

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİTROREDÜKTAZLARIN BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

GÜLDEN YETİŞ
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİTROREDÜKTAZLARIN BİYOTEKNOLOJİK
UYGULAMALARI

GÜLDEN YETİŞ
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2017

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION OF
NITROREDUCTASES**

GÜLDEN YETİŞ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2017



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18/01/2017 tarih ve 2017/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/02/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Gülden YETİŞ'in tez çalışması Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

A. Tanrıseven

ÜYE

: Prof. Dr. Ayşe Gül GÜREK

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Prof. Dr. Osman Uğur SEZERMAN

ÜYE

: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

A. Tanrıseven
AGG
MO
OSU
B. Nalbantoğlu

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Nitroredüktazlar nitro grubu taşıyan birçok bileşiğin indirgenmesi reaksiyonunu katalizleyen flavo enzimlerdir. Bu enzim ailesinin kanser terapileri ve biyodegradasyon olmak üzere birden fazla kullanım alanı vardır.

Bu tez çalışmasında iki farklı nitroredüktaz (Ssap-NtrB ve GkNtrA) kullanılarak çeşitli biyoteknolojik uygulamalar çalışıldı. Özellikle bu enzimlerin kanser terapilerinde kullanılma potansiyellerine yönelik *E. coli* NfsB/CB1954 kombinasyonuna alternatif olabilecek yeni ve daha etkili kombinasyon oluşturulması amaçlandı. İlk bölümde GkNtrA'nın biyokimyasal karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yapıldı. Elde edilen bulgular bu enzimin *E. coli* NfsB'den daha kararlı ve CB1954'e karşı daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar GkNtrA'nın kanser terapisinde kullanılma potansiyelinin yüksek olduğunu desteklemektedir. İkinci bölümde kanser terapilerinde kullanılma potansiyeli olabileceği düşünülen bilinen veya yeni toplam 51 ilaç-öncü adayının Ssap-NtrB ve GkNtrA kullanılarak aktivasyon taramaları HPLC analizleri ile gerçekleştirildi. Her iki enzim ile de bu bileşiklerin neredeyse tamamına yakınının indirgendiği ve LC-MS/MS analizi sonuçlarına göre hidroksilamin ve/veya amin türevi metabolitlerin oluştuğu görüldü. Kanser ve sağlıklı hücre hatlarıyla gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmaları sonucunda 10 bileşiğin kanser terapileri için kullanılma potansiyeli olabileceği düşünülmektedir. Tezin son bölümünde ise *S. saprophyticus* üropatojen bakterilerine karşı kullanılan bir antibiyotik (SMX) üzerine çalışmalar yapıldı. Sıvı kültür deneylerinde SMX'in pro-antibiyotik formunun (NO₂-SMX) SMX'ten daha iyi inhibisyon etki gösterdiği görüldü. Ayrıca disk difüzyon deneylerinde pro-antibiyotik formun bu patojen bakteriye ait enzim (Ssap-NtrB) kullanılarak indirgenmesi sonucu elde edilen metabolitlerin neredeyse SMX kadar *S. saprophyticus* üzerine etkili olduğu görüldü. Bu çalışma NO₂-SMX ve enzimatik indirgenme ürünlerinin mevcut antibiyotikten daha iyi bulunmasına yol açabilecek bilgiler sağlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nitroredüktaz, ilaç-öncü, nitroaromatik bileşikler, biyotransformasyon, enzimatik indirgeme.

SUMMARY

Nitroreductases are flavoenzymes that catalyze the reduction of many compounds carrying nitro groups. These enzymes have several applications including their usage in cancer therapy and biodegradation.

In the present work, several biotechnological applications were studied using two different nitroreductases (Ssap-NtrB and GkNtrA). To get a new and more effective NTR/prodrug combination which may be an alternative to the *E. coli* NfsB/CB1954 for cancer therapy. In the first chapter, biochemical characterization of GkNtrA was carried out. It was found that this enzyme was more stable and had higher catalytic activity with CB1954 than *E. coli* NfsB. These results indicated that GkNtrA might be used in cancer therapy. In the second chapter, known or new prodrug candidates (51 compounds) which could be useful in cancer therapies, have been screened for activation using Ssap-NtrB and GkNtrA through HPLC and LC-MS/MS analysis. Nearly all of these potential prodrugs were reduced by both of the enzymes, resulting in hydroxylamine and/or amine derivative metabolites. Cytotoxicity studies using non-cancer and cancer cell lines showed that 10 compounds have potentials to be used in cancer therapy. In the last chapter, studies on the usage of antibiotic, SMX used against *S. saprophyticus* uropathogenic bacteria, were carried out. It was found that the pro-antibiotic form of SMX (NO₂-SMX) was much more effective than SMX itself against *S. saprophyticus* in liquid medium. It was also found that the metabolites of NO₂-SMX obtained using Ssap-NtrB were as much effective as SMX in disk diffusion assays. The present study provides information which could lead to finding antibiotics better than the commercial ones.

Key Words: Nitroreductase, pro-drug, nitroaromatic compounds, biotransformation, enzymatic reduction.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince her türlü desteğiyle yanımda olan doktora çalışmamın bitirme aşamasında da danışmanlığı ile beni yarı yolda bırakmayan danışman hocam Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e ve doktora tez çalışma konusu belirlememde ve yaptığım çalışmalarda büyük emeği olan bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ilk danışman hocam Dr. Ayhan ÇELİK'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Anlayışı, güler yüzü ve her daim iyi niyetle yaklaşımıyla Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Gül GÜREK'e ve Prof. Dr. Serap BEŞLİ'ye

Tez savunma jürimde yer alan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Melek ÖZKAN, Prof. Dr. Osman Uğur SEZERMAN, Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU ve Doç. Dr. Kudret YILDIRIM'a

Doktora tez çalışmam süresince birlikte aynı laboratuvarı paylaştığım çok sevgili arkadaşlarım Fatma ERTAN, Saadet ALPDAĞTAŞ, Ünzile GÜVEN, Mohammed Gamal SHEHATA, Elif ULUTAŞ, Serpil BAĞ, Hatice DURMUŞ, Arzu GÜRBÜZ ve Dr. Zehra ÖLÇER'e

Tez çalışmama yaptıkları katkılarından dolayı Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Prof. Dr. Mehmet AY, Dr. Esra TOKAY, Dr. Tuğba GÜNGÖR ve Ferah CÖMERT ÖNDER'e

1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamındaki 110T754 ve 113Z706 nolu Tübitak Projeleri ve 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programı ile finansal desteği için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Ayrıca hayatımın her döneminde sonsuz sevgileri ile yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen annem Nurcihan AŞÇI, babam Mehmet Reha AŞÇI, abim Öner AŞÇI'ya ve hayatıma girdiği andan itibaren sevgisiyle ve pozitif enerjisiyle dayanağım olan hayat arkadaşım, sevgili eşim Cihan YETİŞ'e sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunmayı borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. NİTROREDÜKTAZLAR	4
2.1. Nitroaromatik Bileşikler ve Toksisitesi	4
2.1.1. İndirgenme Yolları	5
2.2. Bakteriyal Nitroredüktazlar	6
2.2.1. Yapı ve Fizyolojik Fonksiyonu	8
2.3. Nitroredüktazların Uygulama Alanları	9
2.3.1. CB1954 ve <i>E. coli</i> NfsB: GDEPT İçin Prototip Enzim/İlaç-öncü İkili	9
2.3.2. CB1954 Aktive Eden Alternatif Nitroredüktazların Keşfi	11
2.3.3. Nitroredüktaz Temelli GDEPT İçin Alternatif İlaç-Öncüler	13
2.3.4. Diğer Uygulama Alanları	15
3. MATERYAL ve METOD	16
3.1. Gereç	16
3.1.1. Kullanılan Enzimler	16
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar	16
3.2. GkNtrA'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu	19
3.2.1. Enzim Üretimi ve Saflaştırılması	19
3.2.2. Nitroredüktaz Aktivite Ölçümü	19

3.2.3. Flavin Analizi	20
3.2.4. Saf Enzimin Flavin ile Doyurulması	20
3.2.5. İyonik Şiddet	21
3.2.6. Optimum pH, Sıcaklık ve Isıl Kararlılık	21
3.2.7. Organik Çözücü	22
3.2.8. Kofaktör Tercihi	22
3.2.9. Kararlı-Hal (Steady-State) Kinetiği	22
3.2.10. Substrat Seçiciliğinin Belirlenmesi	23
3.2.10.1. Spektrum Taraması ve Kinetik Ölçümler	24
3.2.10.2. Zamana Karşı Metabolit Profilindeki Değişimin İncelenmesi	24
3.2.10.3. İkili Enzim Sistemi ile Nitroaromatik Bileşiklerin İndirgenmesi	26
3.2.11. Metabolit Karakterizasyonu	26
3.2.11.1. HPLC Analizleri	26
3.2.11.2. GC-MS Analizleri	27
3.2.12. Modelleme Çalışmaları	27
3.3. Alternatif İlaç-Öncü Araştırması	28
3.3.1. Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin NTR (Ssap-NtrB ve GkNtrA)	28
Katalizli İndirgeme Reaksiyonları	
3.3.1.1. HPLC Analizleri İçin Gerçekleştirilen Reaksiyonlar	28
3.3.1.2. LC-MS/MS Analizleri İçin Gerçekleştirilen Reaksiyonlar	30
3.3.2. Zamana Karşı Metabolit Profilindeki Değişimin İncelenmesi	31
3.3.3. İkili Enzim Sistemi ile Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin İndirgenmesi	31
3.3.4. Metabolit Karakterizasyonu	32
3.3.4.1. HPLC Analizleri	32
3.3.4.2. LC-MS/MS Analizleri	32
3.3.5. Kararlı-Hal (Steady-State) Kinetiği	33
3.3.6. Sitotoksisite Çalışmaları	33
3.4. Nitroredüktaz Kullanılarak Pro-antibiyotik Aktivasyonu	37
3.4.1. Spektrum Taraması ve Kararlı-Hal (Steady-State) Kinetiği	37
3.4.2. NO ₂ -SMX'in Ssap-NtrB/FDH İkili Enzim Sistemi Katalizli Reaksiyonu	37

