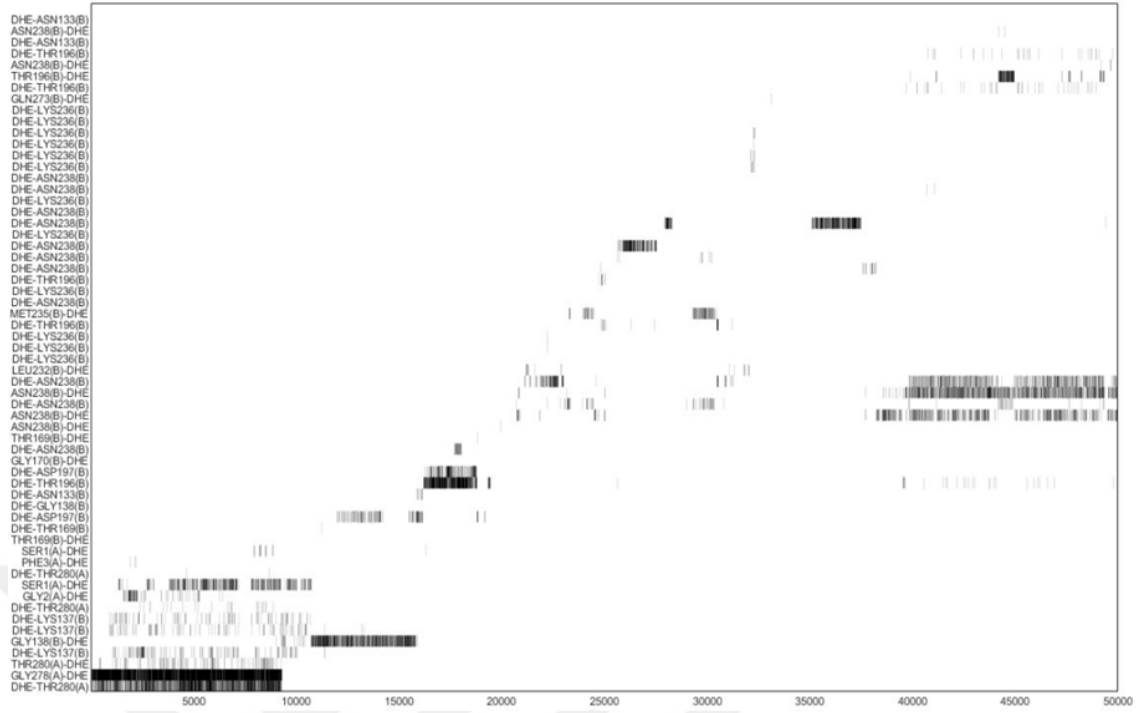
amino asit arası mesafenin ortalama 4,5 Å olduğu görülmektedir. Corona virüsün Şekil 3.4'te belirtildiği üzere ilgili iki amino asit arasındaki mesafenin yakın olması sonucu virüsün çoğalma mekanizmasının aktif olduğu bilinmekte olup, ilgili ligandın yapıya dahil edilmesiyle birlikte bu mesafenin büyük oranda arttığı görülmektedir.



Şekil 4.4. 6M03 kodlu molekül için HIS41-CYS145 arası mesafe değerleri

4.4. 6M03 için Hidrojen Bağı Analizi

DHE ve arayüz amino asitleri arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri, Amber-18 simülasyon paketinin bir parçası olan Cpptraj programı ile izlendi. Şekil 4.5'te DHE'nin arayüz amino asitleri ile kurduğu hidrojen bağlarının zaman bağlı değişimi gösterilmektedir. Şekil 4.5 incelendiğinde, yörüngenin ilk çeyreğinde hidrojen bağlarının çoğunlukla oksijene bağlı hidrojen DHE (O4) ve THR280 (HG1), GLY278 (O) arasında meydana geldiği görülmektedir. Bu etkileşimler, toplam simülasyon süresinin yaklaşık yüzde 29'u olan 14637 framede gerçekleşmektedir. Simülasyon sırasında katalitik bölge amino asitleri olan CYS145 ve HIS41'in yapısında DHE bağlanmasına bağlı bir değişiklik olup olmadığı araştırıldı. Bu durumun anlaşılması için, yörünge frameleri üzerinde CYS145'in χ_1 yan zincir burulma açısı ve CYS145'in SG atomu ile HIS41'in NE2 atomu arasındaki mesafe izlendi.



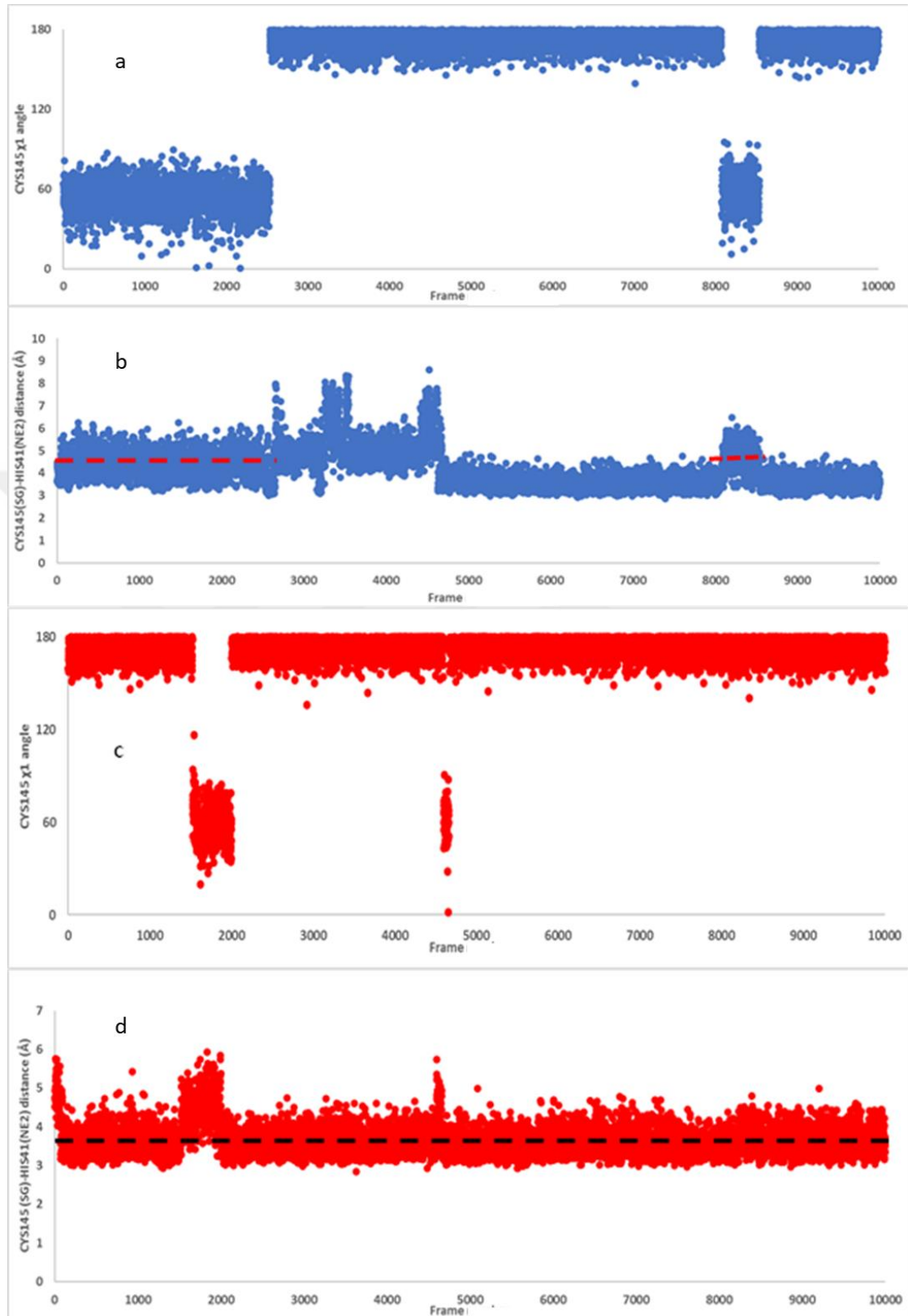
Şekil 4.5. 6M03 kodlu molekül için Hidrojen Bağı değerleri

Şekil 4.6 (a) ve (c), sırasıyla DHE-MPo kompleksi ve Apo-MPro sistemlerinin simülasyon süresince CYS145'in χ_1 açılarını göstermektedir. Şekil 4.6 (b) ve (d) ise SG-NE2 arasındaki mesafeyi göstermektedir. Şekil incelendiğinde DHE bağlanmasının simülasyonun ilk çeyreğinde SG-NE2 arasındaki mesafeyi 3,5 Å'dan 4,5 Å'a çıkarttığı ve CYS145'in χ_1 açısını 180°'den 60°'ye dönüştürdüğü izlenmektedir.

Şekil 4.1 (c)'de gösterilen iki farklı frameden CYS145'in χ_1 açılarının üst üste temsili anlık görüntüsü yer almaktadır. Bu çalışmanın geri kalanında, CYS145'in χ_1 açıları 60 ve 180 derece olduğunda sırasıyla “dışa konformasyon” ve “içe konformasyon” olarak adlandırılacaktır. CYS145'in χ_1 açısının değiştirilmesi, MPro katalitik aktivitesi için hayati önem taşıyan HIS41 (NE2) ve CYS145 (SG) atomları arasındaki mesafede bir değişikliğe neden olmaktadır. Ac-Val-Lys-Leu-Gln-ACC (ACC, 7-amino-4-karbamoilmetilkumarin floresan etiketidir) polipeptidinin MPro tarafından katalize edilen proteoliz reaksiyonunun modellendiği bir hesaplama çalışması gerçekleştirilmiştir (Świderek ve Moliner 2020). Araştırmacılar, proteoliz reaksiyonunun ilk aşaması için CYS145'ten HIS41'in nitrojenine (NE2) bir proton (HG) transferinin gerekli olduğunu göstermiştir. Daha sonra reaksiyon, CYS145'in kükürt (SG) tarafından peptit bağının karbonil karbon atomuna nükleofilik bir saldırı ile ilerler ve böylece bir tiyohemiketal (THA) ara maddesine yol açar. Yukarıdaki sonuca dayanarak, hidrojen donörü SG ile alıcı NE2 arasındaki mesafenin proteoliz reaksiyonunu başlatmak için kritik bir anahtar olduğu iddia edilebilir. Bir şekilde bu mesafe kritik bir değerden daha uzun tutulursa, proton transfer reaksiyonu gerçekleşmeyeceği için MPro'nun katalitik işlevi bozulduğu hipotezi önerilebilir. Yukarıdaki bulgulara dayanarak, dimer arayüzünde meydana gelen hidrojen bağı etkileşimleri ile katalitik bölgedeki CYS145'in χ_1 açısı arasında bir ilişki

olabilir. Çünkü Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 (b) birlikte değerlendirilirse DHE'nin THR278 ve GLU280 ile hidrojen bağı yaptığında (simülasyonun ilk çeyreğinde) χ_1 açısının 60 derece olduğu görülmektedir.

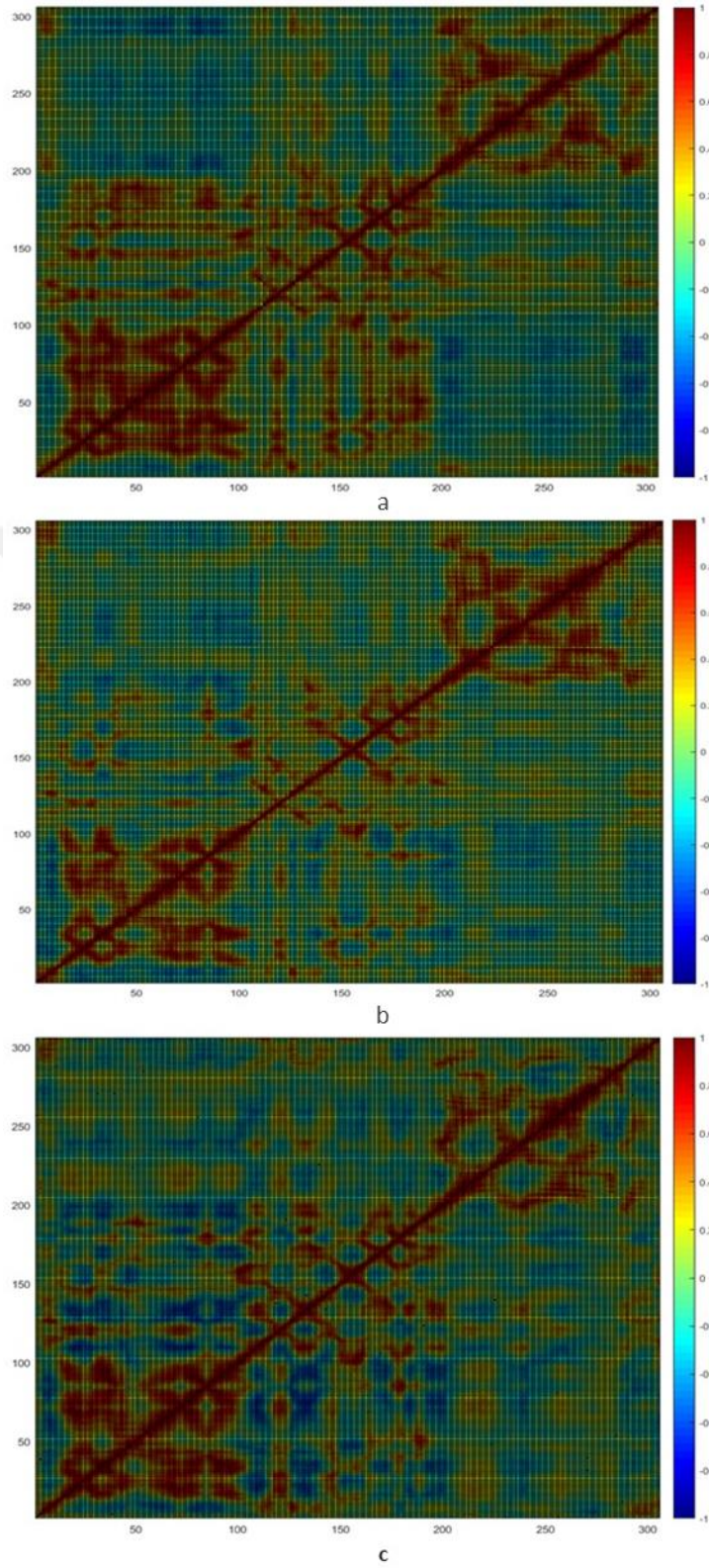
CYS145'in χ_1 açısının dışa konformasyonundan (60 derece) içe konformasyona (180 derece) değişmesi, daha kısa SG-NE2 mesafesi ile sonuçlandığı görülmektedir. Kısa SG-NE2 mesafesi durumunda, proteoliz reaksiyonunu başlatmak için gerekli olan SG'den NE2'ye proton transferi daha olasıdır (Świderek ve Moliner 2020). Bu nedenle, çalışmanın geri kalanı, “içe konformasyon” ve “dışa konformasyon” sırasıyla “aktif yapı ve inaktif yapı” olarak adlandırılacaktır. DHE ve onu çevreleyen amino asitler özellikle GLY278 ve THR280 ile arasındaki belirli hidrojen bağı etkileşimlerinin muhtemelen katalitik bölgenin yapısını alosterik olarak etkilediği görülmektedir. Bu nedenle, GLY278 ve THR280 amino asitleri, uzaysal komşuları GLY2, PHE3, ARG4, GLN127, ASP216, ARG217, SER284 ve ALA285 ile birlikte bundan böyle alosterik amino asitler olarak adlandırılacaktır. İlerleyen bölümlerde, farklı yörünge analiz araçları kullanarak böyle bir alosterik etkinin varlığı rasyonelleştirmeye çalışılacaktır.