3.4.3. Analitik Metodlar	38
3.4.3.1. HPLC Analizleri	38
3.4.3.2. LC-MS/MS Analizleri	38
3.4.4. Antibakteriyel Duyarlılık Testleri	39
3.4.4.1. Besiyerleri ve Bakteri Büyüme Şartları	39
3.4.4.2. Disk Difüzyon Testi	39
3.4.4.3. Sıvı Kültür Yöntemi	40
3.4.4.3.1. Sıvı Besiyerinde <i>S. saprophyticus</i> Büyümesine DMSO Etkisinin İncelenmesi	40
3.4.4.3.2. Sıvı Besiyerinde <i>S. saprophyticus</i> Büyümesine SMX ve NO ₂ -SMX Etkisinin İncelenmesi	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1. GkNtrA'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu	42
4.1.1. Flavin Analizi	42
4.1.2. İyonik Şiddet	44
4.1.3. Optimum pH, Sıcaklık ve Isıl Kararlılık	44
4.1.4. Organik Çözücü	46
4.1.5. Kofaktör Tercihi	47
4.1.6. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	48
4.1.7. GkNtrA'nın Substrat Seçiciliği	59
4.1.8. Metabolit Karakterizasyonu	71
4.1.9. GkNtrA Modelleme Çalışmaları	79
4.2. Alternatif İlaç-Öncü Araştırması	85
4.2.1. Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin NTR ile İndirgenmesi	85
4.2.2. İndirgenme Ürünlerinin Zamanla Değişiminin İzlenmesi	92
4.2.3. Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin Enzimatik Redüksiyonunun LC-MS/MS Analizleri	97
4.2.4. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	113
4.2.5. Sitotoksosite Çalışmaları	115
4.3. Nitroredüktaz Kullanılarak Pro-Antibiyotik Aktivasyonu	119
4.3.1. Kinetik Ölçümler	121

4.3.2. Metabolit Karakterizasyonu	123
4.3.3. Antimikrobiyal Analizler	125
5. SONUÇ	131
KAYNAKLAR	134
ÖZGEÇMİŞ	151
EKLER	152

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
2,4-DNT	: 2,4-dinitrotoluen
2,6-DNT	: 2,6-dinitrotoluen
2-NT	: 2-nitrotoluen
2HX	: 5-(aziridin-1-yl)-2-hidroksilamino-4-nitrobenzamid
4HX	: 5-(aziridin-1-yl)-4-hidroksilamino-2-nitrobenzamid
3-NT	: 3-nitrotoluen
4-NBA	: 4-nitrobenzoik asit
4-NT	: 4-nitrotoluen
ACN	: Asetonitril
ADMET	: Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity
BSA	: Sığır serum albümin
CB1954	: 5-aziridiny-2,4-dinitrobenzamid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNBMs	: Dinitrobenzamid mustardlar
EtOH	: Etanol
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
FDH	: Format dehidrogenaz
FMN	: Flavin mononükleotit
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GDEPT	: Gen yönlendirilmiş enzim-ilaç-öncü tedavisi
GMQE	: Global model quality estimation
Hep3B	: İnsan karaciğer kanser hücre hattı
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
HT-29	: İnsan Kolon kanser hücre hattı
HUVEC	: İnsan endometrium göbek kordon endotelyal hücre hattı
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranozid
K ₃ [Fe(CN) ₆]	: Potasyum hekzasiyanoferrat (III)

LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-kütle-kütle spektrometresi
MeOH	: Metanol
MTT	: 2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl bromid
NAD(P)H	: Nikotinamid adenin dinükleotit (fosfat) indirgenmiş formu
NFZ	: Nitrofurazon
NTOIN	: Nitrofurantoin
NTR	: Nitroredüktaz
OD	: Optik yoğunluk
PA	: Pikrik asit, 2,4,6-trinitrofenol
PC3	: İnsan prostat kanser hücre hattı
PYB	: Pepton yeast ekstrakt sıvı besiyeri
RT	: HPLC kolonda alıkonma süresi
QMEAN4	: Quality model energy analysis
SMX	: Sülfometoksazol
SN23862	: 5-[bis(2-kloroetil)amino]-2,4-dinitrobenzamid
SRB	: Sulforhodamine B
TNT	: 2,4,6-trinitrotoluen
TSE	: Tampon+substrat+enzim
TSK	: Tampon+substrat+kofaktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Nitro grubu taşıyan bileşiklerin nitroredüktaz tarafından nitroso, hidroksilamin ve amin bileşiklerine indirgenmesi.	1
2.1: Bakterilerde polinitroaromatik bileşiklerin indirgenme yolları.	6
2.2: Nitroaromatik substratların tip II (oksijen hassasiyeti olan) ve tip I (oksijen hassasiyeti olmayan) indirgenmesinin şematik gösterimi.	7
2.3: CB1954 indirgenmesi sonucu oluşan metabolitler ve genotoksisiteleri.	10
3.1: Tez çalışması kapsamında kanser terapilerinde kullanılma potansiyeli araştırılan ilaç-öncü bileşikleri ve açık yapıları.	35
4.1: GkNtrA ve ticari FMN'ye ait UV-Vis spektrumu.	42
4.2: FMN'e ait HPLC kromatogramları a) ticari FMN, b) GkNtrA'dan flavin ekstraksiyon örneği.	43
4.3: GkNtrA aktivitesine iyonik şiddet etkisi.	44
4.4: pH'ın GkNtrA aktivitesi üzerine etkisi.	45
4.5: Sıcaklığın GkNtrA aktivitesi üzerine etkisi.	45
4.6: GkNtrA'nın ısı kararlılığının belirlenmesi.	46
4.7: GkNtrA aktivitesi üzerine organik çözücü etkisi.	47
4.8: GkNtrA'nın kofaktör tercihiine ait Michaelis–Menten grafiği.	48
4.9: a) NADH ve b) NADPH kullanılarak GkNtrA'nın CB1954'ü indirgemesi reaksiyonunun kararlı hal kinetiği.	49
4.10: a) NADH ve b) NADPH kullanılarak GkNtrA'nın SN23862'yi indirgemesi reaksiyonunun kararlı hal kinetiği.	50
4.11: a) NADH ve b) NADPH kullanılarak GkNtrA'nın 2,4-DNT'yi indirgemesi reaksiyonunun kararlı hal kinetiği.	50
4.12: NFZ ve NFZ/askorbik asit içeren reaksiyonlarda GkNtrA aktivite değişiminin karşılaştırılması.	53
4.13: 2-NT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	55

4.14:	3-NT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	55
4.15:	4-NT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	56
4.16:	2,4-DNT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	56
4.17:	2,6-DNT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	57
4.18:	TNT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	57
4.19:	Pikrik asit ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	58
4.20:	GkNtrA'nın substrat seçiciliğinin belirlenmesinde kullanılan bileşikler ve açık yapıları.	59
4.21:	4-NBA'nın ve indirgeme ürünlerinin açık yapısı.	61
4.22:	4-NBA'nın GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı a) substrat ve kofaktör azalışı ve b) ürün oluşumu.	61
4.23:	4-NBA'nın GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun 26. saatine ait HPLC kromatogramı.	62
4.24:	Artan NFZ konsantrasyonuna karşı farklı sıcaklıklarda ölçülen GkNtrA'nın spesifik aktivitesi.	63
4.25:	NFZ'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunda başlangıç ve reaksiyon sonrası NFZ ve NADH'in miktar değişim grafiği.	63
4.26:	NFZ'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	64
4.27:	NFZ'nin GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu oluşan toplam ürünlerin sıcaklığa ve artan NFZ konsantrasyonuna göre değişimi a) 13 dakikalık reaksiyon b) 30 dakikalık reaksiyon.	65
4.28:	NTON'in GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı substrat azalışı ve ürün oluşumu.	66

4.29:	NTON'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun 116. dakikasına ait HPLC kromatogramı.	67
4.30:	2-NT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	68
4.31:	3-NT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	68
4.32:	4-NT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	69
4.33:	2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	69
4.34:	2,6-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	70
4.35:	TNT'in GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	70
4.36:	PA'nın GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı.	71
4.37:	CB1954'ün GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonunun 0, 1 ve 10. dakikalarına ait HPLC kromatogramı.	72
4.38:	SN23862'nin GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonunun 0, 1, 10, 20, 30 ve 45. dakikalarına ait HPLC kromatogramı.	73
4.39:	2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı substrat azalışı ve ürün oluşumuna ait HPLC kromatogramı.	74
4.40:	2,4-DNT'nin indirgenmesi sonucu oluşması muhtemel bileşikler ve kütleleri.	75
4.41:	2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunda kontrol ve 10 s, 10 dk, 1 saatlik reaksiyona ait HPLC kromatogramı.	75
4.42:	2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonunda reaksiyon bileşenlerinin zamana karşı % alan değişimi.	76
4.43:	2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunda HPLC analizinde zamana karşı NADH değişimi (340 nm).	76

4.44:	2,4-DNT'in GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun GC-MS analizine ait a) TIC (Total Ion Chromatogram) ve b) 182 ve 152 kütleleri seçilerek elde edilen MIC kromatogramı.	77
4.45:	182 kütleli 10,60 dakika alıkonma süresinde gelen pikin (2,4-DNT) kütle spektrumu.	77
4.46:	152 kütleli 10,71 dakika alıkonma süresinde gelen pikin (2-nitro-4-aminotoluen) kütle spektrumu.	78
4.47:	316 kütleli 24.81 dakika alıkonma süresinde gelen pikin (azoksi bileşiği) GC kromatogramı ve kütle spektrumu.	78
4.48:	GkNtrA ve GkNtrA'a en yüksek benzerlik gösteren nitroredüktazların aminoasit dizi analizi ve GkNtrA'nın muhtemel sekonder yapısı.	80
4.49:	GkNtrA ve tip 1 (oksijen hassasiyeti olmayan) nitroredüktaz süper familyasının filogenetik analizi.	81
4.50:	NTR katalizli Ping-Pong bi-bi reaksiyon mekanizması.	82
4.51:	Model GkNtrA'nın sekonder yapısı.	83
4.52:	FMN ile hidrojen bağı yaparak etkileşimde bulunan aminoasitler.	84
4.53:	Tez çalışmasında kullanılan potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli reaksiyonlarının HPLC analizlerinden elde edilen sonuçlar.	86
4.54:	a) Ssap-NtrB ve b) GkNtrA katalizli 14 nolu bileşiğin redüksiyonu reaksiyonunun zamana karşı HPLC kromatogramı.	93
4.55:	a) Ssap-NtrB katalizli 8b'nin redüksiyonu reaksiyonunun zamana karşı HPLC kromatogramı, b) zamanla ürün ve substrat miktarındaki değişim.	94
4.56:	8c potansiyel ilaç-öncüsünün Ssap-NtrB katalizli indirgenme reaksiyonunun HPLC kromatogramı.	95
4.57:	8c potansiyel ilaç-öncüsünün Ssap-NtrB katalizli indirgenmesinde reaksiyonun süresinin ürün profilindeki değişimine ait HPLC kromatogramı.	96
4.58:	8c potansiyel ilaç-öncüsünün Ssap-NtrB katalizli indirgenmesiyle oluşan P1, P3, P7 ve P9 ürünlerinin zamanla miktarlarındaki değişim.	96