Şekil 4.6. 6M03 için CYS145'in dihedral açısı ve CYS145 ile HIS41 arası mesafe

4.5. 6M03 için DCC

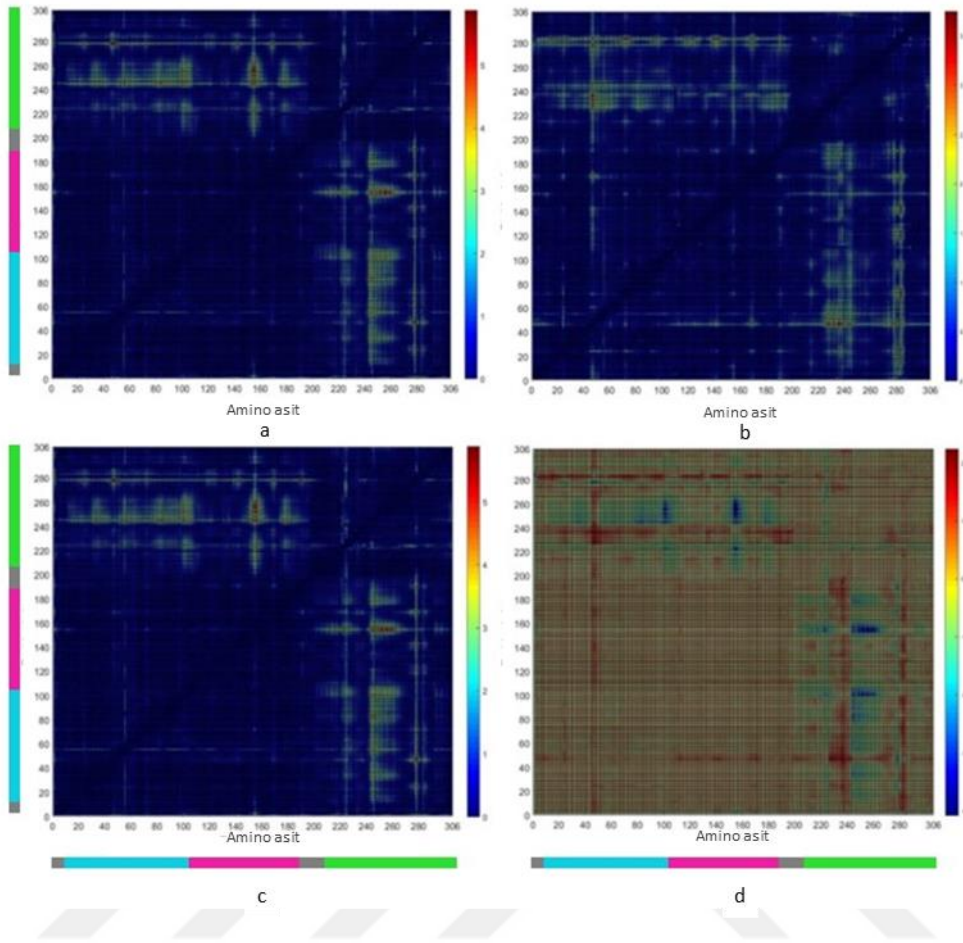
Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, 200 ns simülasyonu boyunca DHE-MPo kompleks yörüngesinin incelenmesi, DHE'nin dimer arayüz bölgesinde oldukça hareketli olduğunu ve onu çevreleyen aminoasitlerle farklı etkileşimler sergilediği ortaya konuldu. Simülasyonun ilk çeyreğinde, MPro'nun katalitik bölgesi aktif olmayan bir durumdayken, simülasyonun geri kalanı, yörüngesinin son çeyreğinde yaklaşık 2500 frame (10 ns) dışında aktif bir durumdadır. Burada, aktif durum ve aktif olmayan durum ile Apo-MPro durumu için amino asitlerin çapraz korelasyonları ve iletişim eğilimlerindeki farklılıklar araştırıldı. Şekil 4.7 (a), (b) ve (c) sırasıyla DHE-MPro kompleksinin aktif ve inaktif durumları ve Apo-MPro durumları için dinamik çapraz korelasyon haritalarını göstermektedir. Dinamik çapraz korelasyon haritaları incelendiğinde, alan I ve alan II arasındaki genel olarak alanlar arası korelasyonların, aktif durumda DHE-MPro ve Apo-MPro'nun aktif olmayan durumuna kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir. Aktif durumda, DHE'nin kendisini çevreleyen amino asitlerle etkileşimleri, özellikle GLY278 ve THR280 ile hidrojen bağları göz önüne alındığında, bu etkileşimlerin alan I ve alan II arasındaki sinyal iletimini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Komşu amino asitlerin hareketleri birbirleriyle yüksek oranda ilişkiliyse, bu, bir amino aside uygulanan pertürbasyonun (örneğin hidrojen bağı, anyon-kasyon etkileşimi vs.) yüksek düzeyde ilişkili komşu ağlar aracılığıyla yayılarak uzun menzilli alosterik etkiler üretebildiği bir “domino etkisine” yol açabilir (McLeish vd. 2015). DHE bağlanması nedeniyle alan I ve alan II arasındaki artan korelasyon ve CYS145'in katalitik bölgesinin χ_1 açısındaki değişiklik, DHE'nin bağlanma bölgesinin bir alosterik alan olma olasılığını desteklemektedir.



Şekil 4.7. 6M03'ün; **a)** DHE-MPro aktif; **b)** DHE-MPro inaktif; **c)** Apo-MPro DCC değerleri

4.6. 6M03 için İletişim Eğilimi

CP, DHE-MPro kompleksinin aktif durumu ve inaktif durumu için amino asit çiftlerinin haritaları, Apo-MPro sırasıyla Şekil 4.8 (a), (b), (c)'de gösterilmektedir. Şekil 4.8 (d), DHE-MPro ve Apo-MPro'nun aktif olmayan durumu arasındaki değerlerdeki farkı göstermektedir. CP'nin doğrudan iletişim süresi ile ilgili olduğunu belirtmekte fayda var, bu nedenle bir amino asit çiftinin düşük CP değeri, birbirleriyle daha verimli iletişim kurduklarını ifade eder (Chennubhotla ve Bahar 2007; Morra vd. 2009). Şekil 4.8 incelendiğinde, her üç durum için de önemli sayıda alan III amino asitlerinin alan I ve alan II amino asitleri ile geri kalanlara kıyasla daha az verimli bir şekilde iletişim kurduğu görülmektedir. Şekil 4.8 (d) Apo-MPro'nun amino asit çiftlerine ait değerlerin DHE-MPro'ların inaktif durumundan çıkarılmasıyla elde edilen, DHE bağlanması üzerine iletişim etkinliğinin artıp artmadığının belirlenmesine yardımcı olabilir. Şekil 4.8 (d)'de, amino asit çiftlerinin (koyu maviden sarıya) negatif değerleri, DHE bağlanması üzerine artan değerleri gösterilmektedir. Bu sonuç, alan III amino asitleri ile MPro'nun geri kalanı arasındaki değerlerin, DHE bağlanması nedeniyle yükseldiğine işaret etmektedir. Özellikle, DHE bağlanması üzerine alosterik bölge ve katalitik bölge amino asitleri arasındaki değerlerde meydana gelen değişimi Çizelge 4.1'de verilmektedir. Hem Apo-MPro hem de DHE-MPro kompleksi için, Çizelge 4.1'deki verilerin ilk satırları ve sütunları, üzerinden hesaplanan amino asitlerin ortalama değerlerini temsil etmektedir. DHE-MPro kompleksinin ASN277, GLY278 ve ARG279'unun ve Apo-MPro'nun GLY215, ASP216, ASN277, GLY278, ARG279 ve THR280 ortalama CP değerlerinin Çizelge 4.1'deki diğer amino asitlere kıyasla oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Apo-MPro durumunda, GLU278 ile katalitik bölge amino asitleri arasındaki değer, amino asit çiftleri arasında en yüksek iken, bu değerlerin DHE bağlanmasına yanıt olarak önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Apo-MPro ve DHE-MPro değerleri genel olarak karşılaştırıldığında DHE-MPro kompleksinde amino asit çiftleri arasındaki değerlerin daha düşük olduğu söylenebilir. Bu, DHE'nin GLU278 ve THR280 ile etkileşiminin, bu bölge ile katalitik bölge arasındaki iletişimi arttırdığı anlamına gelir. Bu sonuç, DHE'nin bağlandığı bölgenin bir alosterik bölge olma olasılığını desteklemektedir.



Şekil 4.8. 6M03'ün; **a)** DHE-MPro aktif; **b)** DHE-MPro inaktif; **c)** Apo-MPro; **d)** DHE-MPro ile Apo-MPro arasındaki fark durumları için CP değerleri

Çizelge 4.1. Alosterik ve Katalitik bölgelerde bulunan bazı amino asit çiftleri için CP değerleri

Apo-Mpro							
	Ort_CP	ARG40	HIS41	VAL42	SER144	CYS145	GLY146
Ort_CP		0,701	0,703	0,746	0,637	0,610	0,600
GLY2	0,939	0,437	0,409	0,437	0,477	0,420	0,475
PHE3	0,600	0,354	0,330	0,271	0,247	0,255	0,294
ARG4	0,550	0,175	0,182	0,171	0,197	0,164	0,145

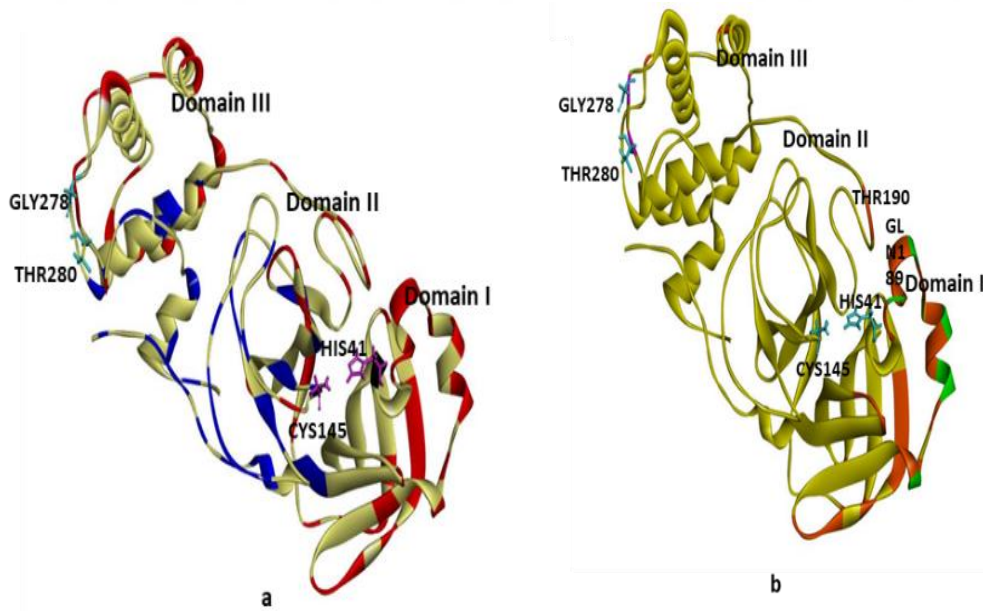
(Devamı Arkada)

Çizelge 4.1'in devamı.

ASN214	0,895	0,519	0,414	0,382	0,343	0,321	0,406
GLY215	1,003	0,455	0,367	0,348	0,364	0,305	0,357
ASP216	1,072	0,552	0,508	0,500	0,603	0,474	0,463
ASN277	1,618	1,575	1,862	1,995	2,145	1,856	1,468
GLY278	2,356	3,118	3,396	3,482	3,635	3,357	2,999
ARG279	1,227	0,900	1,088	1,178	1,376	1,121	0,864
THR280	1,025	0,603	0,750	0,878	1,106	0,852	0,642
ILE281	0,824	0,405	0,445	0,502	0,671	0,493	0,391
Aktif Durumda DHE-Mpro Kompleksi							
	Ava_CP	ARG40	HIS41	VAL42	SER144	CYS145	GLY146
Ava_CP		0,728	0,807	0,828	0,698	0,686	0,614
GLY2	0,445	0,206	0,299	0,271	0,360	0,290	0,194
PHE3	0,387	0,201	0,279	0,256	0,336	0,271	0,193
ARG4	0,424	0,241	0,329	0,289	0,339	0,294	0,206
ASN214	0,626	0,421	0,476	0,516	0,671	0,546	0,504
GLY215	0,718	0,294	0,351	0,395	0,567	0,430	0,391
ASP216	0,629	0,214	0,280	0,295	0,401	0,301	0,254
ASN277	1,281	0,918	1,106	1,092	1,176	1,069	0,880
GLY278	1,462	1,47	1,640	1,656	1,862	1,718	1,547
ARG279	1,075	0,741	0,866	0,918	1,200	1,014	0,895
THR280	0,986	0,777	0,906	0,988	1,299	1,085	0,965
ILE281	0,799	0,634	0,730	0,795	1,080	0,890	0,809

4.7. 6M03 için Amino Asit Etkileşim Ağı

Bu analizde, DHE bağlanmasından dolayı Mpro'nun amino asitleri arasındaki sinyal yayılma modelindeki değişikliği araştırmak için, arasındalık merkeziliği (BC) ve ortalama en kısa yol (L) olmak üzere iki grafik teorisi tabanlı ağ ölçümü kullanılmıştır. Bu analizde, hem Apo-Mpro hem de DHE-Mpro sistemleri beta karbonların (C β) olduğu bir amino asit ağı olarak kabul edilir. Her RIN, Apo-Mpro ve DHE-Mpro simülasyonlarından seçilen 5000 frame kullanılarak hesaplandı. DHE-Mpro'nun yörüngesinden 5000 framenin seçilmesi, özellikle, DHE'nin alosterik bölge amino asitleri ile etkileşime girdiğinin varsayıldığı, tüm simülasyonun ilk çeyreğinden alınmıştır. Amino asit bağlantısındaki değişikliği ve sonuç olarak DHE'nin Mpro'ya bağlanmasına yanıt olarak sinyal yayılımını belirlemek için, ΔBC (DHE-Mpro kompleksinin ortalama BC'si eksi Apo-Mpro'nun ortalama BC'si) ve ΔL (DHE-Mpro kompleksinin ortalama L'si eksi Apo-Mpro'nun ortalama L'si) hesaplandı. Önemli değişiklik gösteren amino asitleri ($\pm 2\sigma$) Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9'da sunulmuştur. Aslında, her iki ölçüm, BC ve L birbirleriyle ilişkilidir. Bir ağdaki iki amino asit, i ve j arasındaki L , j 'den i 'ye ulaşması gereken minimum kenar sayısına eşittir (Brown vd. 2017). Başka bir ifadeyle, L , ağı oluşturan diğer tüm amino asitlere en kısa yolları göz önünde bulundurularak belirli bir amino asitten tüm amino asitlere ortalama topolojik yayılımını vurgular (Amusengeri 2019). Büyük ΔL değerlerine sahip amino asitler, protein içi iletişim için önemli olarak yorumlanabilir. BC, belirli bir amino asitten geçen en kısa yolun sayısının bir ölçüsüdür. Amino asitlerin kullanım sıklığı, yüksek kullanım amino asitlerinin protein içi sinyal iletiminin kontrolünde bir rol oynadığını gösterir (Penkler 2019). Başka bir deyişle, bir amino asidin BC'si, bu amino asidin proteindeki diğer amino asitlerin etkileşimleri üzerinde uyguladığı etki miktarını yansıtır (Yoon 2006).



Şekil 4.9. DHE bağlanmasına bağlı olarak 6M03 için RIN değerlerindeki değişim **a)** ΔBC ; **b)** ΔL

Pozitif ΔBC değerine sahip amino asitler, protein içi iletişimdeki rollerinin DHE bağlanmasına yanıt olarak arttığı anlamına gelir. Şekil 4.9 (a)'da görülebileceği gibi, çoğunlukla alfa sarmal veya anti-paralel beta olarak yapılandırıldıkları alan I ve II'deki amino asitler pozitif ΔBC değerlerine sahipken, ilmek bölgelerindeki amino asitler negatif olmaya eğilimlidir. Önemli ΔBC değerlerine ($\pm 2 \sigma$ 'dan fazla) sahip amino asitlerin uzamsal konumu Şekil 4.9 (a)'da görülebilir. Bu şekilden, alan II'nin bir tarafındaki amino asitlerin (özellikle ASN180'den THR198'e kadar olan köprü amino asitlerin) uzamsal olarak pozitif ΔBC değerlerine sahip olduğu, ancak diğer taraftakilerin negatif ΔBC değerlerine sahip olduğu not edilebilir. Alan I ve alan III arasında uzamsal olarak uzanan köprü amino asitlerinin çoğu, pozitif ΔBC değerlerine sahiptir. Bu köprü amino asitlerinin, alan I ve alan III bölgeleri arasında bir sinyal yolu olarak işlev gördüğü görülmektedir. Bu sinyal iletim yolu, önerilen alosterik bölgenin (GLY278 ve THR280) alan III'te yer aldığı, buna karşın katalitik bölgenin 40 Å uzaklıkta olduğu gerçeği göz önüne alındığında, dimer arayüz bölgesi ile katalitik bölge arasında alosterik iletişimin var olma olasılığını desteklemektedir. Şekil 4.9 (b) ve Çizelge 4.2'de görülebileceği gibi, belirgin bir pozitif ΔL değerine sahip amino asitler çoğunlukla alan I'de toplanmıştır. Köprü amino asitlerin (ASN180'den THR198'e kadar) ΔL değerleri de pozitifdir ve şu şekilde yorumlanabilir: DHE bağlanmasına yanıt olarak erişilebilirliklerinin artmasına bağlı olarak önerilen alosterik bölge ve katalitik bölge arasındaki amino asit iletişiminde bir rol oynama olasılığı artmaktadır. Bu durum, yukarıda bahsedilen ΔBC değerlerinin sonuçlarıyla da uyumludur.

4.8. 6M03 için Transfer Entropi

DHE'nin Mpro'ya bağlanmasına tepki olarak önerilen alosterik bölgedeki amino asit konumlarındaki dalgalanmalarının belirsizliğindeki değişikliğin, katalitik bölgedeki amino asit konumlarındaki dalgalanmalarının belirsizliği üzerindeki etkisini anlamak için, amino asitler arasında meydana gelen TE hesaplandı. Alosterik bölge amino asitleri (GLY278 ve THR280), 15 uzamsal komşu amino asit ve katalitik bölge amino asidi (HIS41 ve CYS145), 8 uzamsal komşu amino asitleriyle birlikte, TE hesaplaması için toplam 27 amino asit dikkate alındı. Apo-Mpro ve DHE-Mpro kompleksi için seçilen amino asitlerin $C\alpha$ atomları arasındaki normalleştirilmiş yön indeksleri ($Dj \rightarrow i$) sırasıyla Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te sunulmuştur ve burada j atomu dikey, i atomu ise yatay ekseninde gösterilmektedir. Çizelge 4.5, DHE'nin Mpro'ya bağlanmasına yanıt olarak yönelim indekslerindeki değişikliği gösterir, $\Delta Dj \rightarrow i$ (DHE-Mpro kompleksinin $Dj \rightarrow i$ eksi Apo-Mpro'nun ortalama $Dj \rightarrow i$). Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te, pozitif işaretli noktalar, entropinin j amino asidinden i amino asidine aktarıldığını gösterir, negatif işaretli entropi aktarımı durumunda bunun tersi geçerlidir. Entropiyi j 'den i 'ye pozitif bir işaretle aktarmak, j amino asidinin dalgalanmalarının zaman gecikmeli olarak i amino asidinin dalgalanmalarını manipüle ettiği anlamına gelir. Başka bir deyişle, j amino asidi bir kaynak olarak işlev görürken i amino asidi soğurucu olarak davranır.

Çizelge 4.2. Her bir domain için Artan Azalan ΔBC ve ΔL değerleri

	ΔBC DEĞERLERİ ARTAN AMİNO ASİTLER	ΔL DEĞERLERİ ARTAN AMİNO ASİTLER	ΔBC DEĞERLERİ AZALAN AMİNO ASİTLER
Domain I	GLY23, ASP34, SER46, GLU47, ASP48, LEU50, ASN51, ASN53, GLU55, ASP56, ILE59, ARG60, SER62, HIS64, LEU67, ASN72, VAL73, GLN74, ARG76, ILE78, GLY79, HIS80, SER81, ASN84, LYS90, ASP92, THR93, ALA94, PRO96, LYS100, LYS12, GLY15, THR21, THR24, ASP33, THR45, LEU57, LEU58, LYS61, ASN63, ASN65, PHE66, GLY71, LEU75, MET82, GLN83, CYS85, LEU87, LYS88, ASN95, LYS97, THR98	GLU47, ASN51, ASP56, ILE59, ARG60, HIS64, GLY23, THR24, THR25, ASP34, CYS45, SER46, ASP48, MET49, LEU50, PRO52, ASN53, GLU55, LEU57, LEU58, LYS61, ASN63, ASN65, ASN72, VAL73, GLN74, ARG76, ILE78, GLY79, HIS80, SER81, ASP92, THR93	GLY2, LYS5, MET6, ALA7, PRO9, GLY11, VAL13, GLU14, MET17, VAL18, LEU27, PRO39
Domain II	LYS102, PFE103, VAL104, ASN142, TYR154, ASP155, GLU166, PRO168, THR169, GLY170, ASN180, PRO184, GLN189, ALA191, GLY195, ARG105, GLN107, PRO108, LEU141, GLY143, ASP153, CYS156, MET165, GLU178, GLY179, TYR182, GLY183, VAL186, THR190, ALA193, THR196, ASP197	GLN189, THR190	GLY109, THR111, PHE112, LEU115, ALA116, CYS117, PRO122, SER123, GLY124, VAL125, TYR126, CYS128, THR135, SER139, GLY146, VAL148, GLY149, HIS164, HIS172, ALA173
Domain III	TRP218, ARG222, PHE223, THR224, THR226, ASN228, ASP229, LEU232, MET235, LYS236, THR243, GLN244, ASP245, ASP248, PRO252, ALA255, GLN256, GLY258, ALA260, GLN273, ASN274, ASN277, GLY278, ARG279, GLY283, VAL212, ILE213, GLY215, ARG217, LEU220, ASN221, THR225, LEU227, ASN231, VAL233, PRO241, HIS246, GLY251, THR257, ILE259, LEU262, ASP263, ALA266, GLU270, GLY275, THR280, CYS300	ARG222, ASP229	ILE200, VAL204, ALA206, ASN214, LEU282, LEU286, LEU287, THR292, PRO293, PHE294, ARG298, VAL303

Çizelge 4.3. Apo-Mpro bazı amino asitler için TE değerleri

	SER	GLY2	PHE3	ARG4	LYS5	PRO29	ARG40	HIS41	VAL42	ILE43	GLY143	SER144	CYS145	GLY146	SER147	ASN214	GLY215	ASP216	ASN217	GLY218	ARG219	THR220	ILE221	LEU222	GLY223	SER224	ALA225
SER1	0																										
GLY2	-0.268	0																									
PHE3	-0.416	-0.111	0																								
ARG4	-0.441	-0.117	-0.023	0																							
LYS5	-0.261	0.0259	0.1165	0.1134	0																						
PRO29	-0.518	-0.202	-0.079	-0.065	-0.219	0																					
ARG40	-0.374	-0.031	0.071	0.083	-0.091	0.1107	0																				
HIS41	-0.435	-0.093	0.0131	0.0248	-0.144	0.1006	-0.021	0																			
VAL42	-0.357	-0.015	0.091	0.1008	-0.056	0.1653	0.038	0.0624	0																		
ILE43	-0.279	0.073	0.1379	0.1468	-0.015	0.2229	0.0751	0.0079	0.0125	0																	
GLY143	-0.504	-0.177	-0.066	-0.041	-0.191	0.0243	-0.118	-0.069	-0.137	-0.212	0																
SER144	-0.572	-0.243	-0.133	-0.1	-0.268	-0.082	-0.182	-0.117	-0.195	-0.257	-0.034	0															
CYS145	-0.586	-0.263	-0.162	-0.132	-0.289	-0.065	-0.207	-0.186	-0.232	-0.276	-0.08	-0.085	0														
GLY146	-0.715	-0.39	-0.272	-0.253	-0.409	-0.191	-0.315	-0.207	-0.354	-0.403	-0.191	-0.345	-0.192	0													
SER147	-0.681	-0.37	-0.258	-0.237	-0.389	-0.165	-0.313	-0.205	-0.345	-0.385	-0.182	-0.336	-0.192	0.007	0												
ASN214	-0.146	0.1733	0.2597	0.2712	0.1119	0.3513	0.199	0.2701	0.1872	0.1341	0.3245	0.4072	0.2205	0.3657	0.5234	0											
GLY215	-0.25	0.0641	0.1723	0.18	0.0887	0.2536	0.1957	0.1705	0.0623	0.0276	0.2401	0.2792	0.2275	0.4514	0.4146	-0.075	0										
ASP216	-0.11	0.2297	0.333	0.336	0.3564	0.4172	0.2958	0.2012	0.2476	0.1758	0.3729	0.446	0.2007	0.8063	0.5752	0.0487	0.3416	0									
ASN217	-0.11	0.1383	0.2507	0.2468	0.3054	0.3186	0.1768	0.2282	0.16	0.0893	0.3014	0.3343	0.2005	0.5288	0.5073	-0.037	0.064	-0.084	0								
GLY218	-0.095	0.258	0.3732	0.3702	0.3044	0.4426	0.2877	0.2485	0.2702	0.2302	0.4149	0.5009	0.5376	0.8528	0.836	0.0672	0.3745	0.0236	0.0564	0							
ARG219	-0.085	0.3493	0.3394	0.3457	0.3793	0.4242	0.2994	0.1787	0.2553	0.2076	0.4243	0.4843	0.5009	0.8247	0.5634	0.0559	0.3508	0.028	0.0711	-0.011	0						
THR220	-0.206	0.0405	0.1645	0.1772	-0.0506	0.2534	0.0844	0.3468	0.0586	0.0099	0.2133	0.278	0.302	0.432	0.4041	-0.111	0.028	-0.358	-0.079	0.106	-0.104	0					
ILE221	-0.236	0.0161	0.2056	0.2192	0.3473	0.2811	0.1392	0.1065	0.1241	0.0952	0.2649	0.3246	0.2536	0.4774	0.4498	-0.037	0.0212	-0.119	-0.012	-0.115	-0.095	-0.086	0				
LEU222	-0.249	0.0594	0.1837	0.194	0.3288	0.2657	0.1195	0.1712	0.1085	0.0269	0.3406	0.3143	0.2774	0.4679	0.4334	-0.074	0.0051	-0.126	-0.058	-0.174	-0.128	-0.0901	-0.006	0			
GLY223	-0.287	0.0628	0.1671	0.1708	0.3236	0.2563	0.0765	0.1501	0.0876	0.0553	0.225	0.2506	0.2775	0.4504	0.4251	-0.097	-0.004	-0.344	-0.061	-0.164	-0.153	-0.0926	0.0478	0.0587	0.0302	0	
SER224	-0.148	0.1877	0.2767	0.2785	0.3201	0.348	0.2095	0.2729	0.1955	0.1364	0.343	0.4188	0.4711	0.5582	0.5238	-0.006	0.0558	-0.05	0.0369	-0.077	-0.064	-0.0426	0.0478	0.0587	0.0302	0	
ALA225	-0.203	0.1227	0.2304	0.257	0.076	0.2086	0.1525	0.1772	0.136	0.0741	0.2871	0.3608	0.4779	0.5047	0.4758	-0.039	0.0577	-0.086	0.0005	-0.109	-0.087	-0.0502	0.0256	0.0334	0.0313	-0.008	0

Çizelge 4.4. DHE-Mpro bazı amino asitler için TE değerleri

	SER1	GLY2	PHE3	ARG4	LYS5	PRO39	ARG40	HIS41	VAL42	ILE43	GLY143	SER144	CYS145	GLY146	SER147	ASN214	GLY215	ASP216	ASN217	GLY278	ARG279	THR280	ILE281	LEU282	GLY283	SER284	ALA285
SER1	0																										
GLY2	-0.12	0																									
PHE3	-0.12	0.015	0																								
ARG4	0.043	0.16	0.116	0																							
LYS5	0.189	0.303	0.29	0.115	0																						
PRO39	-0.11	0.049	0.052	-0.13	-0.29	0																					
ARG40	0.001	0.153	0.144	-0.04	-0.21	0.127	0																				
HIS41	0.019	0.172	0.17	-0.03	-0.19	0.122	0.011	0																			
VAL42	0.041	0.192	0.189	0.005	-0.14	0.131	0.018	-0.01	0																		
ILE43	0.069	0.196	0.202	0.029	-0.12	0.148	0.028	0.019	0.009	0																	
GLY143	-0.21	-0.07	-0.06	-0.26	-0.42	-0.11	-0.22	-0.25	-0.25	-0.26	0																
SER144	-0.19	-0.05	-0.05	-0.23	-0.4	-0.1	-0.21	-0.22	-0.23	-0.25	0.003	0															
CYS145	-0.16	-0.03	-0.02	-0.2	-0.31	-0.07	-0.18	-0.2	-0.21	-0.22	0.027	0.01	0														
GLY146	-0.25	-0.1	-0.1	-0.28	-0.44	-0.14	-0.24	-0.27	-0.27	-0.3	-0.04	-0.05	-0.05	0													
SER147	-0.3	-0.15	-0.14	-0.33	-0.48	-0.18	-0.29	-0.31	-0.33	-0.34	-0.08	-0.09	-0.1	-0.03	0												
ASN214	-0.02	0.109	0.103	-0.07	-0.23	0.057	-0.04	-0.09	-0.09	-0.11	0.176	0.155	0.131	0.19	0.247	0											
GLY215	-0.06	0.057	0.055	-0.11	-0.25	0.01	-0.08	-0.1	-0.12	-0.14	0.126	0.125	0.081	0.165	0.195	-0.05	0										
ASP216	-0.02	0.113	0.112	-0.06	-0.21	0.063	-0.02	-0.04	-0.07	-0.09	0.189	0.164	0.137	0.213	0.263	0.014	0.058	0									
ASN217	0.272	0.396	0.397	0.196	0.055	0.354	0.273	0.245	0.206	0.204	0.474	0.47	0.379	0.498	0.54	0.278	0.303	0.258	0								
GLY278	0.292	0.411	0.412	0.222	0.084	0.392	0.305	0.228	0.259	0.226	0.508	0.5	0.3	0.537	0.569	0.291	0.326	0.267	0.013	0							
ARG279	0.315	0.442	0.44	0.243	0.135	0.409	0.334	0.219	0.278	0.257	0.541	0.524	0.377	0.554	0.59	0.297	0.352	0.301	0.039	0.011	0						
THR280	0.272	0.389	0.374	0.195	0.076	0.351	0.281	0.258	0.219	0.211	0.459	0.407	0.406	0.303	0.347	0.249	0.29	0.253	0.031	0.001	-0.002	0					
ILE281	0.271	0.378	0.368	0.204	0.066	0.347	0.267	0.254	0.23	0.193	0.473	0.458	0.41	0.471	0.52	0.243	0.295	0.231	0.045	0.013	-0.04	-0.02	0				
LEU282	0.32	0.392	0.356	0.225	0.131	0.409	0.332	0.231	0.284	0.285	0.543	0.507	0.424	0.53	0.574	0.271	0.343	0.286	0.073	0.058	-0.02	-0.01	0.006	0			
GLY283	0.308	0.374	0.377	0.201	0.096	0.378	0.305	0.201	0.268	0.243	0.506	0.485	0.446	0.512	0.543	0.259	0.31	0.25	0.048	0.018	-0.02	-0.02	-0	-0.01	0.019	0	
SER284	0.306	0.423	0.412	0.253	0.106	0.402	0.314	0.201	0.274	0.262	0.54	0.504	0.439	0.551	0.595	0.3	0.338	0.287	0.052	0.053	-0.01	-0.014	0.031	-0.01	0.019	0	
ALA285	0.185	0.324	0.314	0.128	-0.01	0.298	0.212	0.182	0.151	0.143	0.434	0.399	0.335	0.432	0.47	0.192	0.231	0.18	-0.05	-0.06	-0.13	-0.08	-0.08	-0.09	-0.09	-0.11	0