4.59:	8a'nın a) açık yapısı, b) Ssap-NtrB ile reaksiyon öncesine ait LC kromatogramı ve c) 22,35 dk'da gelen pikin MS spektrumu.	100
4.60:	8a'nın a) indirgenme ürünlerinin açık yapısı, b) Ssap-NtrB ile reaksiyonuna ait LC kromatogramı ve c) 6,92 dk'de gelen pikin MS spektrumu.	101
4.61:	8a'nın GkNtrA ile reaksiyon öncesine ait (a) LC kromatogramı (b) 22,35 dk'de gelen pikin LC-MS spektrumu.	102
4.62:	8a'nın a) indirgenme ürünlerinin açık yapısı, b) GkNtrA ile reaksiyonuna ait LC kromatogramı ve c) 17,04 dk'de gelen pikin MS spektrumu.	103
4.63:	8a'nın nitroredüktaz aracılı indirgenmesi sonucu oluşması muhtemel metabolitler.	104
4.64:	8b'nin a) açık yapısı, b) Ssap-NtrB ile reaksiyon öncesine ait LC kromatogramı ve c) 21,78 dk'de gelen pikin MS spektrumu.	105
4.65:	8b'nin Ssap-NtrB ile reaksiyonuna ait a) LC kromatogramı, b) 16,1 dk'de gelen pikin MS spektrumu, c) 15,9 dk'de gelen pikin MS spektrumu ve d) 4,6 dk'de gelen pikin MS spektrumu.	106
4.66:	8b'nin GkNtrA ile reaksiyon öncesine ait (a) LC kromatogramı (b) 21,78 dk'de gelen pikin MS spektrumu.	107
4.67:	8b'nin GkNtrA ile reaksiyonuna ait a) LC kromatogramı b) 16,13 dk'de gelen pikin MS spektrumu, c) 15,91 dk'de gelen pikin MS spektrumu.	108
4.68:	NO ₂ -SMX'ün Ssap-NtrB katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı substrat azalışı ve ürün oluşumuna ait HPLC kromatogramı.	109
4.69:	8b substratının nitroredüktaz aracılı indirgenmesi sonucu oluşması muhtemel metabolitler.	109
4.70:	MTT yöntemi ile potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin Hep3B, HT-29 kanser hücre hattı ve HUVEC sağlıklı hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.	116
4.71:	a) Pro-antibiyotik sentezi (NO ₂ -SMX, 3) ve b) nitroredüktaz katalizli indirgeme sonucu oluşması muhtemel ürünler (NO-SMX, 4; N ⁴ -OH-SMX, 5 ve SMX, 6).	121

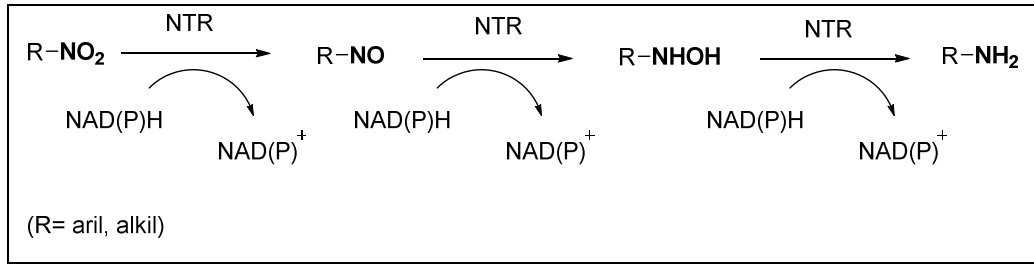
4.72:	NO ₂ -SMX'ün SsapNtrB katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu.	122
4.73:	NO ₂ -SMX'ün Ssap-NtrB katalizi reaksiyonunun durgun hal kinetiği.	122
4.74:	NO ₂ -SMX'ün Ssap-NtrB katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı substrat azalışı ve ürün oluşumuna ait HPLC kromatogramı.	124
4.75:	NO ₂ -SMX'in Ssap-NtrB katalizli indirgeme reaksiyonunun LC kromatogramı ve 6,35 dk'de gelen pikin (4) MS/MS analizi.	124
4.76:	NO ₂ -SMX'in Ssap-NtrB katalizli indirgeme reaksiyonunun LC kromatogramı ve 5,15 dk'de gelen pikin (5) MS/MS analizi.	125
4.77:	<i>S. saprophyticus</i> büyümesine çeşitli antibiyotik türevi maddelerin etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması.	127
4.78:	p-SsapNtrB plasmidini taşıyan <i>E. coli</i> BL21 DE3'ün IPTG indüklemesi ile büyümesine çeşitli antibiyotik türevi maddelerin etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması.	128
4.79:	<i>S. saprophyticus</i> büyümesine DMSO etkisinin incelenmesi.	129
4.80:	DMSO, SMX ve NO ₂ -SMX'in <i>S. saprophyticus</i> büyümesine etkisinin incelenmesi.	129

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler.	16
3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.	18
3.3: Sıvı besiyerinde <i>S. saprophyticus</i> büyümesine DMSO etkisinin incelenmesi deneyinde bileşenler.	40
3.4: Sıvı besiyerinde <i>S. saprophyticus</i> büyümesine DMSO ve (pro)antibiyotik etkisinin incelenmesi deneyinde bileşenler.	43
4.1: GkNtrA ve ticari FMN'ye ait spektrum verileri.	43
4.2: Literatürde yer almış tip I NTR'ların CB1954'e karşı aktiviteleri.	51
4.3: GkNtrA'nın çeşitli nitro substütiye bileşiklere karşı spesifik aktivitesi.	58
4.4: SWISS MODEL homoloji modellemesine göre GkNtrA'nın FMN bağlanma bölgeleri.	84
4.5: LC-MS/MS analiz sonuçları.	97
4.6: Hızlı tarama yöntemi (quick scan mod) ile elde edilen kütle verileri.	98
4.7: CB1954, SN23862 ve tez kapsamında çalışılan potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin literatürdeki bazı NTR'ler, Ssap-NtrB ve GkNtrA ile indirgenmesine ait kinetik veriler.	114
4.8: <i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305 ve <i>E. coli</i> BL21 DE3 bakterlerine karşı çeşitli antibiyotikler ve oluşturdukları zon çapları.	126

1. GİRİŞ

Nitroredüktazlar (NTR), oksidoredüktaz sınıfında yer alan bir enzim ailesidir ve yapısında prostetik grup olarak FMN veya FAD bulunur. Kofaktör olarak NAD(P)H kullanarak nitro grubu taşıyan birçok bileşiğin indirgenmesi reaksiyonunu katalizleyerek sonuç olarak hidroksilamin ve amin türevi bileşikler oluşur (Şekil 1.1). Şimdiye kadar sadece iki tip bakteriyel nitroredüktaz karakterize edilmiş olup bunlar tip I (oksijen hassasiyeti olmayan) ve tip II (oksijen hassasiyeti olan) nitroredüktazdır [1], [2].



Şekil 1.1: Nitro grubu taşıyan bileşiklerin nitroredüktaz tarafından nitroso, hidroksilamin ve amin bileşiklerine indirgenmesi.

Oksijen hassasiyeti olmayan, NAD(P)H bağımlı bakteriyel nitroredüktazlar çok yönlü enzimlerdir. Ticari değeri yüksek kimyasalların sentezi [4], [5] nitroaromatik bileşiklerin biyodegradasyonu ve kirliliğin önlenmesi [6] ve kanser terapileri gibi [7], [8] çeşitli uygulamaları mevcuttur.

Nitroredüktazların medikal uygulamalarının başında gelen kanser terapilerindeki kullanımında kararlılık ve konjuge sistemlerdeki etkinliğinin düşük olması gibi önemli sınırlamalardan dolayı yeni nitroredüktaz arayışında bulunmaktadır. Bu sebeple biri mezofilik kaynaklı diğeri ise termofilik kaynaklı olmak üzere iki yeni nitroredüktazın klonlanması, ekspresyonu ve mezofilik kaynaklı olanın karakterizasyonu daha önce GTÜ-Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirildi [9], [10]. Bu enzimlerin geniş biyoteknolojik uygulama alanlarının olması ve mevcut enzimlerin yeterli özellikleri sağlamamaları dolayısıyla yeni nitroredüktaz geliştirilmesi önem taşımaktadır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Flavin taşıyan nitroredüktazlar (NTR) oksidoredüktaz sınıfına ait ve yapısal olarak homolog olan enzim grubudur. Bu enzimler bileşiklerdeki nitro grubunun ($-NO_2$), hidroksilamin ($-NH-OH$) üzerinden amin ($-NH_2$) grubuna dönüşümünü katalizler. Nitroredüktazlar çok çeşitli substratları kabul etmeleri bakımından özel enzimlerdir. Bu enzimleri önemli kılan özelliklerinden biri de kanser tedavilerinde kullanıma potansiyelidir. İlaç öncü (prodrug)/NTR sistemi gen yönlendirilmiş enzim ilaç-öncü tedavisinde (GDEPT) kullanılan sistemlerden biridir [11]. Prensip olarak bu sistemde, ilaç öncü bileşik NTR'lar tarafından indirgenerek aktif formuna dönüşür ve oluşan sitotoksik bileşik DNA çapraz bağlayıcı ajan olarak görev yaparak tümör hücrelerindeki DNA'ya bağlanıp tümör gelişimini engeller. Bu alanda bilinen en iyi örnek *E. coli*'den elde edilen NTR ile CB1954 (5-aziridinyl-2,4-dinitrobenzamid) kombinasyonunun kullanılmasıdır [12]-[16]. Ancak, *E. coli* NTR'nın kullanımında kararlılığının az olması ve biyokonjuge sistemlerde etkinliğinin düşük olması gibi sınırlamalar söz konusudur. Tüm bu sınırlandırmaların aşılması ve daha etkili NTR/ilaç öncü sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Çağımızın hastalığı olarak bilinen kansere karşı literatüre kazandırılacak her yeni bilgi, yaklaşım fazlasıyla önem taşımaktadır. Şu ana kadarki mevcut enzim ilaç-öncü kombinasyonları ile gerçekleştirilen gen terapinin kanser hastaları üzerindeki klinik denemelerinde (faz I/II) etki görülmesine rağmen bu etki istenilen seviyeye ulaşmamıştır [17]-[22]. Daha yüksek etki gösterebilecek kombinasyonların oluşturulmasına yönelik araştırma yapmak önem taşımaktadır. Bu tez kapsamında elimizdeki mevcut nitroredüktazlar kullanılarak yeni ve/veya bilinen ilaç-öncü bileşikler ile gerçekleştireceğimiz çalışmalardan elde edeceğimiz sonuçlar ile daha etkili bir NTR/ilaç-öncü bileşik kombinasyonunun oluşturulabilmesine yönelik katkılar sağlayacağımızı düşünmekteyiz. İlaç geliştirme, tüm dünyada hız kesmeden devam eden bir çalışma alanı olup mevcut ilaçların yan etkilerinin giderilmesi, daha etkili yeni ilaçların keşfi gibi amaçlarla önemini sürdürmektedir. Çok fazla ve bilinçsiz kullanılan ilaçlardan biri olan antibiyotiklerin daha düşük dozda bununla birlikte