Çizelge 4.5. DHE-Mpro ile Apo-Mpro arasındaki fark TE değerleri

	SER1	GLY2	PHE3	ARG4	LYS5	PRO39	ARG40	HIS41	VAL42	ILE43	GLY143	SER144	CYS145	GLY146	SER147	ASN214	GLY215	ASP216	ASN217	GLY278	ARG279	THR280	ILE281	LEU282	GLY283	SER284	ALA285
SER1	0																										
GLY2	0.1496	0																									
PHE3	0.2996	0.1262	0																								
ARG4	0.4835	0.2768	0.1388	0																							
LYS5	0.4501	0.2769	0.1756	0.0016	0																						
PRO39	0.4126	0.2504	0.1309	-0.066	-0.072	0																					
ARG40	0.3747	0.184	0.0732	-0.124	-0.119	0.0158	0																				
HIS41	0.436	0.2633	0.1391	-0.053	-0.045	0.0217	0.033	0																			
VAL42	0.3982	0.2078	0.0864	-0.096	-0.089	-0.034	-0.015	-0.038	0																		
ILE43	0.3481	0.1584	0.057	-0.118	-0.102	-0.074	-0.047	-0.078	-0.033	0																	
GLY143	0.3974	0.1112	0.0046	-0.215	-0.228	-0.138	-0.099	-0.17	-0.11	-0.048	0																
SER144	0.3777	0.1973	0.0876	-0.128	-0.13	-0.067	-0.029	-0.088	-0.037	0.004	0.0372	0															
CYS145	0.4625	0.2411	0.1018	-0.069	-0.094	-0.013	0.0283	-0.029	0.0235	0.061	0.4923	0.0442	0														
GLY146	0.4662	0.2893	0.1758	-0.032	-0.031	0.0547	0.075	0.0138	0.0799	0.1053	0.146	0.0824	0.048	0													
SER147	0.3852	0.2235	0.1185	-0.088	-0.086	-0.016	0.0219	-0.041	0.0174	0.0432	0.1035	0.0501	0.0005	-0.027	0												
ASN214	0.1219	-0.065	-0.157	-0.34	-0.336	-0.285	-0.243	-0.308	-0.277	-0.244	-0.149	-0.252	-0.308	-0.376	-0.277	0											
GLY215	0.1863	-0.007	-0.117	-0.289	-0.289	-0.243	-0.185	-0.27	-0.202	-0.167	-0.114	-0.167	-0.208	-0.287	-0.219	0.0204	0										
ASP216	0.1016	-0.117	-0.221	-0.4	-0.368	-0.388	-0.278	-0.319	-0.262	-0.184	-0.302	-0.308	-0.396	-0.313	-0.05	-0.083	0										
ASN217	0.4824	0.2578	0.1464	-0.071	-0.041	0.0158	0.0946	0.0064	0.0645	0.1149	0.173	0.0855	0.013	-0.031	0.0524	0.3147	0.2346	0.3421	0								
GLY278	0.3872	0.1539	0.019	-0.167	-0.111	-0.08	0.012	-0.083	-0.013	0.0137	0.0912	-0.2621	-0.063	-0.106	-0.069	0.2259	0.1310	0.2432	-0.039	0							
ARG279	0.3997	0.1951	0.1012	-0.105	-0.044	-0.015	0.0741	-0.019	0.0234	0.0489	0.1349	0.0196	-0.019	-0.071	0.0085	0.2414	0.2008	0.2976	-0.032	0.0112	0						
THR280	0.3703	0.1392	0.2098	0.074	0.0822	0.0932	0.119	0.1115	0.1705	0.2031	0.2851	0.1109	0.1168	0.0712	0.1311	0.3999	0.3051	0.4112	0.1094	0.0699	0.0851	0					
ILE281	0.5066	0.2799	0.162	-0.014	0.0184	0.0536	0.1274	0.0533	0.1056	0.1374	0.2078	0.1338	0.0591	-0.008	0.072	0.3128	0.2736	0.3491	0.0765	0.1627	0.0556	0.0137	0				
LEU282	0.5695	0.3124	0.1743	0.007	0.1026	0.1433	0.2185	0.1599	0.1753	0.2578	0.3028	0.1932	0.1506	0.0619	0.143	0.3456	0.3378	0.4117	0.1318	0.2317	0.1097	0.0047	0.0118	0			
GLY283	0.5945	0.3111	0.2095	0.004	0.0723	0.1219	0.2114	0.1307	0.1802	0.2276	0.2772	0.1946	0.1202	0.0611	0.1182	0.3565	0.314	0.3946	0.1062	0.1825	0.1295	-0.02	-0.005	-0.048	0		
SER284	0.4546	0.2355	0.1134	-0.045	-0.014	0.054	0.1042	0.03	0.0783	0.1258	0.1968	0.0855	0.0476	-0.007	0.0718	0.3062	0.2421	0.3375	0.0135	0.1237	0.0554	-0.029	-0.017	-0.066	-0.011	0	
ALA285	0.3879	0.2011	0.0841	-0.129	-0.085	-0.001	0.0596	-0.033	0.015	0.0689	0.1489	0.0383	-0.019	-0.073	-0.006	0.2305	0.1736	0.2657	-0.048	0.0491	-0.04	-0.139	-0.104	-0.124	-0.118	-0.104	0

Çizelge 4.3'e göre, Apo-Mpro durumunda, önerilen alosterik bölge amino asitleri (GLY278 ve THR280), 15 uzamsal komşu amino asidiyle birlikte, pozitif $Dj \rightarrow i$ değerlerinden görüldüğü gibi katalitik bölge amino asitlerine entropi transferi sağlamaktadır. Çizelge 4.4'ten görülebileceği gibi, DHE bağlanmasına yanıt olarak, GLY278 ve THR280'in uzamsal komşusu olan halka (ASN214, GLY215, ASP216) amino asitleri artık ARG40, HIS41 alan I amino asitleri için entropi kaynağı olarak hareket etmemektedir. Genel olarak, DHE bağlanmasına yanıt olarak alosterik bölge amino asitlerinden katalitik bölge amino asitlerine TE değerlerinin şiddeti, Çizelge 4.5'te görülebileceği üzere artmıştır. Özellikle, katalitik bölge amino asitleri (HIS41 ve CYS145) söz konusu olduğunda, THR280'den HIS41'e ve THR280'den CYS145'e TE değerinin ($Dj \rightarrow i$) şiddetleri, sırasıyla 0,146'dan 0,258'e ve 0,308'den 0,426'ya büyük ölçüde artış göstermiştir.

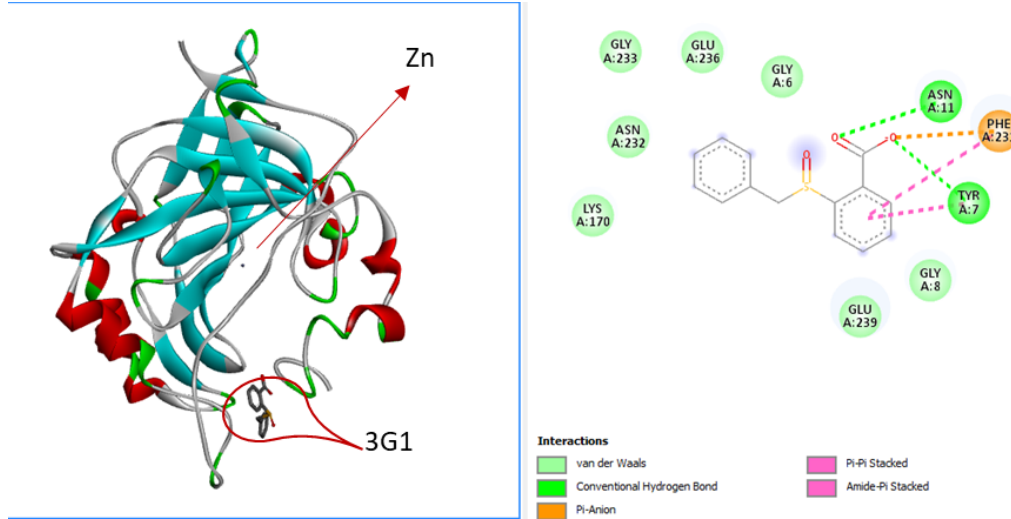
İlaç tasarımı açısından, kaynak-soğurucu ilişkilerinin tanımlanması önemlidir. Amino asit çiftleri arasında transfer entropi analizi prosedürü kullanılarak, amino asit

dalgalanmalarının sebebi olarak kaynak amino asitler belirlenirse, böylece korelasyonların doğasında bulunan nedensellik belirlenmiş olur. Bu bağlamda, kaynak amino asitleri, soğurucu amino asitlerden (etkilenen) daha kritiktir. Çünkü kaynak amino asitlere edilen bir müdahale (örneğin ligand bağlanması) zaman gecikmeli olarak entropi aktarımıyla soğurucunun dalgalanmalarına etki edecektir. Soğurucunun dalgalanmalarındaki değişim yüksek olasılıkla bu amino asitlerin işlevini etkileyecektir (Hacisuleyman ve Erman 2017a; Kamberaj ve Vaart 2009).

Yukarıdaki bilgiler ışığında, Apo-Mpro ve DHE-Mpro kompleksi için TE sonuçlarının analizleri, önerilen alosterik bölgenin gerçek bir alosterik bölge olduğu fikrini desteklemektedir. Çünkü analiz sonuçları, GLY278 ve THR280'in HIS41 ve CYS145 katalitik bölge amino asitlerini etkilediğini göstermektedir. GLY278 ve THR280'in manipülasyona uğraması (hidrojen bağları kurarak DHE bağlanmasıyla), THR280'den HIS41'e ve CYS145'e bilgi akışı miktarında ciddi bir artışa neden olmuştur. Mpro katalitik işleviyle ilgili olan CYS145'in χ_1 açısındaki bir değişiklik, bilgi akışı miktarındaki bu büyük artıştan kaynaklanmış olabilir.

Günasekaran (2004) alosterinin tüm dinamik proteinlerin içsel bir özelliği olduğunu öne sürmüştür. Yazar, alosterinin bir proteinin konformasyonel topluluğunun yeniden dağılımından kaynaklandığını belirtmiştir. Bir bölgede ligand bağlanması gibi yapısal değişiklikler popülasyonun yeniden dağılımına yol açar. Alosterik enzimlerde, ortosterik bölge amino asit yapıları, ligandın alosterik bölgeye bağlanmasına yanıt olarak değişen protein dinamiklerinden, ya büyük ölçekli konformasyonel değişiklikler yoluyla ya da her iki bölgeden gelen amino asitlerin bazıları arasındaki ilişkili hareketlerdeki daha ince değişiklikler yoluyla etkilenir (Nussinov 2016; Wagner 2016). Bu çalışmanın sonuçları, ligand bağlanmasına yanıt olarak ilgili yapıda önemli bir konformasyonel değişiklik olmadığını göstermektedir. Ancak, ligand bağlanmasının önerilen alosterik bölgenin amino asitleri (GLY278 ve THR280) ile katalitik bölgenin amino asitleri (HIS41 ve CYS145) arasındaki korelasyonlu hareketlerde ince değişikliklere yol açtığı sonucuna MD simülasyonlarının yörünge analizlerinden varılmıştır.

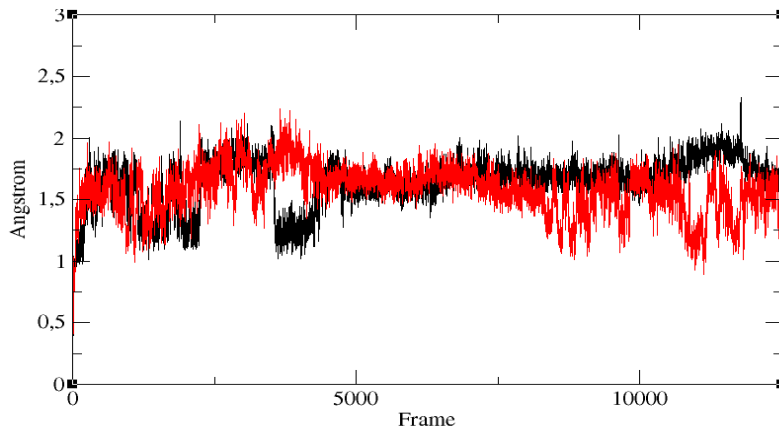
Tez çalışmasına konu olan bir diğer enzim yapısı da 4QY3 erişim kodlu CA II metalo-enzimidir. Hem 3G1-CA II hem de Apo-CA II sistemleri için 200 ns MD simülasyonu iki replika olarak gerçekleştirildi. Şekil 4.10, 3G1-CA II sistemini göstermektedir. Aktif bölgeden belirli bir uzaklıkta bulunan alosterik bölgede TYR7 ve ASN11'e hidrojen bağlarıyla bağlanan 3G1'in bağlanma yeri ve aktif bölgede bulunan çinko atomunun (Zn^{+2}) konumları gösterilmektedir.



Şekil 4.10. 4QY3'ün 3G1-CA II kompleksi ve 3G1'in CA II ile yaptığı kovalent olmayan etkileşimler

4.9. 4QY3 için RMSD

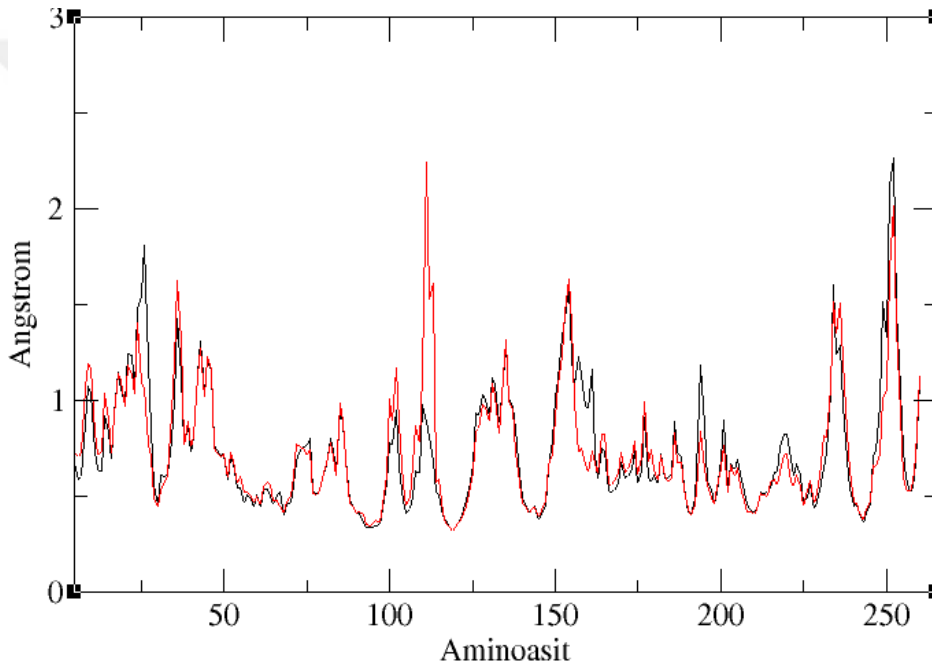
4QY3 kodlu CA II moleküler yapı için Şekil 4.11 incelendiğinde siyah ile belirtilen ligandsız, kırmızı ile belirtilen ligandlı yapının RMSD değerlerindeki değişim görülmektedir. RMSD değerleri, yapıyı oluşturan atomların ortalama sapma miktarlarını zaman boyutuna göre göstermektedir. 3500-4000 frame zaman aralığında ligandsız yapıda RMSD değerleri azalma eğilimindeyken ligandlı yapıya ait değerlerde ligandsız göre daha yüksek değerler söz konusudur. Ayrıca yaklaşık 8000 ile 12500 framelik zaman aralığında ligandsız yapıda RMSD değerleri dengedeysen, 3G1 ligandının 4QY3'e entegre edilmesiyle aynı zaman diliminde RMSD değerlerinde düşüşler meydana gelmektedir. RMSD değerleri yapıyı oluşturan atomların referans değerden ortalama sapma miktarlarını ifade ettiğinden dolayı, ilgili ligandın CA II enzimini stabilize ettiği şeklinde yorumlanabilmektedir.