daha etkili olmaları yönünde araştırma yapmak amacıyla da bu tez içerisinde çalışmalar yapıldı.

Bütünlük sağlama açısından tez kapsamında yapılan çalışmalar üç ayrı bölümde verilmiştir. İlk bölümde klonlaması ve ekspresyonu daha önce [10] gerçekleştirilen GkNtrA'nın geniş biyokimyasal karakterizasyonu ve modelleme çalışmaları gerçekleştirildi. İkinci bölümde NTR (Ssap-NtrB ve GkNtrA) enzimleri ile CB1954 türevi yeni ve/veya bilinen bileşiklerin taranması, tarama sonuçlarından elde edilen sonuçlara göre, biyoaktivasyonu gerçekleştiren bileşiklerin metabolit profilinin çıkarılması ve biyoaktivasyona ait kinetik parametrelerin belirlenmesi ve karşılaştırılması sağlandı. Son bölümde ise pro-antibiyotik aktivasyonu ile nitroredüktazların yeni bir biyoteknolojik uygulaması üzerinde çalışılmış ve mevcut antibiyotiklere farklı bir yaklaşımda bulunulmuştur.

2. NİTROREDÜKTAZLAR

2.1. Nitroaromatik Bileşikler ve Toksisitesi

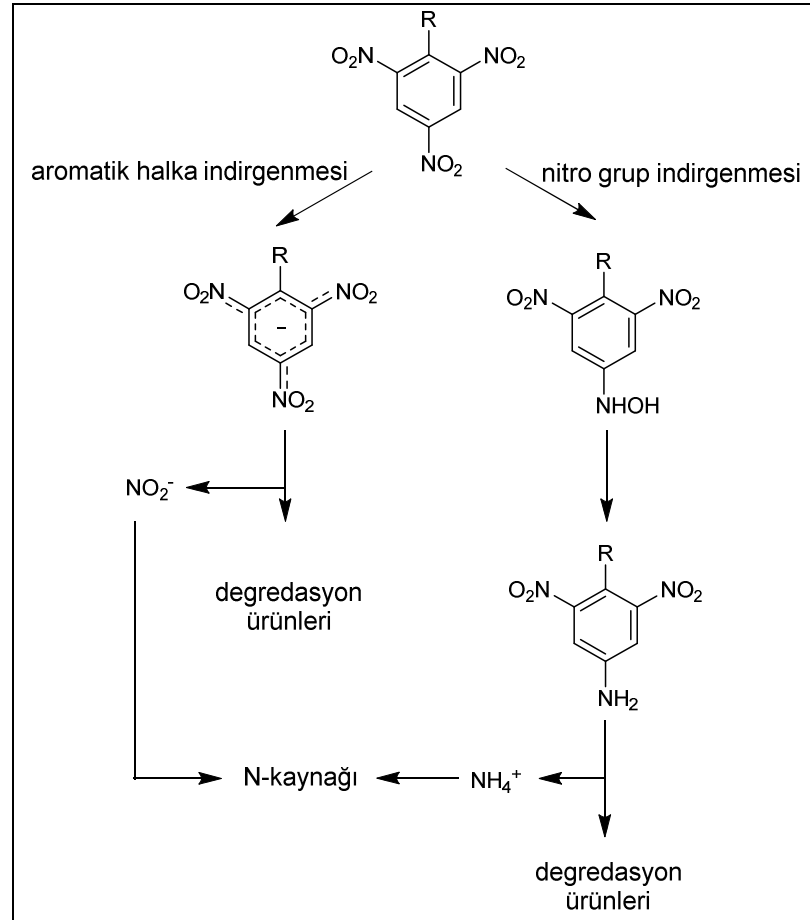
Toksik bileşikler, doğal ürünler ve ksenobiyotik kimyasallar olarak iki gruba ayrılır. Yaşayan organizmaların metabolik faaliyetleri sonucu oluşturduklarını doğal ürünler olarak tanımlarken endüstriyel faaliyetler veya diğer insan aktiviteleri sonucu oluşan bileşiklere ksenobiyotik denilmektedir [23], [24]. Dünyamızda bulunan nitroaromatik bileşiklerin çok azının doğal ürün olduğu söylenebilir. Doğal ürünlere örnek olarak kloramfenikol [25] ve bazı bitkilerin savunma mekanizması olarak sentezledikleri nitroglukozidler [26] verilebilir. Mevcut nitroaromatiklerin çok büyük çoğunluğu ise özellikle plastik, pestisid, boya, ilaç ve patlayıcıların endüstriyel prosesinde oluşmaktadır [23]. Nitroaromatik bileşikler üretim, taşıma, kullanma ve aşırı askeri faaliyetler sonucu çevreye yayılmaktadır. Bakteri, alg, bitkiler, omurgasızlar ve memeliler üzerine yapılan değişik çalışmalar sonucu birçok nitroaromatik bileşiğin toksik ve mutajenik olduğu görülmüştür [27]-[29]. Nitrolu bileşiklerin toksisitesi bileşikteki nitro gruplarının indirgenmesi sonucu oluşan ürünlerle ilişkilidir. İndirgenme sonucu oluşan hidroksilamin türevleri DNA gibi biyomoleküller ile etkileşime girerek sonuçta toksik ve mutajenik etkilere yol açabilmektedir. Toksisite oluşan ürünlerin elektrofilik karakteri ile ilişkili iken mutajenik etki esas olarak hidroksilaminin guanidine eklenmesiyle oluşan yapıdan kaynaklanmaktadır [30]. Memelilerde nitroaromatik bileşiklerin bağırsak mikrobiyal florasında yer alan bakteriler tarafından dönüşüme uğraması sonucu oluşan konjuge metabolitler yine bu flora sayesinde daha ileri reaksiyonlara uğrayıp indirgenebilir veya parçalanabilirler. Bağırsak mikrobiyal florasında nitroredüktaz bulunması dış kaynaklı nitroaromatik kimyasalların metabolize edilebilmesinde kilit rol oynamaktadır. Aksenik (axenic, yabancı maddeler bulaşmamış) ve aksenik olmayan (nonaxenic, yabancı maddeler bulaşmış) hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar nitro gruplarının ilgili hidroksilamin türevlerine indirgenmesi nedeniyle bu kimyasalların kanserojen metabolitlere dönüşümlerinde nitroredüktazların rol oynadığını ortaya çıkarmıştır [31]. Oluşan arilhidroksilaminler veya

asetoksiarilaminler ve elektrofilik nitreniyum iyonu ($-N^+$) DNA ile etkileşime girebilmekte ve sonuç olarak mutajenik etkilere yol açabilmektedir [32].

2.1.1. İndirgenme Yolları

Nitroaromatik bileşiklerdeki aromatik halkada elektronlarının delokalizasyonu bileşiği kimyasal olarak kararlı kılmaktadır. Bu kararlılığa rağmen mikroorganizmalar aromatik halkayı parçalayıp merkezi metabolik yollara ara ürünler oluşturacak bir yol bulmuşlardır. Oksijen birçok aromatik bileşiğin yıkımına katkısı olan reaktif bir moleküldür. Mono- ve di-oksigenazların oksijeni kullanılarak katalizledikleri reaksiyonlarda birçok aromatik bileşiğin parçalanması sağlanır [24]. Ancak polinitroaromatik bileşiklerdeki nitro grubunun belirgin elektron çekici karakteri aromatik halkada elektron eksikliğine sebep olmakta ve bundan dolayı bu bileşiklerin yıkımında öncelikli olarak indirgenme reaksiyonları desteklenmektedir. Oksidatif yol aerobik şartlarda gerçekleşirken redüktif metabolizma hem aerobik hem de anaerobik şartlarda gerçekleşebilmektedir.

Bu nedenle, aromatik halkanın mono- ve di-oksigenazlar yoluyla oksidasyonu sonucu hidroksil türevleri oluşumu, ardından aromatik halka açılması, mononitroaromatik bileşiklerin ve hatta bazı dinitroaromatiklerin aerobik bozunması için beklenen mekanizmadır [33]-[37]. Bileşikteki nitro grubu sayısı arttıkça oksidatif parçalanma olasılığı azalmaktadır. Çünkü nitro grupları aromatik halkadan elektronları çektikçe elektron eksikliği ortaya çıkmakta ve bu da oksijenaz aracılı elektrofilik atak yapılmasına negatif etki oluşturmaktadır. Sonuç olarak çoklu nitro grubu içeren TNT gibi bileşiklerin degradasyonu genellikle redüktif yollarla gerçekleşmektedir. Nitroaromatik bileşiklerin indirgenme hızını aromatik halkaya bağlı diğer substitüelerin kimyasal özellikleri belirlemektedir. Nitro grubun indirgenme hızı aromatik halkada para pozisyonundaki diğer grubun $NH_2 < OH < H < CH_3 < COOH < NO_2$ sıralamasıyla artacaktır [38]. Bu sebeple birinci nitro grubunun amino grubuna indirgenmesi diğer nitro gruplarının indirgenmesini zorlaştırmaktadır. TNT'nin biyotransformasyonunda aminodinitrotoluen ve diaminonitrotoluen başlıca ürünleri olarak oluşurken üç nitro grubunun indirgenmesi de mümkündür [39]-[41].



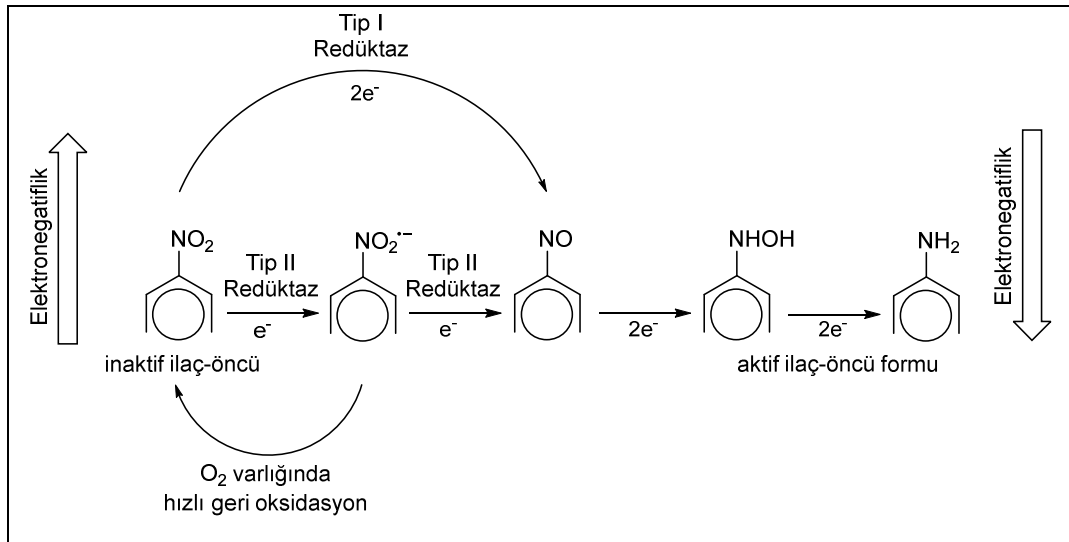
Şekil 2.1: Bakterilerde polinitroaromatik bileşiklerin indirgenme yolları. R, $-\text{CH}_3$ (TNT) veya $-\text{OH}$ (pikrik sit).

Polinitroaromatik bileşikler iki tip indirgenme yoluyla dönüşüme uğrayabilmektedir: (1) hidrid transferazlar tarafından aromatik halkaya hidrid iyonu ilavesiyle hidrid- Meisenheimer kompleksi oluşumu ve beraberinde meydana gelen ileri metabolik reaksiyonlarla nitrit salınımı yoluyla aromatik halkanın indirgenmesi, veya (2) nitroredüktazlar tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu nitro grubunun hidroksilamin veya amin grubuna indirgenmesidir. Oluşan indirgeme ürünlerinin daha ileriki parçalama reaksiyonları sonucu meydana gelen nitrit veya amonyum bakteriyel büyüme için azot kaynağı olarak kullanılabilir [3] (Şekil 2.1).

2.2. Bakteriyel Nitroredüktazlar

Nitroredüktazlar flavin bağlı oksidoredüktaz sınıfında yer alan ve çok çeşitli aromatik bileşiklerdeki nitro gruplarının indirgenmesi reaksiyonlarını katalizleyen

enzim ailesidir. Bu enzimler iki fonksiyonel sınıfa ayrılır. Tip I nitroredüktazlar oksijen hassasiyeti olmayan ve oksijenli ortamda nitroso, hidroksilamin ve/veya amin son ürünlerini oluşturken tip II nitroredüktazlar sadece oksijensiz ortamda söz konusu ürünleri oluşturabilir [42]. Mekanistik temelli bu ayrım ile tip II enzimleri birbirini izleyen tek elektron transferi ile nitro gruplarını indirger. Bunun sonucu olarak da oluşan nitro radikal anyon ara ürünü moleküler oksijen ile hızlıca okside olarak başlangıç bileşiğine dönüşür. Tabi bu durum faydasız bir redoks döngüsü içerisinde süperoksit anyonu oluşumunu beraberinde getirir [43]. Buna karşın tip I nitroredüktazlar ortamda oksijen olup olmadığına bakmaksızın iki elektron yoluyla indirgeme sağlayarak son ürün(ler)i başarıyla oluşturmaktadır [44] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Nitroaromatik substratların tip II (oksijen hassasiyeti olan) ve tip I (oksijen hassasiyeti olmayan) NTR ile indirgenmesinin şematik gösterimi.

Tip I nitroredüktazlar özellikle GDEPT tedavisi için ilgi çekici durumdadır. Bunun nedeni bu enzimlerin insan kaynaklı olmayıp büyük çoğunlukla bakteri kaynaklı olmalarından gelir. Tip I NTR'lar hem oksijenli hem de düşük oksijenli (hypoxic) tümör dokularında nitroaromatik ilaç-öncülerin (prodrug) biyolojik olarak indirgenerek aktivasyonunu katalizleme yeteneğine sahiptir. Aromatik halkaya bir veya daha fazla güçlü elektron çekici nitro substitüe eklenmesi ilaç-öncü tasarımında çokça kullanılan bir stratejidir. Nitro grup(lar) diğer yüksek reaktif substitüellerden elektron yoğunluğunu kendine doğru çekmesiyle onları kısmen inert hale getirirler [45]. Nitro grubunun tek bir enzim katalizi ile dört veya altı elektron indirgemesi

sonucu hidroksilamin (-NHOH) veya amin (-NH₂) oluşumu bileşikte büyük bir elektronik etki yaratır [46]. Bu geçiş ile bir nevi elektronik anahtar açılmış olup elektronlar halka içine itilir ve böylece reaktif substütieller serbest kalır (Şekil 2.2).

Bakteriyal tip I nitroredüktazların büyük çoğunluğu birbirinin aynısı iki zincirden meydana gelir. Genellikle her monomerine bir FMN prostetik grup (daha az yaygın olarak FAD de olabilir) bağlı olarak homodimerik kuaternal yapıdadırlar [2], [47], [48]. Ping Pong bi bi kinetik mekanizmasına [3] göre kataliz gerçekleştiren bu enzimlerin her bir aktif bölgesine NAD(P)H kofaktörü girer. İki elektronu flavine aktarır okside nikotinik kofaktör aktif bölgeden çıkar. Sonrasında ikinci substrat aynı aktif bölgeye girerek elektron çiftini indirgenmiş flavinden alarak kendisi indirgenirken flavini yükseltger ve böylece flavin başlangıç haline döner bununla birlikte indirgenmiş ürün aktif bölgeden ayrılır. Nitroaromatik bileşiklerin indirgenmesinde tüm bu döngü hidroksilamin veya amin oluşumuna dek tekrarlanabilir (Şekil 2.2). Tüm bu döngü boyunca flavinin semikuinon halinin kararsız olmasından dolayı tek elektron vermesi termodinamik açıdan tercih edilmeyen bir durumdur [49], [50].

2.2.1. Yapı ve Fizyolojik Fonksiyonu

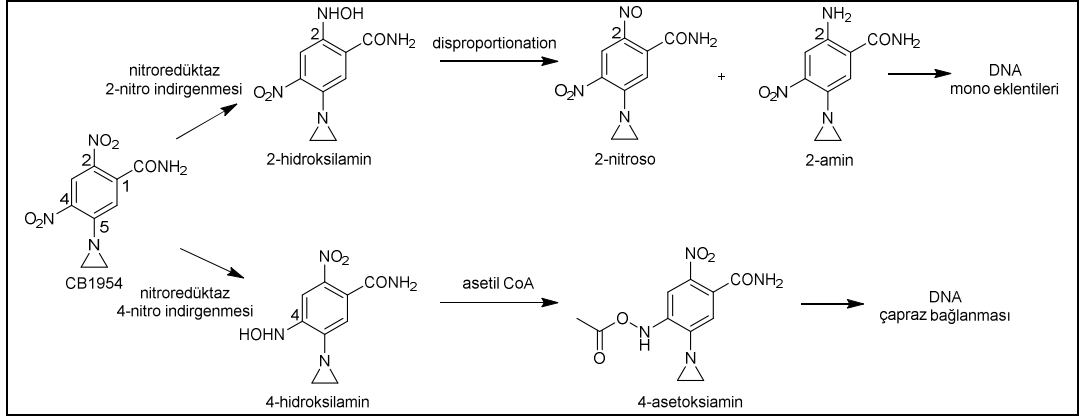
Nitroredüktaz ismi bu enzimlerin fizyolojik rolünden ziyade etkiledikleri fonksiyonel gruptan gelmektedir. Ne doğada oldukça az bulunan nitroaromatik bileşiklerin ne de insan aktiviteleri sonucunda çokça çevreye yayılmış ksenobiyotik nitrolu bileşiklerin (örneğin 2,4,6-trinitrotoluen (TNT)) bu enzimlerin muhtemel birinci substratı olduğu kabul edilmektedir [3]. Örneğin biyoluminesans bakteride tip I nitroredüktaz, flavin redüktaz gibi görev yapmakta olup bioluminesans reaksiyonlarında gerekli indirgenmiş FMNH₂ sağlar [51]. Diğer bakterilerdeki bu enzimlerin bazısının ise kuinon redüktaz gibi davranarak indirgenmiş kuinon oluşturduğu ve bu sayede bakterinin antioksidan savunmasına katkı yaptığı önerilmiştir. Şüphesiz tip I nitroredüktazların çoğunluğunun çok çeşitli ve geniş bir spektrumda substratları kabul etmelerinden dolayı öncelikli fizyolojik rolünün aydınlatılması oldukça güçtür. Nitro-heterosiklik moleküllerin, flavin ve kuinonların yanı sıra heksavalent krom [52], [53] demir [54] ve azo boyaların [55] da

indirgenmesi reaksiyonunu katalizlediği görüldü. Bu şekilde geniş bir substrat çeşitliliği gösteren bazı enzimlerin oldukça elastik aktif bölgeye sahip olabileceği ve bu şekilde farklı büyüklükteki substratları kabul edebildiği düşünülmektedir [49]. Öncelikli fizyolojik rolünün ne olduğu tam bilinmemesine rağmen tip I nitroredüktazlar sentetik ilaç-öncü substratların biyo-indirgeme ile aktifleşmesini sağladığı için çok amaçlı enzimatik araçlar olarak büyük ümit vaat etmektedir [44].