Şekil 4.11. 4QY3 kodlu molekül için RMSD değerleri

4.10. 4QY3 için RMSF

Şekil 4.12 CA II'nin Apo ve 3G1 ile yaptığı kompleksin amino asitlerinin rmsf değerlerini göstermektedir. Grafikte siyah ile gösterilen Apo-CA II, kırmızı ile belirtilen 3G1-CA II yapısının RMSF değerlerini göstermektedir. RMSF, moleküler yapı analizlerinde her bir amino asidin alfa karbon atomları kullanılarak amino asitlerin ortalama dalgalanma miktarları hakkında bilgi sunar. Grafikten anlaşılabacağı üzere 260 amino asitten oluşan 4QY3'ün RMSF değerleri incelendiğinde 3G1 ligandının varlığında 131 amino asidin salınımlarında artış olduğu görülmektedir. Özellikle alosterik ve aktif bölge civarındaki çoğu amino asitler için ligandlı durumdaki RMSF değerleri ligandsız duruma kıyasla yükselmiştir. RMSF değerleri incelendiğinde en yüksek farkı gösteren ilk on amino asit sırasıyla; LYS111, LYS113, LYS112, MET1, SER2, THR108, GLN103, LEU100, PRO237 ve GLY102'dir. Bu amino asitler aktif bölge ile 3G1 ligandının bağlı olduğu alosterik olarak düşünülen bölgelerde bulunmaktadır.

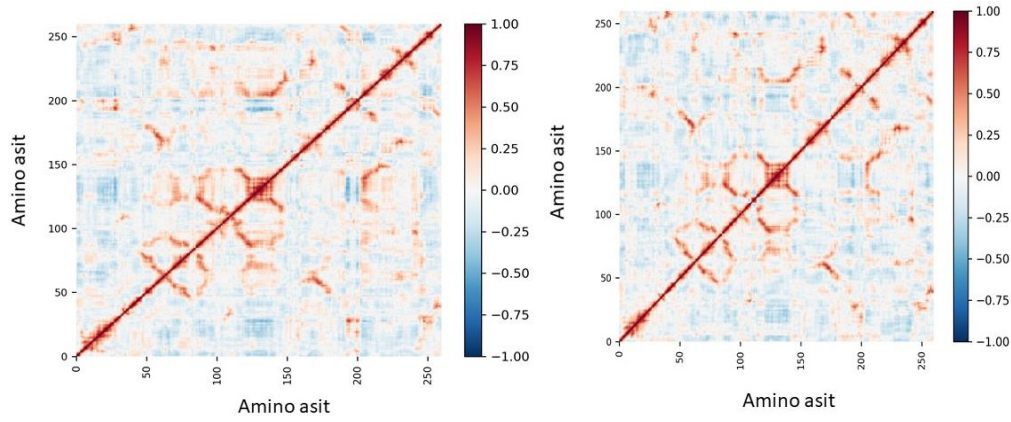


Şekil 4.12. 4QY3'ün Apo-CA II ve 3G1-CA II komplekslerinin RMSF değerleri

4.11. 4QY3 için Dinamik Çapraz Korelasyon

CA II metalo-enzimi için bir diğer analiz DCC'dir. Bu analiz sonucunda 4QY3'ün hem ligandsız hem de ligandlı yapısı karşılaştırılmıştır. Yapılan DCC analizi sonuçları, ligandsız ve ligandlı yapılar için sırasıyla Şekil 4.14 (a) ve Şekil 4.14 (b)'de görüldüğü gibidir. İki grafikteki değerler incelendiğinde; kırmızı (+1 değerleri) ile belirtilen yerler çapraz iki amino aside ait hareketlerin aynı yönde olduğunu, mavi (-1 değerleri) ile belirtilen yerler ise hareketlerin zıt yönde olduğunu göstermektedir. Grafiklerdeki beyaz (0) değerlerin olduğu kısımlar da ilgili iki amino asit arasında herhangi bir korelasyon olmadığını ifade etmektedir. Şekil 4.14'e ilk bakışta 3G1 bağlanmasının bir etkisinin

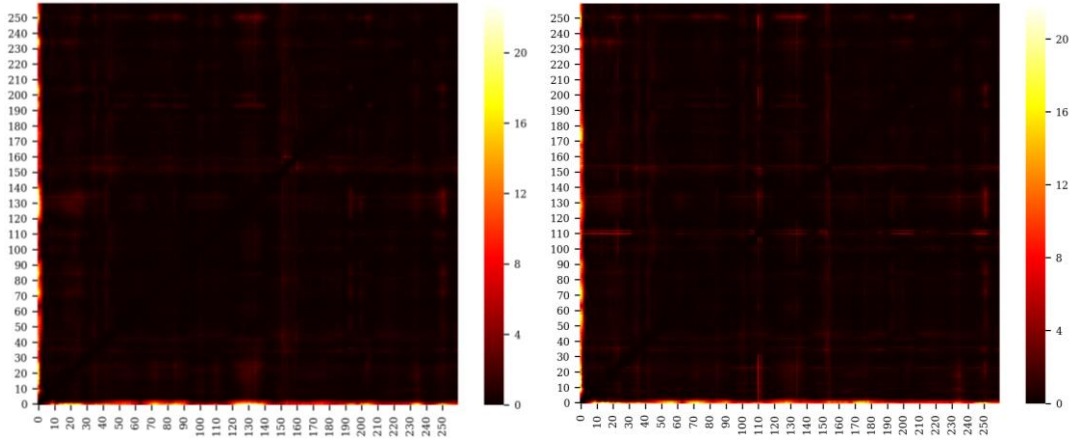
olmadığı düşünülse de veriler tablolaştırılıp farkı alındığında ligand bağlanmasının genel olarak korelasyonda artışa sebep olduğu gözlenmektedir.



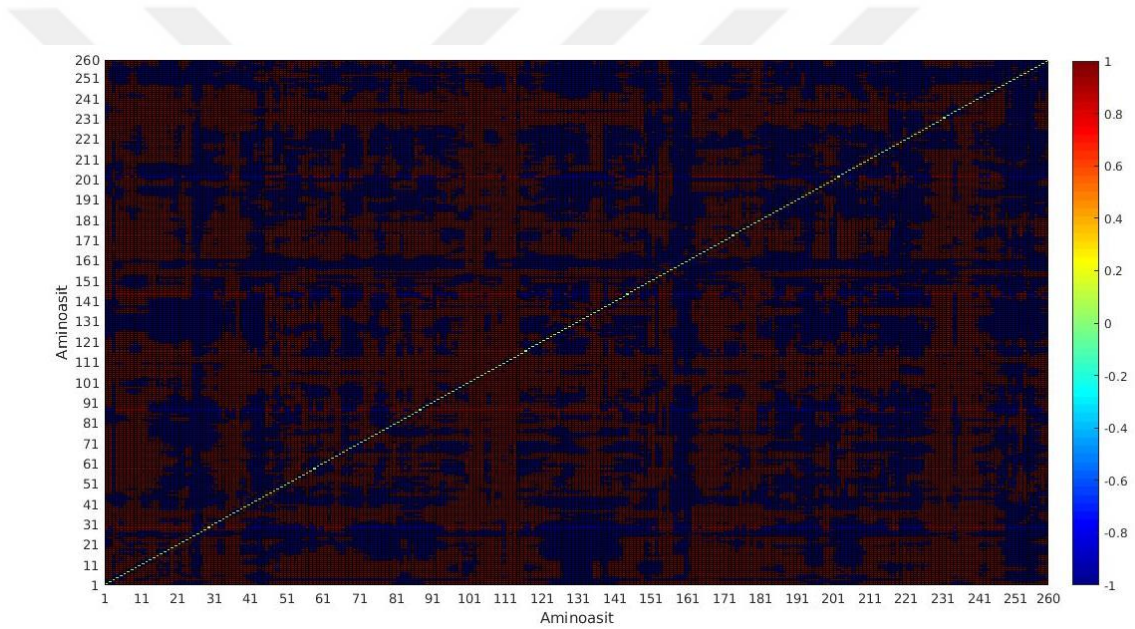
Şekil 4.13. 4QY3 a) Apo-CA II; b) 3G1-CA II için DCC değerleri

4.12. 4QY3 için İletişim Eğilimi

CP, bir protein yapısında bulunan amino asitlerin kendi aralarında meydana gelebilecek bilgi aktarımı noktasında iletişimi sağlama ve iletim kabiliyetini gösteren bir analiz yöntemidir. 4QY3 metalo-enziminin hem Apo-CA II hem 3G1-CA II yapıları için CP analizi sonuçları sırasıyla Şekil 4.15 (a) ve Şekil 4.15 (b)'de görüldüğü gibidir. Her iki yapı için grafikler incelendiğinde genel olarak amino asitlere ait CP değerlerinin sıfıra (0) yakın değerler aldığı ve bu bağlamda iletişimin yüksek olduğu söylenebilir. 4QY3'e ligand bağlanmasıyla bazı amino asitlerde CP değerlerinde düşüş gözlemlenirken bazılarında bu değerlerde artışlar görülmektedir. CP analiz verilerine göre alosterik etki gösterdiği düşünülen ligandın etkisiyle bilgi aktarımında değişimlerin olduğu söylenebilir. İki grafik karşılaştırıldığında 155-157 nolu amino asitler ile 112-114 nolu amino asitlerin diğer amino asitlerle olan CP değerleri karşılaştırıldığında CP değerlerinde yükselişler meydana geldiği görülmektedir. İletişim eğilimini daha iyi anlayabilmek için ligandlı ve ligandsız yapılara ait CP değerleri arasındaki farklar Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Şekil 4.16'da ligandın yapıya bağlanmasıyla kırmızı ile belirtilen bölgelerde CP değerlerinde artış, lacivert ile belirtilen bölgelerde ise CP değerlerinde düşüş meydana geldiği anlaşılmaktadır. CP değerleri analizine göre 3G1'in bağlanmasına tepki olarak 112-114 ve 155-157 nolu amino asitlerin enzimin geri kalan amino asitleri ile iletişimlerinde azalma olduğu yorumu yapılabilir.



Şekil 4.14. 4QY3 a) Apo-CA II; b) 3G1-CA II için CP değerleri



Şekil 4.15. 4QY3'ün 3G1-CA II ile Apo-CA II arasındaki CP değerlerinde oluşan fark

4.13. 4QY3 için Amino Asit Etkileşim Ağı

3G1 bağlandıktan sonra CA II'nin amino asitleri arasındaki etkileşimin ne ölçüde değiştiğini anlayabilmek için, ΔBC ve ΔL analizleri yapılmıştır. Yapılan bu analizlerde, ligandlı ve ligandsız sistemler için amino asitlerin sadece beta karbonları ($C\beta$) temel alınmıştır. Her RIN, Apo-CA II ve 3G1-CA II simülasyonlarından seçilen 3500 frame kullanılarak hesaplanmıştır. 3G1'in CA II'ye bağlanmasıyla amino asitler arası var olan iletişimde muhtemel değişiklikleri görebilmek için, ΔBC ve ΔL değerleri hesaplanmıştır. Önemli değişiklik gösteren amino asitler Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. 4QY3 için Artan Azalan ΔBC ve ΔL değerleri

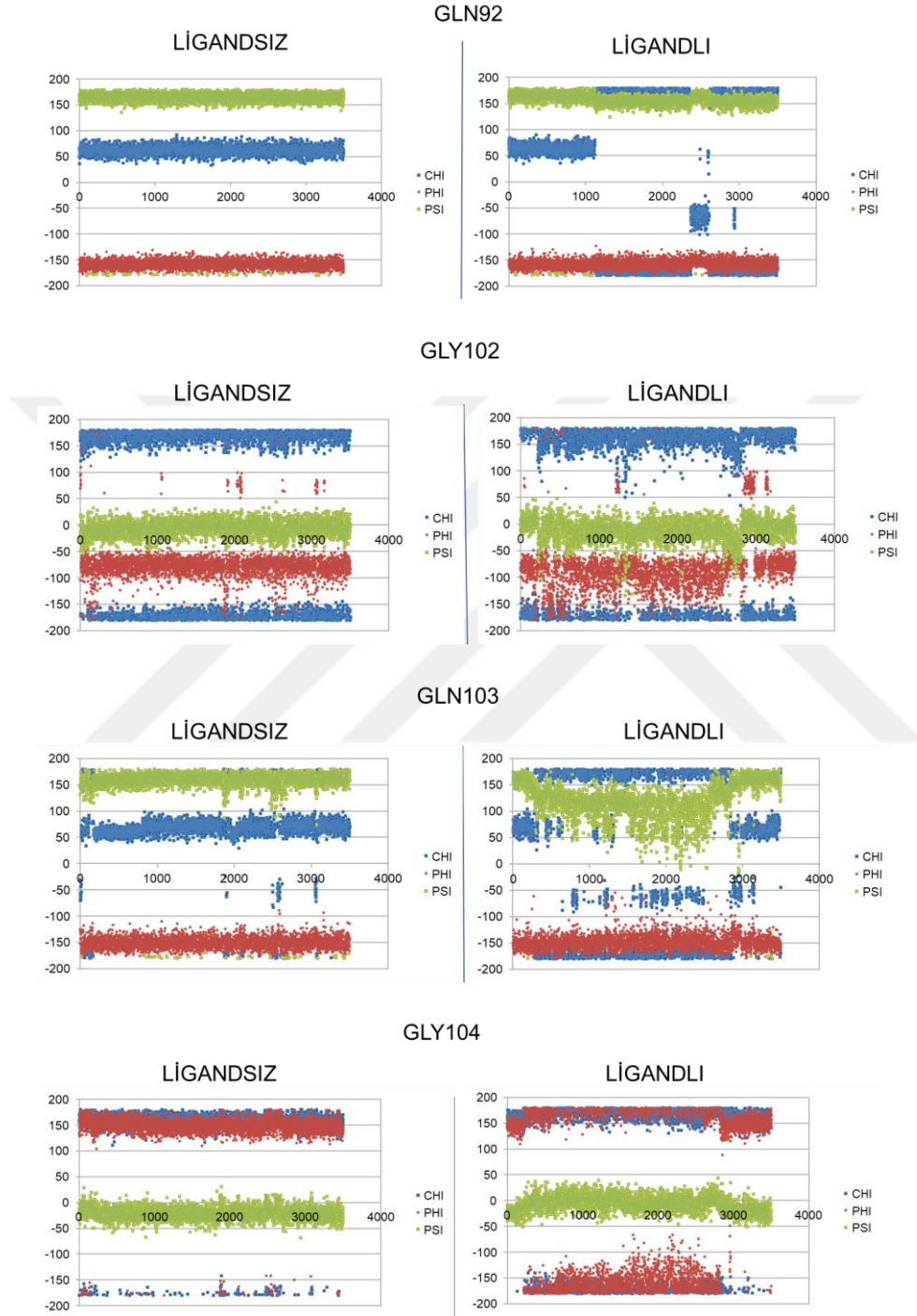
LİGAND BAĞLANDIKTAN SONRA ΔBC DEĞERİ EN ÇOK ARTAN AMİNO ASİTLER	LİGAND BAĞLANDIKTAN SONRA ΔBC DEĞERİ EN ÇOK AZALAN AMİNO ASİTLER	LİGAND BAĞLANDIKTAN SONRA ΔL DEĞERİ EN ÇOK ARTAN AMİNO ASİTLER	LİGAND BAĞLANDIKTAN SONRA ΔL DEĞERİ EN ÇOK AZALAN AMİNO ASİTLER
SER2 SER56 ALA65 PHE66 ASN67 PHE95 GLY98 GLU106 VAL109 LYS112 TYR114 ALA115 LEU118 LEU147 PRO215	GLY6 ASP32 HIS64 HIS94 TRP97 GLY104 THR108 LYS113 GLU117 HIS119 VAL210 SER217 LYS225 ASN243 ALA247	MET1 HIS3 ASN11 ASP32 ASP34 HIS36 THR37 GLN103 GLY104 THR108 LYS111 LYS113 GLY156 THR177 PRO247	SER2 LYS24 GLY25 ARG27 PHE66 VAL109 ASP110 SER152 GLN158 LYS159 VAL160 LEU163 ASP164 GLY170 LEU228