2.3. Nitroredüktazların Uygulama Alanları

2.3.1. CB1954 ve *E. coli* NfsB: GDEPT İçin Prototip Enzim/İlaç-Öncü İkili

CB1954, GDEPT için üzerinde en çok çalışılan ilaç öncü bileşiğidir (Şekil 2.3). İsmi Londra'daki Chester Beatty Laboratuvarından almış ve 1960'lı yılların sonuna doğru sentezlenmiştir. Sonrasında CB1954 ve beraberinde bir seri bileşiğin transplantasyona uygun rat Walker 256 kanserine karşı aktiviteleri test edilmiştir [56]. CB1954'ün tedavi boyunca çok az toksisite göstererek bu modelde tek başına şaşırtıcı bir etki gösterdiği görüldü [57]. Beklenildiği gibi bu etkinin nasıl bir mekanizma ile gerçekleştiğini anlamak büyük ilgi uyandırmıştır. Mekanizmayı anlamak amacıyla Knox ve arkadaşlarının önemli bir araştırması mevcuttur [58]. Nihayetinde CB1954'ün ilaç-öncü olarak davrandığı keşfedilmiş ve rat NQO1 (NAD(P)H kuinon oksidoredüktaz 1, bilinen ismi ile DT diaphorase, tip I nitroredüktaz) tarafından 4-hidroksilamin türevine dönüştürüldüğü kaydedilmiştir [59]. CB1954 ve indirgenmiş formu 4-hidroksilamindeki aziridin grubunun DNA alkilleme kapasitesi birbirinden farklı olmakla birlikte düşük seviyede olduğu görülmüştür. Ancak 4-hidroksilamin türevinin spontane olarak asetil-CoA veya diğer hücrel tiyoesterlerle reaksiyona girebilme yeteneğinden dolayı bileşik bi fonksiyonel alkilleme ajanına dönüşmekte ve sonuç olarak DNA'nın çapraz bağlanmasına yol açmaktadır [44], [60] (Şekil 2.3). Katı tümörlerde NQO1'in yüksek seviyede eksprese edilmesinin [61] yanı sıra Walker 256 tümörlerinde çapraz bağlı DNA'nın tamirinin başarılı olamaması CB1954'e karşı duyarlılığı artıran sebeplerdir [62].



Şekil 2.3: CB1954 indirgenmesi sonucu oluşan metabolitler ve genotoksisiteleri.

Diğer rat hücre hatlarında Walker 256 hücrelerine göre genellikle daha düşük seviyede olmakla birlikte CB1954'e karşı duyarlılık görüldü. Maalesef insan tümörlerinde benzer etki gözlenmemiştir. İnsan hücre hatlarında NQO1'in yüksek seviyede eksprese olmasına rağmen CB1954'ün 500-5000 kat daha az toksik olduğu görüldü [63]. Daha sonraki biyokimyasal çalışmalar göstermiştir ki saf rekombinant rat NQO1'in CB1954'ü indirgemesi insan enzimine göre çok daha etkili gerçekleştirmektedir (k_{cat}/K_M bakımından) [64]. İki enzim arasındaki bu farkın aminoasit dizilimindeki tek bir aminoasitten kaynaklanabileceği atfedilmektedir (104. rezidü rat NQO1'de tirozin iken insan NQO1'de glutamindir) [65].

Bu olumsuz sonuçlara rağmen CB1954 üzerine ilgi azalmamış ve yönlendirilmiş enzim/ilaç-öncü stratejilerinde (directed enzyme-prodrug strategies) kullanıma potansiyeli öngörülmüştür. *E. coli* kaynaklı rekombinant NfsB tip I nitroredüktazının rat NQO1'e göre CB1954'ü indirgemesi 90 kat daha (k_{cat}/K_M bakımından) etkin gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [8]. NQO1'den farklı olarak *E. coli* NfsB hem 2- hem de 4-hidroksilamin türevi oluşturmaktadır. Oluşan indirgeme ürünleri yaklaşık aynı oranda oluşmakla birlikte aynı molekülde iki nitro grubunun indirgenmesi mümkün olmamıştır [66]. İlk yapılan çalışmalarda 4-hidroksilamin türevinin aksine 2-hidroksilamin türevi monofonksiyonel alkilleyici ajan olarak (DNA'nın çapraz bağlanmasını sağlayamadığı; Şekil 2.3) geri planda kalmış ve bir süre istenmeyen yan ürün olarak görüldü [67]. Ancak daha sonraları 2-hidroksilamin türevinin daha kıymetli olduğuna yönelik bulgular elde edilmiştir. Şöyle ki 2-hidroksilamin redoks reaksiyonlarının özel bir türü olan disproporsiyonlamayla 2-amin ve 2-nitroso

oluşturmaktadır. 2-amin sadece bir çok insan kanser hücre hattında 4-hidroksilaminle yarışacak potansiyele sahip olmak bakımından değil ayrıca bystander etki bakımından da daha üstün görüldü [68]. Dahası şuan bilindiği üzere arilamin *N*-asetiltransferaz (NAT2) 4-hidroksilamini asetilleyerek sitotoksik metabolit verimini önemli ölçüde etkilemekte ve bystander etkiyi kısıtladığı bilinmektedir [69]. Bu sebeple şuan CB1954'ün 2-nitro grubunun indirgenmesiyle oluşan ürün(ler) DEPT stratejileri bakımından daha etkin bystander etki göstermesi sebebiyle çok daha kıymetlidir.

İnsan denemelerindeki başarıyı etkileyen temel faktörün büyük ihtimalle CB1954'ün serumda ulaşabildiği konsantrasyonu ile *E. coli* NfsB'nin 79 μ M ile 17 mM arasında gözlenen K_M değerleri ile olan uyumsuzluktan kaynaklandığı öngörülmektedir (Tablo 4.2) [44]. *E. coli* NfsB ile çalışan birçok araştırmacı CB1954'ün hastalardaki ulaşabildiği serum konsantrasyonunun *E. coli* NfsB K_M değerinin %1'inin altında olduğu sonucunda birleşmiştir [70]. Bu sebeple CB1954'ün NfsB katalizli indirgenmesi ile oluşan aktif metabolitlerin hastalardaki etkisinin oldukça düşük olması muhtemeldir ve düşük ilaç-öncü konsantrasyonlarında CB1954'ü etkin bir şekilde dönüştürecek alternatif nitroredüktazlara yönelik çalışmalar dikkat çekici olmakla birlikte önem arz etmektedir [44].

2.3.2. CB1954 Aktive Eden Alternatif Nitroredüktazların Keşfi

E. coli NfsB'den sonra GDEPT potansiyeli taşıyan ilk bakteriyal nitroredüktaz *Bacillus amyloliquefaciens* kaynaklı YwrO'dur [71]. *B. amyloliquefaciens* YwrO'nun *E. coli* NfsB'ye göre CB1954'ü daha iyi bir substrat olarak gördüğü kinetik etkinliğinin (k_{cat}/K_M) yaklaşık 2 kat daha yüksek olmasından görülmektedir [8] (Tablo 4.2). Ancak bu kinetik etkinlik V79 Chinese hamster ovaryum hücreleri ile yapılan denemeye yansımamıştır. Saf rekombinant enzim, CB1954 ve NAD(P)H kofaktörünü içeren kültür ortamında inkübe edilen V79 Chinese hamster ovaryum hücrelerinin yarısını öldürecek CB1954 konsantrasyonu YwrO'ya göre NfsB'de >20 kat daha düşük bulunmuştur [71]. Bu iki enzim arasında dikkate değer farklılıklar NfsB'nin güçlü bir kofaktör tercihinin olmamasına rağmen ise YwrO'nun NADPH'de çok daha aktif olması ve NfsB katalizi ile hem 2- hem de 4-hidroksilamin türevi oluşurken YwrO'nun

CB1954'ün sadece 4-nitro pozisyonunu indirgemesidir (Tablo 4.2). Daha sonra yapılan bir araştırmada farklı bakteriyal kaynaklardan *E. coli* NfsB ve *B. amyloliquefaciens* YwrO homologları elde edilerek karşılaştırılmıştır [72]. Bu çalışmada özellikle 4-nitro gurubunu indirgeyen enzimlerin genellikle *E. coli* NfsB'ye kıyasla k_{cat}/K_M değeri bakımından daha üstün olsalar bile NfsB'nin altında performans gösterdikleri görüldü.

Birçok araştırmacı etkin Michaelis–Menten kinetik gösterecek nitroredüktaz arayışında bulunmuştur. Tablo 4.2'de *E. coli* NfsB ile karşılaştırmalı olarak kinetik veriler ve literatürde yer alan çoğu nitroredüktazın CB1954 indirgemesinde oluşturdukları indirgeme ürünleri verilmiştir. Ancak bu tabloda yer alan farklı çalışmalardan elde edilen farklı nitroredüktazların tüm kinetik ölçümlerin aynı metodla yapılmadığına dikkat edilmelidir. Daha çok tercih edilen yöntem aynı molar absorbansa sahip 2- ve 4-hidroksilamin son ürünlerinin 420 nm'de oluşumunun spektroskopik olarak sürekli takip edilmesidir [73]. 340 nm'de NAD(P)H tüketiminin takibi ile daha yüksek aktivite gözlenebilir. Çünkü çoğu nitroredüktazın düşük seviye de olsa NAD(P)H oksidaz aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. Bu yüzden ölçümler oksijensiz ortamda olmadıkça moleküler oksijene bazı elektron kaçakları olacaktır [44]. Literatürde yer alan diğer bir yöntem ise sürekli olmayan HPLC metodudur (discontinuous HPLC method). Bu metod ile tahmin edilen K_M değeri spektrofotometrik metoda göre oldukça (10-100 kat) düşüktür [44].

Nitroredüktazların çift substratlı oksidoredüktaz olmaları ve Ping Pong kinetik mekanizma göstermeleri farklı NAD(P)H konsantrasyonlarında CB1954 indirgeme hızını etkilemekteyken kofaktör konsantrasyonu k_{cat}/K_M oranını etkilememektedir. Tablo 4.2'de sabit kofaktör konsantrasyonunda gözlenen kinetik parametreler verilmiştir.