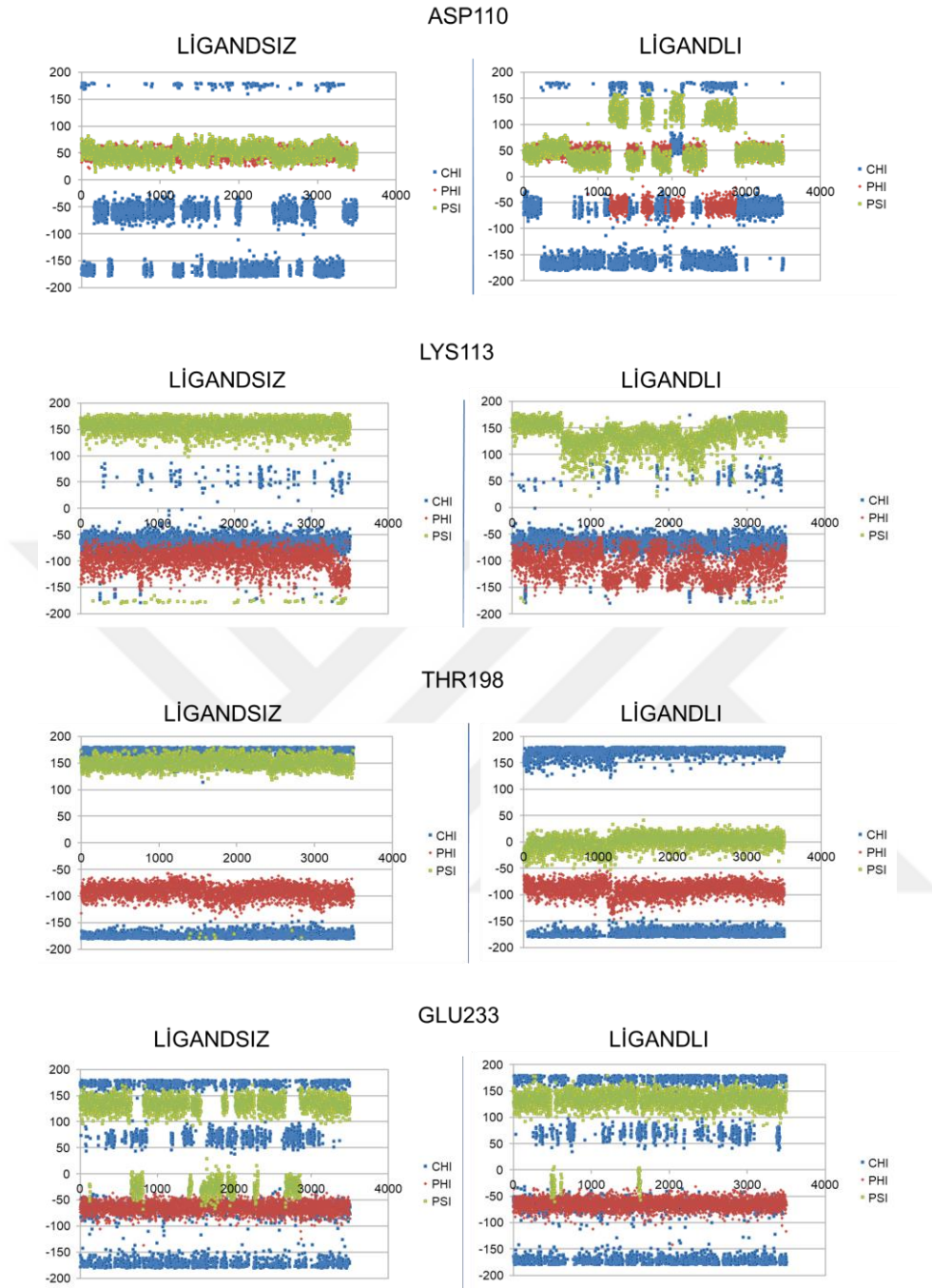
Çizelge 4.6 incelendiğinde, ilk sütunda ligand bağlandıktan sonra ΔBC değerlerinde artış olan amino asitler yer almaktadır. İlk sütundaki amino asitlerden ASN67, PHE95, GLY98, GLU106, LYS112, TYR114, ALA115 ve LEU118 aktif bölgede yer almaktadır. İkinci sütunda 3G1'in bağlanmasıyla ΔBC değerlerinde azalma meydana gelen amino asitlerden özellikle aktif bölgeye hidrojen pompalayan HIS64 amino asidi dikkat çekmektedir. Çizelge 4.6'nın üçüncü sütununda 3G1'in bağlanmasıyla ΔL değerlerinde artış meydana gelen amino asitler yer almaktadır. Bu amino asitlerden GLN103, GLY104, THR108, LYS111 ve LYS113 aktif bölgede olup, ASN11 ise 3G1 ile hidrojen bağı yapan amino asitlerden biridir. 3G1'in bağlanmasıyla hem ligandla hidrojen bağı yapan ASN11'in hem de aktif bölgede bulunan amino asitlerin ΔL değerlerindeki artış, ligandın bağlandığı bölgenin alosterik bölge olabileceği fikrini desteklemektedir.

4.14. 4QY3 için Dihedral Açı Analizi

4QY3 için yapılan bir diğer analiz ise 3G1'in bağlanmasıyla amino asitlerin dihedral açılarında meydana gelebilecek değişimlerin tespit edilmesidir. Şekil 4.17'de aktif bölgede bulunan amino asitlerin dihedral açılarındaki değişimler gösterilmiştir. Bu amino asitler; GLN92, GLY102, GLN103, GLN104, ASP110, LYS113, THR198 ve GLU233'tür. Belirtilen amino asitlerin dihedral açıları incelendiğinde 3G1 ligandının bağlanmasıyla GLN92 ve GLN103'ün χ_1 açıları; GLN103, ASP110, LYS113, THR198 ve GLU233'ün Ψ açıları; GLY102, GLY104, ASP110 ve LYS113'ün Φ açıları belirgin bir değişim gözlenmektedir. GLN92 ve GLN103'de Apo-CA II durumunda χ_1 açısı 60 derece iken 3G1-CA II durumunda simülasyonun ilk çeyreğinden sonra 180 derece olmuştur. Ψ açılarındaki değişim gözlenen amino asitler incelendiğinde GLN103'te ligandsız durumda 180 derece iken, ligand bağlandıktan sonra 3500 framelik zaman diliminde genel olarak 150 ile 50 derece arasında değişimler gözlemlenmiştir. Aynı zamanda THR198'de ligandsız durumda 180 derece olan Ψ açısı, ligandlı durumda 0 dereceye geldiği görülmektedir. GLU233 amino asidine bakıldığında ligandsız durumdayken sürekli değişen Ψ açısı, ligand bağlandıktan sonra 140 derecede stabil duruma geldiği gözlenmiştir. Dihedral açılardan bir diğeri olan Φ açısında değişim gözlenen amino asitler incelendiğinde LYS113 ligandsız durumda 90 derece dolaylarında stabil seyrederken, ligand bağlandıktan sonra 90 ile 150 dereceler arasında sürekli

değiştği gözlenmiştir. Şekilde 4.17’de dihedral açıları verilen amino asitler aktif bölgede yer alıp, 4QY3 enziminin aktif bölgesinden 15 Å uzaklıktaki bir bölgeye hidrojen bağlarıyla bağlanan 3G1’in alosterik etki gösterdiği yorumu yapılabilir.



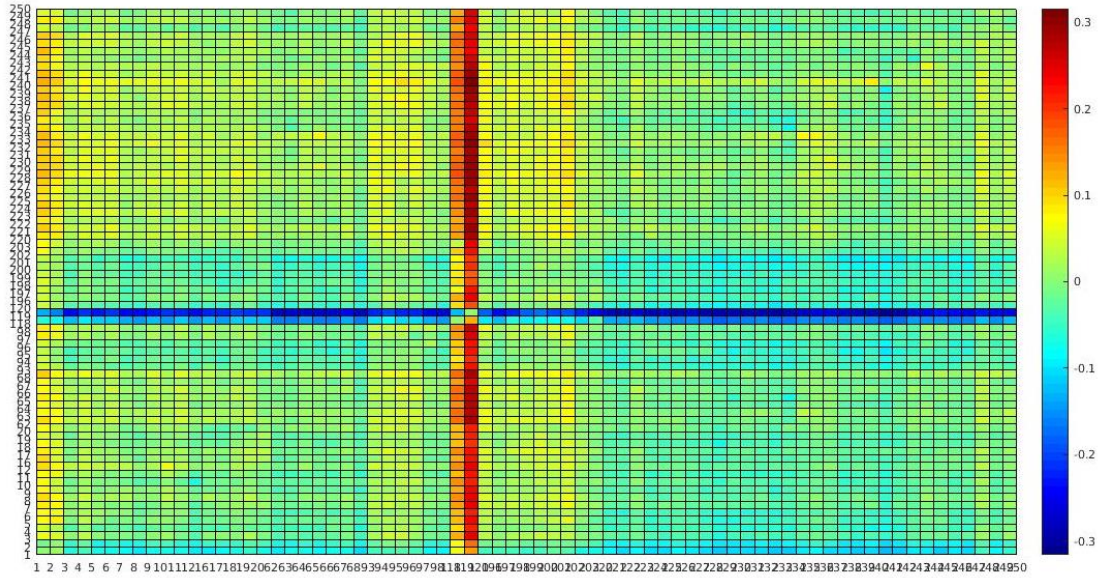


Şekil 4.16. 4QY3'ün bazı amino asitleri için dihedral açı değerleri

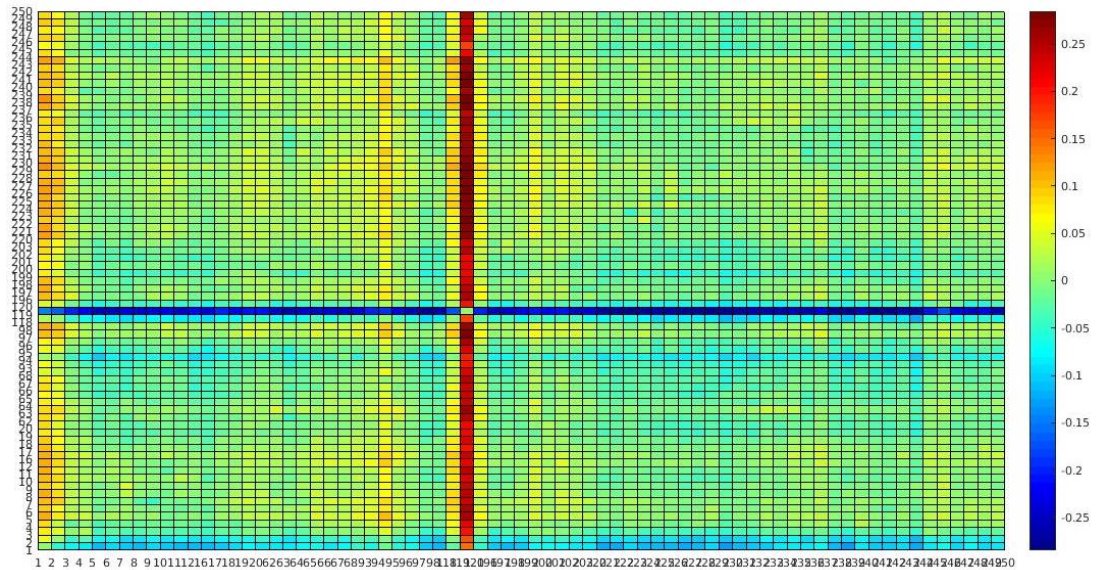
4.15. 4QY3 için Transfer Entropi

Bu çalışmada 4QY3 kodlu metalo-enzimi için yapılan bir diğer analiz ise TE'dir. Bu analizde ilgili enzimin amino asitleri arasında bilgi akışının olup olmadığı ile ilgili tespitler yapılabilmektedir. Şekil 4.18 ve 4.19 sırasıyla 4QY3'ün Apo-CA II, 3G1-CA II kompleksi durumlarındaki TE değerlerini belirtirken, Şekil 4.20 ise ligandlı ile ligandsız durum arasındaki TE farkını ifade etmektedir. Grafiklerdeki TE değerleri $D_{ij}-D_{ji}$ verileri

olup, i . amino asitten j . amino aside olan TE değerlerinden j . amino asitten i . amino asidine ait olan TE değerlerinin çıkarılmış halidir. Buradaki amaç; TE'nin tek yönlü olduğunu gösterebilmektir. Şekil 4.18 incelendiğinde 4QY3'ün ligandsız durumunda LYS119 amino asidi genel olarak yapıdaki diğer amino asitlere kıyasla bilgi akışı en düşük olandır. Şekil 4.19 incelendiğinde aynı amino asit, 3G1'in bağlanmasıyla TE değerlerinde kayda değer bir fark gözlenmemiştir. Şekil 4.18 ve 4.19 kıyaslandığında, LYS119 amino asidi genel itibarıyla diğer amino asitleri entropi kaynağı değil, entropi soğurucusu olduğu sonucu çıkarılabilir. Aynı değerlendirmeler LEU118 amino asidi için incelendiğinde ligandsız durumda TE değerleri düşükken 3G1 bağlandıktan sonra TE değerlerinde artışlar meydana gelmiştir. Ligandsız yapıda LEU118 amino asidi soğurucu iken, 3G1'in bağlanmasıyla kaynak olma durumuna geçmiştir.

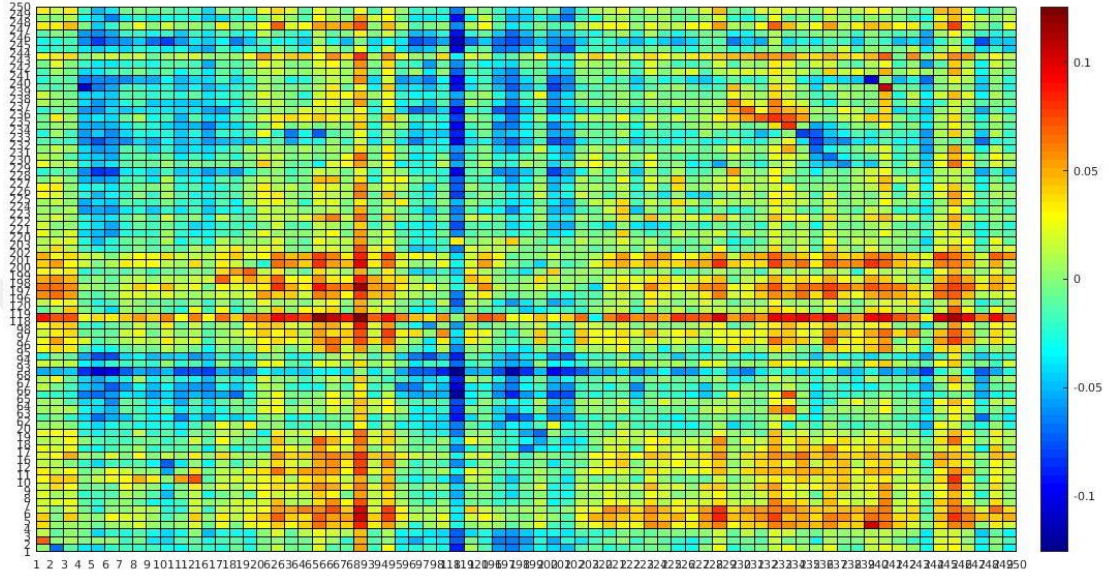


Şekil 4.17. 4QY3 Apo-CA II için TE değerleri



Şekil 4.18. 4QY3 3G1-CA II için TE değerleri

4QY3'ün tüm amino asitlerinin ligandlı ve ligandsız durumdaki TE farkları Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Buradaki TE değerleri, ligandlı durumdaki değerlerden ligandsız durumdaki değerlerin çıkarılmasıyla elde edilen değerlerdir. Şekil 4.20 incelendiğinde, seçilen amino asitler içinde LEU118 ile LEU203 arasındaki amino asitler en çok kaynak olma özelliği gösterirken, LEU60 ile PHE95 ve THR200 ile PRO250 arasındakiler ise en çok soğurucu amino asitler olarak görülmektedir.



Şekil 4.19. 4QY3 3G1-CA II ile Apo-CA II için TE fark değerleri

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında MPro ve CA II enzimlerinin alosterik etki ile inhibisyonu araştırıldı. Mevcut ilaçların yeniden konumlandırılması (drug repurposing) stratejisi izlenerek DrugBank’da bulunan üç bine yakın FDA onaylı ilaç MPro içinde bir bölge seçmeksizin moleküler docking yöntemi ile tarandı. Taranan ilaçlar arasından bilinen ortohestik aktif bölge dışında bir bölgeye yerleşen ve en yüksek bağlanma afinitesi gösteren DHE için ileri incelemeler gerçekleştirildi. CA II enziminin bilinen inhibitörleri, Zn atomunun bulunduğu aktif bölge içerisine yerleşip substrat’ın yerini işgal ederek ya da aktif bölgenin başına yerleşip aktif bölge içerisine giren substrat ve su trafiğini engelleyerek inhibisyon gerçekleştirdiği bilinmektedir. Ancak 2014 yılında yapılan bir çalışmada 2-[(S)-benzylsulfanyl]benzoic acid (3G1) ligandının aktif bölge içerisinden Zn atomu ile direkt etkileşim yapmadan aktif bölge dışında bir noktaya bağlanarak inhibisyon gerçekleştirdiği literatürde gösterildi (D’Ambrosio 2014). Bu çalışmada CA II’nin ortohestik aktif bölgesi dışına bağlanarak inhibisyon gerçekleştiren ilk inhibitörün bu işlevi nasıl gerçekleştirdiği araştırıldı. Moleküler modelleme yöntemlerinde farklı inhibisyon mekanizmalarını denemek, potansiyeli yüksek ilaç tasarımlarını oluşturma noktasında önemli bir teknik olup ilaç endüstrisinde ve akademide yaygın olarak kullanılmaktadır. Ligand alosterik bölgeye bağlandıktan sonra dolaylı yollarla aktif bölgedeki kimyasal tepkimeyi etkileyebiliyorsa, bu ligand alosterik etki ile inhibe etme kabiliyetine sahip olmaktadır. Enzim sistemlerinin ligand bağlı kompleksleri ve Apo durumu yapıları MDS yöntemi ile simüle edilerek yörünge dosyaları çeşitli analiz teknikleri ile karşılaştırılarak alosterik etkinin nasıl bir yolla gerçekleştiği anlaşılabilmektedir. Bu tez çalışmasına konu olan iki enzim yapısından biri 6M03 erişim kodlu MPro ve bir diğeri ise 4QY3 erişim kodlu CA II metalo-enzimidir. MPro enzimi için inhibe edilmenin ölçüsü literatür (Świderek ve Moliner 2020) bilgileri ışığında HIS41 ile CYS145 arasındaki mesafenin artması olarak belirlendi. Enzimin aktif bölgesinde meydana gelen bu durumun inhibisyonu için enzime aktif bölgeye değil de belirli bir mesafede bulunan “alosterik bölge” olarak tanımlanan bir bölgeye DHE ligandının o bölgedeki amino asitlere hidrojen bağları yaparak konumlanması akabinde aktif bölgede var olan işleyişi etkileyip etkilemediği araştırıldı. Aynı şekilde 4QY3 erişim kodlu CA II metalo-enzimi için de farklı bir ligand olan 3G1 kullanılarak alosterik etki ile 4QY3’ün aktif bölgesinde bulunan amino asitlerin hareketlerini etkileyip etkilemediği araştırıldı.

Simülasyonlar sonucunda her iki enzimin tüm amino asitleri için çeşitli analizler yapıldı. Bu analizler hem ligandsız hem de ligandlı simülasyon çıktılarına uygulandı. Her bir enzim için yapılan analizler; RMSD, RMSF, Amino asitler Arası Mesafe, DCC, CP, RIN ve TE olarak sıralanmaktadır. Bahsi geçen bu analizlerden alosterik etkinin nasıl meydana geldiğini açıklayan bulgulara ulaşıldı.

MPro için RMSD analizine bakıldığında; yapıya ligand bağlandıktan sonra 5000 framelik bir zaman diliminde yapının konumsal olarak ortalama standart sapmasında büyük değişim meydana geldiği gözlenmiştir. Yapılan RMSF analizinde amino asitler bazında hem ligandsız hem ligandlı yapı incelendiğinde ligandın bağlanmasıyla amino asitlerin çoğunun dalgalanmalarında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Genel anlamda RMSF değerlerindeki bu azalış yapının genelinde var olup sadece ligandın bağlandığı alosterik bölgeyle sınırlı kalmayıp aktif bölgedeki amino asitlerde de gözlenmiştir. MPro için analiz edilen diğer bir unsur ise HIS41 ile CYS145 amino asitleri arasındaki mesafenin DHE’nin bağlanmasıyla değişip değişmediğini görebilmektir. Bu

analiz sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde yaklaşık 10000 framelik sürede bahsi geçen iki amino asit arasındaki mesafenin arttığı gözlenmiştir. Ligandın ilgili amino asitlerden uzak bir konumda olduğu halde bir takım sinyal aktarımı vasıtasıyla katalitik bölgeyi oluşturan HIS41 ve CYS145 arasındaki mesafeyi etkilediği gözlenmektedir. HIS41 ile CYS145 arasında gerçekleşen uzaklık değişimi; DHE ligandının alosterik bölgede var olan amino asitlerle hidrojen bağı yapmasıyla meydana gelmiştir. DHE'nin alosterik bölgeye bağlanması, CYS145 amino asidinin dihedral açılarında bir değişikliğe sebep olduğu ve bundan dolayı iki amino asit arasındaki mesafede bir değişiklik meydana getirdiği gözlenmiştir. MPro enzimi için yapılan bir diğer analiz ise DCC'dir. Yapıya ait DCC haritaları incelendiğinde, Alan-I ve Alan-II arasındaki genel alanlar arası korelasyonların, aktif durumda ligandlı ve ligandsız yapının aktif olmayan durumuna kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Aktif durumda, DHE ligandını çevreleyen amino asitlerle etkileşimleri göz önüne alındığında, bu etkileşimlerin alan I ve alan II arasındaki sinyal iletimini arttırmaktadır. Ligandın bağlanmasıyla Alan-I ve Alan-II arasındaki artan korelasyon ve katalitik bölgenin yapısındaki değişiklik, ligandın bağlandığı bölgenin bir alosterik bölge olduğunu desteklemektedir. MPro için yapılan diğer bir analiz ise CP'dir. CP değerleri incelendiğinde Alan-III amino asitleri ile yapının diğer alanları arasında bulunan amino asitler arasındaki CP değerlerinin, ligand bağlanmasıyla CP değerlerinde yükseliş meydana geldiğini göstermektedir. Fakat seçilen bazı amino asitler arasında bulunan GLY278, en büyük CP değerlerine sahiptir, ancak CP değerleri ligand bağlanmasıyla önemli ölçüde azalmıştır. Apo-MPro ve DHE-MPro durumlarında CP değerleri genel olarak karşılaştırıldığında, DHE-MPro durumundaki amino asit çiftleri arasındaki CP değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Düşük CP değerlerine sahip olan durumdaki amino asitler, iletişim eğilimi yüksek olanlar olup bu durumun sonucunda ligandın bağlandığı bölgenin alosterik bir bölge olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir. MPro için RIN analizine bakıldığında Alan-II'nin bir tarafındaki amino asitlerin uzamsal olarak pozitif ΔBC değerlerine, ancak diğer taraftakilerin negatif ΔBC değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Alan-I ve Alan-III arasında uzamsal olarak köprü gibi duran (linker) amino asitlerin çoğu, pozitif ΔBC değerlerine sahiptir ve bu amino asitlerin, Alan-I ve Alan-III bölgeleri arasında bir sinyal yolu olarak işlev gördüğü anlaşılmaktadır. Bu sinyal iletim yolu, önerilen alosterik bölgenin Alan-III'te yer aldığı, buna karşın katalitik bölgenin 40 Å uzaklıkta olduğu gerçeği göz önüne alındığında, dimer arayüz bölgesi ile katalitik bölge arasında bir alosterik iletişimin var olabileceğini desteklemektedir. Pozitif ΔL değerine sahip amino asitler genellikle Alan-I'de bulunmaktadır. Köprü (linker) amino asitlerin (ASN180'den THR198'e kadar) ΔL değerleri de pozitifdir ve ligand bağlanmasıyla erişilebilirlikleri artmış durumdadır. Bu nedenle önerilen alosterik bölge ve katalitik bölge arasındaki amino asit iletişiminde rol oynadıkları anlaşılmaktadır.

MPro enzimi için yapılan bir diğer analiz TE'dir. Enzime ligand bağlandıktan sonra çoğunlukla, alosterik bölge amino asitlerinden katalitik bölge amino asitlerine TE değerlerinin şiddetinde artış gözlenmiştir. Özellikle, katalitik bölge amino asitleri olan HIS41 ve CYS145 söz konusu olduğunda, THR280'den HIS41'e ve THR280'den CYS145'e transfer entropi değerinin ($D_{j \rightarrow i}$) şiddetleri büyük ölçüde artış göstermiştir. Apo-Mpro ve DHE-Mpro kompleksi için TE sonuçları, önerilen alosterik bölgenin bir alosterik bölge olduğu fikrini desteklemektedir. Çünkü GLY278 ve THR280'in HIS41 ve CYS145 katalitik bölge amino asitlerine bilgi akışı sağladığı görülmektedir. Mpro katalitik işleviyle ilgili olan CYS145'in χ_1 açısındaki bir değişiklik, bilgi akışı

miktarındaki bu büyük artıştan kaynaklanabilir. Moleküler bir yapının bir bölgesinde ligand bağlanması gibi yapısal bozulmalar, popülasyonun yeniden dağılımına yol açabilmektedir. Enzimler alosterik olmayan bir durum sergileseler bile, uygun ligandlar yapıları birkaç değişiklik ile dahil edilirse, alosterik özellik gösterebilirler (Gunasekaran, 2004). Çalışma sonuçları incelendiğinde DHE bağlanmasına yanıt olarak ilgili yapıda önemli bir konformasyonel değişiklik olmadığı halde, bu bağlanmanın sinyal iletimi yoluyla katalitik merkez amino asitlerinden CYS145'in χ_1 açısı üzerinde bir değişime neden olduğu gözlemlendi. Bu değişiklik alosterik etki ile MPro'nun kataliz işlevinin inhibe edebileceğine dair hesaplanmış bulgular olarak değerlendirilebilir.

Bu tez çalışmasına konu olan bir diğer enzim ise 4QY3 erişim kodlu CA II metaloenzimidir. Bu enzime 3G1 ligandı aktif bölgenin dışında bir bölgeye bağlandığı halde alosterik olarak inhibe ettiği deneysel olarak gösterildi (D'Ambrosio, 2014). Bu enzim için 3G1 ile yaptığı kompleks için yapılan analizlerde RMSD sonuçlarına bakıldığında 200 ns'lik MDS'nun son çeyreğinde RMSD değerlerinde bariz farklılaşmalar olduğu gözlemlendi. Bunun nedeni araştırıldığında simülasyonun son çeyreklik diliminde ligandın bağlandığı alandan ayrıldığı tespit edildi. Bundan dolayı tüm analizler yörünge dosyalarının ilk üç çeyreği üzerinden (150 ns) yapıldı. RMSF sonuçlarına bakıldığında 3G1 ligandının varlığında 131 amino asidin salınımlarında artış olduğu görülmektedir. Özellikle alosterik ve aktif bölge civarındaki çoğu amino asitler için ligandlı durumdaki RMSF değerleri ligandsız duruma kıyasla yükselmiştir. RMSF değerleri incelendiğinde en yüksek farkı gösteren ilk on amino asit sırasıyla; LYS111, LYS113, LYS112, MET1, SER2, THR108, GLN103, LEU100, PRO237 ve GLY102'dir. Bu amino asitler aktif bölge ile 3G1 ligandının bağlı olduğu alosterik olarak düşünülen bölgelerde bulunmaktadır. Aktif bölgede yer alan amino asitlere ait RMSF değerlerinin ligand bağlandıktan sonra artması aktif bölgeye giriş çıkış yapan substrat ve su moleküllerinin trafiğini bozması olasılık dahilinde olup bu yolla katalitik reaksiyon hızı azalıyor olabilir.

CA II için DCC analizine bakıldığında, CA II'ye bağlanan ligandın etkisiyle genel olarak pozitif korelasyonlarda artış meydana gelmiştir. Özellikle ligandsız yapıda pozitif korelasyonlu kısımlarda ligand bağlandıktan sonra korelasyon değerlerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bir analiz olan CP incelendiğinde hem ligandsız hem ligandlı durumda yapının büyük çoğunluğunda CP değerleri düşük olup birbirine yakın değerler aldığı gözlemlenmiştir. 155-157 nolu amino asitler ile 112-114 nolu amino asitlerin diğer amino asitlerle olan CP değerleri karşılaştırıldığında, CP değerlerinde yükselişler meydana geldiği görülmektedir. CP değerleri analizine göre 3G1'in bağlanmasına tepki olarak 112-114 ve 155-157 nolu amino asitlerin enzimin geri kalan amino asitleri ile CP değerlerinde azalma olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum ligand bağlanmasına tepki olarak CA II içerisinde sinyal aktarımı düzeyinde artış olduğu şeklinde yorumlanabilir.

CA II'ye 3G1 bağlandıktan sonra amino asitler arasındaki sinyal yayılımlarındaki değişikliği araştırmak için, ΔBC ve ΔL analizleri de yapıldı. Yapılan analizde, her RIN, Apo-CA II ve 3G1-CA II sistemlerinden seçilen 3500 frame kullanılarak hesaplandı. Önemli değişiklik gösteren amino asitler, 3G1 ligandının bağlanmasıyla ΔBC değerleri artan amino asitlerden ASN67, PHE95, GLY98, GLU106, LYS112, TYR114, ALA115 ve LEU118 aktif bölgede yer almaktadır. Ayrıca 3G1'in bağlanmasıyla ΔBC değerlerinde azalma meydana gelen aminoasitlerden özellikle aktif bölgeye hidrojen pompalayan HIS64 amino asidi dikkat çekmektedir. Bu durum HIS64'ün erişilebilirliğinin azaldığına

işaret eder. Katalitik işlevde rol alan bu amino asidin fonksiyonunda bir bozulma olarak yorumlanabilir. Aynı zamanda 3G1'in bağlanmasıyla ΔL değerlerinde artış meydana gelen amino asitlerden GLN103, GLY104, THR108, LYS111 ve LYS113 aktif bölgede olup ASN11 3G1 ile hidrojen bağı yapan bir amino asittir. 3G1'in bağlanmasıyla ASN11'in ΔL değerindeki artışıyla aktif bölgede bulunan amino asitlerin ΔL değerlerinde artış meydana geldiği gözlenmiş olup, bu durum alosterik işlevin nasıl gerçekleştiğine dair kanıt olarak yorumlanabilir.