GDEPT için oldukça umut vaat eden nitroredüktaz ailesinden *E. coli* NsfA ve homologlarının şimdiye kadar bu kontekste çalışılmamış olması şaşırtıcı bir durumdur. *E. coli* NsfA'nın CB1954 redüktaz aktivitesi ilk olarak 2006 yılında [74] not edilse de detaylı karakterizasyonu sonraki yıllarda gerçekleştirilmiştir [75], [76]. *E. coli* NfsB'den farklı olarak NfsA, hemen hemen tüm denemelerde 2-nitro pozisyonunu indirgemekte ve kofaktör olarak NADH'e göre NADPH'i çok daha güçlü tercih etmektedir. Saf enzimin CB1954 ile aktivitesinin doğrudan karşılaştırılmasında

NfsA'nın NfsB'ye göre üstünlüğü açık şekilde görülmektedir [75], [76]. NfsA, NfsB'ye kıyasla 2,5-5 kat düşük k_{cat} değeri göstermekle birlikte 50-60 kat daha düşük K_M değerine sahiptir (Tablo 4.2). GDEPT kapsamında CB1954'ün 2-nitro pozisyonunun indirgenmesinin daha iyi bystander etki yaratmasından dolayı tercih edildiği not edilmiştir. Saf rekombinant NfsA'nın SKOV3 ovaryum kanser hücrelerinin öldürülmesinde saf rekombinant NfsB'den 20 kat daha etkili olduğu yapılan hücre kültür denemelerinden görüldü [76].

Tablo 4.2'de yer almış ve CB1954 temelli GDEPT'de umut vaat ettiği düşünülen NfsB ailesinden iki üye; *Vibrio vulnificus* NfsB ve *B. Subtilis* YfkO'nun *E. coli* NfsB'ye benzer k_{cat} ve en az 4 kat daha düşük K_M değeri gösterdiği görülmektedir. Buna karşın NfsA ailesi üyeleri NfsB'ye göre 1,5-5 kat daha düşük k_{cat} olmakla birlikte en az 40 kat daha düşük K_M değerleri göstermektedir. Yapılan değerlendirmelerde maksimum turnover hızı düşük fakat daha yüksek afiniteye sahip (yani oldukça düşük K_M) olan NfsA ailesi'nin NfsB ailesine kıyasla GDEPT için daha fazla umut veren aile olduğu söylenebilir [44]. Ancak NfsA enzimleri için potansiyel bir dezavantaj mevcuttur ki o da NfsA'ların kofaktör tercihinin NADPH yönünde olmasıdır. Çünkü hem bakteri hem de memeli hücrelerinde genellikle NADPH'ın NADH'a göre düşük konsantrasyonda olduğuna yönelik bazı kanıtlar mevcuttur [77]-[79]. İki nitroredüktaz ailesi arasındaki diğer bir farklılık ise şimdiye kadar karakterize edilmiş tüm NfsA enzimlerinin CB1954'ün sadece 2-nitro pozisyonunu indirgerken NfsB'nin 4-nitro pozisyonunu veya hem 2- hem de 4-nitro pozisyonunu indirgeyerek ürün oluşturduğu yönündedir (Tablo 4.2). 2-amino indirgeme ürünü bystander etkiyi artırmakta ve yüksek toksisiteye sahiptir [68]. Bu sebeple 2-nitro pozisyonunun indirgenmesinin GDEPT için daha çok tercih edilebileceği söylenebilir. Ancak bi fonksiyonel alkilleme özelliğindeki 4-hidroksilamin indirgeme ürününün [60] bazı kontekslerde daha etkin olabileceği düşünülmektedir.

2.3.3. Nitroredüktaz Temelli GDEPT İçin Alternatif İlaç-Öncüler

Tedavideki her bir farklı bileşenin güvenli olmasını sağlamak için gerekli düzenleyici maliyetler GDEPT'in klinik gelişimini engellemektedir. Klinik gelişmeden bağımsız olarak ilaç-öncü bileşiklerin belirli bir amaca uygun olmasına yönelik

yapılan çalışmalarla bu durum hafifletebilir. GDEPT açısından özel önem taşıyan nitroredüktazlar çok çeşitli bileşikleri kullanabilmektedir. Hipo-oksi ortamda aktive edilen ilaç-ncler bunlardan biridir [80]. Hipo-oksi, 1 mm³ ten daha byk katı tümörlerin byk çoğunda görülen anormal düşük oksijen seviyesini ifade etmektedir. Bu durum tedaviyi negatif yönde etkileyen bir etmendir [81]. Buna karşın hipooksinin sağlıklı dokularda görülmemesi hedefli kanser tedavileri için benzersiz fizyolojik bir ortam sağlamaktadır [80]. Hipooksik dokularda tip II (oksijen hassasiyeti olan) insan oksidoredktazları tarafından ilaç-nclerinin (hypoxia-activated prodrugs) aktivasyonu ile oldukça toksik forma dönüşüm gerçekleşir. Bu enzimler sadece ortamda oksijen yok ise dönüşümü sağlayabilmekte ve toksik ürünü oluşturabilmektedir [42], [82]-[84]. GDEPT'te tip I nitroredüktazların kullanımı ile bu ilaç-nclerin aerobik tümör dokularında da tedavi edici potansiyeli olabilecektir.

Dinitrobenzamid mustardlar (DNBMs), GDEPT için yeni nesil nitroaromatik ilaç-ncleri olarak hipo-oksi ortamda aktive edilen ilaç-ncler sınıfında önemli ölçüde dikkat çeken bileşiklerdir. Tip I veya tip II nitroredüktazlar tarafından katalizlenen elektron çekici nitro grubunun elektron verici hidroksilamin veya amine dönüşümü ile molekül içinde gizlenmiş olan mustard kısmın aktivasyonu sağlanır [45]. Aktive edilen azotlu mustard N7 pozisyonundaki guanidine bağlanarak akabinde DNA'nın çapraz bağlanması yol açar [85]. Aktif metabolitlerin kayda değer bir yarılanma ömrü olup oluştuğu hcrenden difüze olarak komşu hücrelerin de ölümüne sebep olur bu durum bystander etki olarak adlandırılır [86], [87].

GEPT modellerinde dinitrobenzamid mustardların CB1954 ile karşılaştırıldıklarında daha etkili oldukları söylenebilir. SN23862 5-[bis(2-kloroetil)amino]-2,4-dinitrobenzamid, CB1954'n diklor mustard analogu; şekil 3.10) hipooksisi seçiciliği gösteren ilk DNBMs bileşiğidir [88]. *E. coli* NfsB için CB1954'e kıyasla çok daha iyi bir substrattır (SN23862 için k_{cat}/K_M 10,6 mM⁻¹s⁻¹ ve CB1954 için 7,0 mM⁻¹s⁻¹) [8], [89]. Reaksiyon sonucunda oluşan DNBM metabolitlerinin doz etkisini ve bystander hücre ölümünü artırdığı görüldü [68], [90].

2.3.4. Diğer Uygulama Alanları

NAD(P)H bağımlı bakteriyal nitroredüktazlar nitroaromatiklerin biyodegradasyon ve biyoremediyasyonla bertaraf edilmesinde kullanılabilirlikleri bakımından da önem arz etmektedirler [24], [41], [91], [92]. Biyoremediyasyon, organizmaları veya enzimlerini kullanarak çevredeki kirliliklerin yok edilmesini sağlayan biyoteknolojik bir uygulamadır. Bakteriyal nitroredüktaz geni taşıyan transgenik bitkiler veya bitki ve mikroorganizmaların birlikte uygulamaları ile nitroaromatik bileşiklerin degradasyonuna yönelik çok sayıda çalışma olup yakın gelecekte etkili dekontaminasyon prosedürü olarak kullanılacağı düşünülmektedir [6], [93]-[95]. Nitroredüktazlar ayrıca önem arz eden çeşitli kimyasalların seçici bir şekilde sentezinde kullanılabilme potansiyeli de taşımaktadır [4], [5].

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Enzimler

Klonlaması ve ekspresyonu daha önce GTÜ Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilen rekombinant Ssap-NtrB ve GkNtrA nitroredüktazları literatürde belirtildiği şekilde saflaştırılıp deneylerde saf enzim kullanıldı [9], [10]. Kofaktör rejenerasyon sistemi için ise NADP⁺ bağımlı FDH kullanıldı. FDH, Dr. Ayhan ÇELİK tarafından temin edildi ve literatürde belirtildiği şekilde saflaştırılıp reaksiyonlarda saf enzim kullanıldı [96].

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar Tablo 3.1’de ve Tablo 3.2’de verildi. Şekil 3.1’de açık yapıları verilmiş potansiyel ilaç öncü bileşiklerinin ve Bölüm 3.4’te kullanılmış pro-antibiyotik bileşiğinin sentezi ve sülfometoksazolün (SMX), antibiyotik tabletlerden (ticari adı Kemoprim, İ.E. ULUGAY) saflaştırılması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Organik Kimya Bölümünde Prof. Dr. Mehmet AY ve ekibi tarafından 110T754 nolu Tübitak projesi kapsamında gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler.

Kullanılan Sarf Malzemeler	Marka ve Kodu
2,4,6-Trinitrotoluene solution	SUPELCO 47244
2,4-Dinitrotoluene	Merck 803515
2,6-Dinitrotoluene	Fluka 31565
2-Nitrotoluene, 99+%	A. Aesar A13446
3-Nitrotoluene, 99%	A. Aesar A17418
4-Nitrobenzoic acid 98%	Aldrich 461091
5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone	Aldrich 73340
96 well mikrotiterplatten	Brand 781602
Acetonitrile gradient grade	Merck 1.00030.2500

Tablo 3.1. Devam.