4QY3 için 3G1'in bağlandığı bölge ile aktif bölgede bulunan amino asitlere ait dihedral açı analizi yapıldığında GLN92, GLY102, GLN103, GLN104, ASP110, LYS113, THR198 ve GLU233'ün dihedral açıları değişimler meydana geldiği gözlenmiştir. Belirtilen amino asitlerin dihedral açıları incelendiğinde 3G1 ligandı bağlanmasıyla GLN92 ve GLN103'ün χ_1 açıları; GLN103, ASP110, LYS113, THR198 ve GLU233 amino asitlerin Ψ açıları; GLY102, GLY104, ASP110 ve LYS113'ün Φ açıları belirgin bir değişim gözlenmektedir. χ_1 açıları değişim gözlenen GLN92 ve GLN103'de Apo-CA II durumunda 60 derece iken 3G1-CA II durumunda simülasyonun ilk çeyreğinden sonra 180 derece olmuştur. Ψ açıları değişim gözlenen amino asitler incelendiğinde GLN103'te ligandsız durumda 180 derece iken ligand bağlandıktan sonra 3500 framelik zaman diliminde 150 ile 50 derece arasında değişimler gözlenmiştir. THR198'de ligandsız durumda 180 derece olan Ψ açısı 3G1'in etkisiyle 0 derece konumuna geldiği gözlenmiştir. GLU233 amino asidine bakıldığında ligandsız durumdayken sürekli değişen Ψ açısı ligand bağlandıktan sonra 140 derecede daha stabil duruma geldiği gözlenmiştir. Dihedral açılardan bir diğeri olan Φ açısında değişim gözlenen amino asitler incelendiğinde LYS113 ligandsız durumda 90 derece dolaylarında stabil seyrederken ligand bağlandıktan sonra 90 ile 150 dereceler arasında sürekli değiştiği gözlenmiştir. Dihedral açıları değişim gözlenen amino asitler aktif bölgede olup hidrojen bağlarıyla bağlanan 3G1'in CA II enzimine dahil olmasıyla

CA II için hem 3G1'in bağlandığı bölgeden hem de aktif bölgeden toplamda 72 amino asit seçilerek TE analizi yapıldı. Analizden elde edilen grafikler incelendiğinde LEU118 amino asidinin ligand bağlanmadan önce diğer amino asitlerden etkilendiği fakat amino asitleri etkilemediği, ligand bağlandıktan sonra LEU118 amino asidinin yapıyı oluşturan diğer amino asitleri etkilediği ve diğer amino asitlerden etkilenmediği anlaşılmaktadır. CA II'ye 3G1'in bağlanmasıyla aktif bölge yakınlarında yer alan LEU118 amino asidinin ligandın bağlandığı yerden belirli bir mesafede oluşu ve alosterik olarak da etkilendiği gözlenmiştir. Aynı zamanda 3G1-CA II ve Apo-CA II sistemlerinin TE farklarına bakıldığında seçilen amino asitler içinde LEU118 ile LEU203 arasındaki amino asitler en çok kaynak olma özelliği gösterirken, LEU60 ile PHE95 ve THR200 ile PRO250 arasındakiler ise en çok soğurucu amino asitler olarak görülmektedir. Ligand varlığının etkisiyle sistemlerin aktif bölgesinde bulunan aminoasitlerin kaynak ya da soğurucu olmaları, ligandın bağlandığı bölgenin alosterik olduğunu vurgulayan bir argümandır.

Bu tez çalışmasında 6M03 ve 4QY3 erişim kodlu iki farklı enzim yapısı MDS yöntemleriyle araştırılmış olup 6M03'e DHE, 4QY3'e 3G1 ligandlarının bağlanmasıyla alosterik olarak çalışma mekanizmalarına etki edip etmedikleri araştırıldı. Yapılan analizler sonucunda aktif bölge dışında alosterik bölge olarak isimlendirilen bir bölgeye bağlanarak enzimlerin tüm bölgelerinde etki oluşturdıkları gözlenmiştir. Yapılan RIN

analizlerinde tüm yapılar içinde yapıların her bir bölgesine bilgi akışında daha etkili olabilecek amino asitler gözlenmiştir. Her ne kadar diğer inhibisyon mekanizmalarında aktif bölgeye doğrudan etki yaparak sistemler inhibe edilmeye çalışılsa da alosterik etki sayesinde de bahsi geçen inhibisyon durumlarının sağlanabildiği gözlenmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Abdel-Magid, A.F. 2015. Allosteric modulators: an emerging concept in drug discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6 (2): 104–7.
- Amanat, F. and Krammer, F. 2020. Sars-cov-2 vaccines. *Status report, Immunity* 52 583-589.
- Alp, C., Özsoy, Ş., Alp, N.A., Erdem, D., Gültekin, M.S., Küfrevioğlu, Ö.İ., Şentürk, M. and Supuran, C.T. 2012. Sulfapyridine-like benzenesulfonamide derivatives as inhibitors of carbonic anhydrase isoenzymes I, II and VI. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(6): 818–824.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T. and Simone, G. 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *Chemical Reviews*, 112(8): 4421–4468.
- Amusengeri, A. and Bishop, Ö.T. 2019. Discorhabdin N, a South African natural compound, for hsp72 and hsc70 allosteric modulation: Combined study of molecular modeling and dynamic residue network analysis. *Molecules*, 24 (1) 188.
- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J.R. and Hilgenfeld, R. 2003. Coronavirus main proteinase (3clpro) structure: basis for design of anti-sars drugs. *Science*, 300: 1763-1767.
- Banerjee, R., Perera, L. and Tillekeratne, L.V. 2021. Potential sars-cov-2 main protease inhibitors. *Drug Discovery Today*, 26: 804-816.
- Brown, D.K., Penkler, D.L., Amamuddy, O.S., Ross, C., Atilgan, A.R., Atilgan, C. and Bishop Ö.T. 2017. MD-TASK: a software 55ort for analyzing molecular 55ort he55 trajectories. *Bioinformatics*, 33: 2768–2771.
- Chan, J.F.W., Kok, K.H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K.W., Yuan, S. and Yuen, K.Y. 2020. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9: 221-236.
- Chennubhotla, C. and Bahar, I. 2007. Signal propagation in proteins and relation to equilibrium fluctuations. *PloS Computational Biology*, 3(9): 1716-26.
- D'Ambrosio, K., Carradori, S., Monti, S.M., Buonanno, M., Secci, D., Vullo, D. Supuran, C.T. and Simone, G.D. 2015. Out of the active site binding pocket for carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical communications*, 51(2): 302-5.
- Dallakyan, S. and Olson, A.J. 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *In Chemical Biology*, 243-250.
- Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., Niu, Y., Lou, Y. and Wang, H. 2020. The sars-cov-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: implications for the design of spike-based vaccine immunogens. *Frontiers In Immunology*, 11: 2593.
- Frenkel, D. and Smit, B. 2002. Understanding molecular simulation: from algorithms to applications. 2nd ed. San Diego: Academic Press.
- Frisch, M.J. at all. 2016. Gaussian 16 Rev. C.01, Wallingford, CT.

- Furnham, N., Holliday, G.L., de Beer, T.A., Jacobsen, J.O., Pearson, W.R. and Thornton, J.M. 2014. The catalytic site atlas 2.0: cataloging catalytic sites and residues identified in enzymes. *Nucleic acids research*, 42(D1), D485-9.
- Golden, J.B. 2003. Prioritizing the human genome: knowledge management for drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev*, 6: 310–316.
- Goyal, B. and Goyal, D. 2020. Targeting the dimerization of the main protease of coronaviruses: a potential broad-spectrum therapeutic strategy. *ACS Combinatorial Science*, 22: 297-305.
- Gunasekaran, K., Ma, B. and Nussinov, R. 2004. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins?. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57: 433–43.
- Guo, Y.R., Cao, Q.D., Hong, Z.S., Tan, Y.Y., Chen, S.D., Jin, H.J., Tan, K.S., Wang, D.Y. and Yan, Y. 2020. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (covid-19) outbreak—an update on the status. *Military Medical Research*, 7: 1-10.
- Gupta, S., Singh, A.K., Kushwaha, P.P., Prajapati, K.S., Shuaib, M., Senapati, S. and Kumar, S. 2021. Identification of potential natural inhibitors of sars-cov2 main protease by molecular docking and simulation studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39: 4334-4345.
- Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B. and Choe, H. 2022. mechanisms of sars-cov-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23: 3-20.
- Jakalian, A., Bush, B.L., Jack, D.B. and Bayly, C.I. 2000. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. am1-bcc model: i. method. *Journal Of Computational Chemistry*, 21: 132-146.
- Hacisuleyman, A. and Erman, B. 2017. Entropy transfer between residue pairs and allostery in proteins: quantifying allosteric communication in ubiquitin. *PLoS Computational Biology*, 13(1): e1005319.
- Hacisuleyman, A. and Erman, B. 2017. Causality, transfer entropy, and allosteric communication landscapes in proteins with harmonic interactions. *Proteins*, 85: 1056–1064
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. and Pöhlmann, S. 2020. A multibasic cleavage site in the spike protein of sars-cov-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular Cell*, 78: 779-784.
- Holde, K. and Zlatanova, J. 1995. Chromatin higher order structure: chasing a mirage?. *Journal of Biological Chemistry*, 270(15): 8373-8376.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. and Shi, Z.L. 2021. Characteristics of sars-cov-2 and covid-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19: 141-154.
- Kamberaj, H. and Vaar, E. 2009. Extracting the causality of correlated motions from molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 97(6):1747-1755.
- Krauss, G. 2003. “The regulations of enzyme activity”. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, Weinheim: Wiley-VCH. 89–114.
- Kumar, H. and Maiti, P.K. 2011. Introduction to molecular dynamics simulation.

- Computational Statistical Physics, 1st ed. Hindustan Book Agency, New Delhi.
- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V.K. and Saxena, S.K. 2020. Morphology, genome organization, replication, and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. Springer, Singapore, pp. 23-31.
- Landry, Y. and Gies, J.P. 2008. Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 22: 1–18.
- Lee, H.J., Shieh, C.K., Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., La Monica, N. Tuler, J., Bagdzhadzhyan, A. and Lai, M.M. 1991. The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and rna polymerase. *Virology*, 180: 567-582.
- Liang, J., Karagiannis, C., Pitsillou, E., Darmawan, K.K., Ng, K., Hung, A. and Karagiannis, T.C. 2020. Site mapping and small molecule blind docking reveal a possible target site on the sars-cov-2 main protease dimer interface. *Computational Biology and Chemistry*, 89: 107372.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipurksy, S.L. and Darnell, J. 2004. *Molecular Cell Biology*. New York.
- Lv, Z., Cano, K.E., Jia, L., Drag, M., Huang, T.T. and Olsen, S.K. 2022. Targeting sars-cov-2 proteases for covid-19 antiviral development. *Frontiers in Chemistry*, 1221.
- Maier, J.A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K.E. and Simmerling, C. 2015. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11: 3696-3713.
- Macip, G., Garcia-Segura, P., Mestres-Truyol, J., Saldivar-Espinoza, B., Ojeda-Montes, M.J., Gimeno, A., Cereto-Massagué, A., Garcia-Vallvé, S. and Pujadas, G. 2022. Haste makes waste: a critical review of docking-based virtual screening in drug repurposing for sars-cov-2 main protease (m-pro) inhibition. *Medicinal Research Reviews*, 42: 744-769.
- Mathews, C. and Holde, K. 1996. *Biochemistry*. The Benjamin-Cummings Publishing Co. California.
- McLeish, T.C., Cann, M.J. and Rodgers, T.L. 2015. Dynamic transmission of protein allostery without structural change: spatial pathways or global modes? *Biophysical Journal*, 109: 1240-1250.
- Morra, G., Verkhivker, G. and Colombo, G. 2009. Modeling signal propagation mechanisms and ligand-based conformational 57ort he57 of the Hsp90 molecular chaperone full-length dimer. *PloS Comput Biol*. 5(3) e1000323.
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. and Olson, A.J. 2009. Autodock4 and autodocktools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30: 2785-2791.
- Nebiu, D. and Kamberaj, H. 2020. Symbolic information flow measurement (sifm): a software for measurement of information flow using symbolic analysis. *SoftwareX*. 11.

- Nussinov, R. 2016. Introduction to protein ensembles and allostery. *Chemical Reviews*, 116 (11) 6263-6266.
- Penkler, D.L., and Tastan Bishop, Ö. 2019. Modulation of human Hsp90 α conformational dynamics by allosteric ligand interaction at the C-terminal domain. *Scientific reports*, 9(1): 1-17.
- Roe, D.R. and Cheatham III, T. E. 2013. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9: 3084-3095.
- Salomon-Ferrer, R., Case, D.A. and Walker, R.C. 2013. An overview of the amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3: 198-210.
- Schlick, T. 2010. Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide. Springer: 2, New York.
- Schomburg, I. at all. 2013. "Brenda in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in brenda". *Nucleic Acids Research*, 41: D764–72.
- Shcherbinin, D. and Veselovsky, A. 2019. Analysis of protein structures using residue interaction networks. In *Structural Bioinformatics: Applications in Preclinical Drug Discovery Process*. Springer, Cham, pp. 55-69.
- Schreiber, T. 2000. Measuring information transfer. *Physical Review Letters*, 85 (2): 461–464.
- Shannon, C.E. 1948. A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27: 3.
- Stryer, L., Berg, J.M. and Tymoczko J.L. 2002. Biochemistry. W.H. Freeman. San Francisco.
- Supuran, C.T. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews*, 168-181.
- Supuran, C.T. 2016. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3): 345-60.
- Suzuki, H. 2015. "Chapter 7: active site structure". how enzymes work: from structure to function. Boca Raton, FL: CRC Press. Pp. 117–140.
- Świderek, K. and Moliner, V. 2020. revealing the molecular mechanisms of proteolysis of sars-cov-2 mpro by qm/mm computational methods. *Chem. Sci*, 11: 10626-10630.
- Ton, A., Gentile, F., Hsing, M., Ban, F. and Cherkasov, A. 2020. Rapid identification of potential inhibitors of sars-cov-2 main protease by deep docking of 1.3 billion compounds, *Mol Inform*, 39 (8): e2000028.
- Ullrich, S. and Nitsche, C. 2020. The Sars-Cov-2 main protease as drug target. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30: 127377.
- Wagner, J.R., Lee C.T., Durrant, J.D., Malmstrom, R.D., Feher, V.A. and Amaro, R.E. 2016. Emerging computational methods for the rational discovery of allosteric

- drugs. *Chem Rev*, 116 (11): 6370-90.
- Winum, J.Y., Montero, J.L., Vullo, D. and Supuran C.T. 2009. Carbonic anhydrase inhibitors: glycosylsulfanilamides act as subnanomolar inhibitors of the human secreted isoform VI. *Chem Biol Drug Des*, 74(6):636-9.
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Guo, A.C., Lo, E.J., Marcu, A., Grant, J.R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C. and Sayeeda, Z. 2018. DrugBank 5.0: a major update to the drugbank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46: D1074-D1082.
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P. Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M. and Li, X. 2020. Analysis of therapeutic targets for sars-cov-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica*, B 10: 766-788.
- Xu, L., Nussinov, R. and Ma, B. 2016. Allosteric stabilization of the amyloid- β peptide hairpin by the fluctuating N-terminal. *Chemical Communication*, 52: 1733-1736.
- Yoon, S., Logsdon, N.J., Sheikh, F., Donnelly, R.P., and Walter, M.R. 2006. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem*, 281(46): 35088-96.
- Zhang, L.Z., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K. and Hilgenfeld, R. 2020. Crystal structure of sars-cov-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 368: 409-412.
- Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y. and Chen, B. 2021. Structure of sars-cov-2 spike protein, *Current Opinion In Virology*, 50: 173-182.
- Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.R., Zhu, Y., Li, B. and Huang, C.L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature*, 579: 270-273.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J. and Gorbalenya, A.E. 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the nidovirales. *Journal of General Virology*, 81: 853-879.
- Anonymous1: <http://ambermd.org/> [Son erişim tarihi: 01.12.2021].
- Anonymous2: <https://www.rcsb.org/> [Son erişim tarihi: 01.01.2021].
- Anonymous3: <https://www.charmm-gui.org/> [Son erişim tarihi: 01.02.2021].
- Anonymous4: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Son erişim tarihi: 01.12.2021].

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Murat YAŞAR

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2015-2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi
2012-2015	Tıp Fakültesi, Sağlık Fiziği Bölümü, Şanlıurfa
Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi
2007-2009	Fen Edebiyat Fakültesi, Fiziği Bölümü, Şanlıurfa
Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi
2001-2006	Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, İzmir

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Öğretim Görevlisi	Harran Üniversitesi
2010-Devam ediyor	Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler Bölümü, Tıbbi Görüntüleme Programı, Şanlıurfa
Müdür Yardımcısı	Harran Üniversitesi
2018- Devam ediyor	Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Development of Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) Models of Aspartyl-Derivatives Based on Eigenvalues (EVA) of Calculated Vibrational Spectra
İhsan Burak CAM, Nuri YORULMAZ, Mehmet Murat YAŞAR, Erol EROĞLU , Yayın Yeri: Food Biophysics , 2019

2- A qsar study on relationship between structure of sulfonamides and their carbonic anhydrase inhibitory activity using the eigenvalue method
Oral OLTULU, Mehmet Murat Yaşar, Erol EROĞLU , yayın yeri: european journal of medicinal chemistry , 2009

3- Mass Density Image Simulation By X Ray Diffraction Enhanced Imaging
YAŞAR Murat, EROĞLU Erol, PALAZ Selami, BABUR Yunus, OLTULU Oral, Yayın Yeri: Balkan Physics Letters , 2007