Kullanılan Sarf Malzemeler	Marka ve Kodu
Albumin fraction V	AppliChem A1391,0025
Ammonium formate	Riedel de Haen 25204
Ampicillin trihydrate	Mustafa Nevzat 3108127014A
Bradford reagent	Sigma B6916
CB1954	Morvus Ltd.
D(+) Glucose monohydrate	Riedel-de Haen 16301
Dimethyl sulfoxide	Merck 1.02952
Ethanol gradient grade	Merck 1.11727
Ethyl acetate	VWR 6282
FAD disodium salt hydrate, 94%	A. Aesar A14495
Formik asit	Merck K36947164
Glycine, electrophores grade	MP BIO 808822
Glycerol %99.5	VWR 24388.320
Hydrochloric acid >37 %	Sigma Aldrich 30721
Imidazol	Merck 8.14223.1000
IPTG, dioxane free	QIAGEN 129921
Lysozyme from hen egg white	Fluka 62971
Methanol for HPLC, gradient grade	Merck 1.06007.2500
Muller Hilton Agar	Biolife 4017402
NAD ⁺	Merck 1.24542.005
NADH disodium salt trihydrate	Applchem a1393
NADP ⁺ sodium salt approach 98%	Roche-10128031001
NADPH tetrasodium salt approach 98%	Roche-10107824001
Ni-resin	G-Biosciences- 786-407
Nitrofurantoin crystalline	Sigma N7878
Nutrient broth	HIMEDIA M002
p-aminobenzoic acid free acid 99+%	Sigma A9878
PD-10 column	Sigma GE17-0851-01
Peptone from caseine	Fluka 82303
Picric acid	Aldrich 239801
Potassium hexacyanoferrate(III) ≥99%	Sigma 31253
Proteinase K, from Tritirachium album	Sigma P2308
FMN sodium salt dihydrate	Sigma F6750
SN23862	Morvus Ltd.
Sodium chloride	Sigma Aldrich 31434
Sodium formate	Riedel de Haen 25210
Sodium phosphate dibasic dihydrate	Fluka-71662
Sodium sulphate	Sigma 239313
Sulphuric Acid % 95-97	Honeywell
Trizma base	Sigma T1503
Tryptone	Biosciences 131904
Yeast extract	Fluka O9182

Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Marka ve Model
+4 Buzdolabı	VESTEL
-80 Derin Dondurucu	New Brunswick Scientific, U410 Premium
FT-IR Spektrofotometresi	Perkin Elmer Spectrum 100
GC-MS	Shimadzu QP2010 Ultra
Hassas Terazî	Sartorius
Homojenizatör	IKA T25 Digital Ultra-Turrax
HPLC sistemi	Shimadzu SPD-20A prominence UV-Vis dedector DGU-20A5 prominence degasser LC-20AT prominence liquid chromatograph SIL-20AC HT prominence autosampler CTO-10AS VP column oven
İnkübatör-çalkalayıcı	New Brunswick Scientific, Excella E25
LC-MS/MS	Shimadzu LC-MS 8040
LC-MS/MS	Thermo Fisher Scientific Thermo TSQ Quantum Access Max
Magnetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3003
Mikropipet	Eppendorf
Mikroplaka Okuyucu	Molecular Devices Spectromax Plus 384
Mikrosantrifüj	Eppendorf
NMR Spektrofotometresi	Varian 500 MHz
pH metre	InoLab, WTW
Rotavapor	BUCHI, R-200
Santrifüj	Eppendorf
SDS-PAGE sistem	BIORAD
Sonikatör	Bandelin Sonopuls
UV-Vis-NIR spektrofotometre	Shimadzu, UV-3600
Vorteks	Vortex-Genie

3.2. GkNtrA'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.2.1. Enzim Üretimi ve Saflaştırılması

GkNtrA üretimi ve saflaştırılması klonlama, ekspresyon ve saflaştırma aşamalarının yer aldığı yüksek lisans tezi temel alınarak gerçekleştirildi [10]. Kısaca pET14b-Gk-Ntr vektörünü taşıyan gecelik *E. coli* BL21 DE3 kültüründen Studier oto-indüksiyon besiyerine [97] (100 µg/ml ampicilin ihtiva eden) aşılama yapılarak 16 saat süreyle 30°C'de 180 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda flasklardaki kültürler 4°C'de santrifüj edilip pellet elde edildi. Elde edilen bakteri pelleti PMSF ve lizozimden içeren bir çözeltide buz içerisinde karıştırılarak 30 dk inkübasyona bırakıldı. Yine buz içerisinde sonikasyon işlemine tabi tutulup hücrelerin parçalanması sağlandı. Açığa çıkan hücresel atıklar santrifüj ile uzaklaştırıldı. Sonikasyon sonrası yapılan santrifüjden elde edilen süpernetant Ni-afinite kolona yüklendi ve sonrasında kolondan artan imidazol gradientinde çözelti geçirilerek fraksiyonlar ayrı ayrı toplandı. Protein ekspresyonu ve saflaştırma aşamaları SDS-PAGE elektroforez ile belirlendi. Protein miktar tayini Bradford yöntemi ile belirlendi [98].

3.2.2. Nitroredüktaz Aktivite Ölçümü

GkNtrA'nın nitroredüktaz aktivite ölçümünde reaksiyon % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,5 tris/Cl tampon çözeltisi içerisinde 50 µM Nitrofurazon 100 µM NAD(P)H 45°C'de 440 nm'de nitrofurazon (NFZ) azalışının başlangıç hızının spektroskopik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirildi (NFZ için $\epsilon_{440}=880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [99]). Spesifik aktivite (U/mg), NFZ'nin 440 nm'deki başlangıç lineer değişimi (azalışı) ölçülerek 1 mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan NFZ'nin µmol miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.3. Flavin Analizi

470 µl GkNtrA (3 mg/ml), 20 µl CaCl₂ çözeltisi (100 mM) ve 20 µl proteinaz K'dan (5 mg/ml) alınıp 37°C'deki su banyosunda 30 dakika inkübe edilip buza alındı. Sonrasında 15 dakika 13500 devir/dk'de santrifüj edilip süpernatant cut off değeri 10000 Da olan vivaspin filtreden geçirildi. Filtrede üstte kalan ve altta toplanan örnekler HPLC'de analiz edilinceye kadar -15°C'de muhafaza edildi.

Flavin grubunun enzimden ekstraksiyonu ve HPLC analizi gerçekleştirildi. ACE 5 C18 (250 mm×4,6 mm, 5µm) HPLC kolonu kullanılmış, analiz HPLC'de UV dedektörle takip edildi. Metanol ve 10 mM pH 7,0 sodyum fosfat tampon çözeltisi ile gradient gerçekleştirildi. Uygulanan program ile 0-5. dakika % 10 metanol-% 90 tampon, 15-25. dakika % 50 metanol-% 50 tampon ve 28-32. dakika % 10 metanol-% 90 tampon gradienti sağlandı. Kolon akış hızı 1 ml/dk olup, analiz 30°C'de (oven temp. 30°C, autosampler 15°C, cell temp. 40°C) 375 nm ve 445 nm'de okuma yapılarak gerçekleştirildi.

3.2.4. Saf Enzimin Flavin ile Doyurulması

Enzimin saflaştırılması aşamasında Ni-NTA afinite kolondan 100 mM imidazol içeren tris tamponu (20 mM tris/Cl tampon çözeltisi (pH 7,8), 200 mM NaCl) ile alınan fraksiyon ikiye bölünerek enzimin bir kısmı PD-10 kolona yüklenmiş ve ortamdaki imidazol uzaklaştırılmış diğer kısmına ise FMN konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde dışarıdan ticari FMN ilave edilmiş ve 3 saat 4°C'de 70 devir/dk karıştırma hızında inkübe edildi. Sonrasında enzim çözeltisi PD-10 kolona yüklenip hem imidazol hem de bağlanmamış serbest FMN uzaklaştırıldı. PD-10 kolondan alınan 3,5 ml enzim 2,5 ml'ye kadar konsantre edilip tekrar PD-10 kolona yüklendi. Saf enzimin 200-600 nm arasında spektrumu alınıp flavin için 12500 M⁻¹cm⁻¹ [100] ve enzim için de aminoasit içeriğine göre hesaplanmış 20010 M⁻¹cm⁻¹ katsayıları kullanılarak flavin: protein oranı hesaplandı.

3.2.5. İyonik Şiddet

GkNtrA aktivitesine iyonik şiddet etkisini belirlemek için 10, 25 ve 50 mM tris/Cl pH 8,0 tampon çözeltileri ve 12,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM NaCl ilave edilmiş 50 mM tris/Cl pH 8,0 tampon çözeltilerinde NFZ substrat olarak kullanılarak NTR aktivitesine bakıldı. Her bir tampon çözeltide, enzim aktivitesi 0,100 mM NFZ, 9 µg/ml GkNtrA, 198 µM NADH ve % 2 DMSO kullanılarak 49°C'de belirlendi. 440 nm'de NFZ azalışının başlangıç hızının spektroskopik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirildi.

3.2.6. Optimum pH, Sıcaklık ve Isıl Kararlılık

GkNtrA'nın pH-aktivite profilini çıkarmak için NFZ kullanıldı. İyon şiddetini eşitlemek için hesaplanan miktarda NaCl ilave edilerek sabit iyon şiddetinde (23 mM) tampon çözeltiler hazırlandı. pH 7,1-9,0 aralığında Tris/Cl ve pH 8,5-10,0 aralığında ise etanolamin tampon çözeltisi kullanıldı. Ortamda % 4 DMSO bulunan her bir tampon çözeltide, enzim aktivitesi 0,150 mM NFZ, 11 µg/ml GkNtrA ve 263 µM NADH kullanılarak 50°C'de belirlendi.

GkNtrA'nın sıcaklık profili 5-70°C aralığında çeşitli sıcaklıklarda NFZ ile belirlendi. Her bir sıcaklıkta, enzim aktivitesi 0,100 mM NFZ, 15 µg/ml GkNtrA ve 221 µM NADH ve ortamda % 2 DMSO olacak şekilde 23 mM pH 8,0 sodyum fosfat tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Tipik bir reaksiyonda NFZ içeren 800 µl tampon çözelti istenilen sıcaklığa gelene kadar inkübe edildi. 50 µl enzim ilave edilip 3 dakika inkübasyondan sonra NADH ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. NFZ azalışı 440 nm'de 2 dakika boyunca spektroskopik olarak takip edildi.

Isıl kararlılık deneylerinde, 25 mM fosfat tampon (pH 8,2) çözeltideki protein örnekleri (0,4 mg/mL, 20 µL) 50, 60, 70, 75 ve 80°C'de 0-350 dk inkübe edildikten sonra buz üzerine alındı. 180 µL 25 mM fosfat tampon (pH 8,2) çözeltisi ilave edildi. Kalan enzim aktivitesine, 25 mM fosfat tampon (pH 8,2) çözeltisinde 52,5 µM NFZ, % 2 DMSO ortamında bakıldı. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılmış olup 440 nm'de substrat miktarının azalmasının başlangıç hızı takip edildi. Isı ile

muamele edilmemiş enzim örneği en yüksek etkinliği ifade edecek şekilde % 100 aktivite olarak alındı ve diğer hesaplamalar buna bağlı olarak göreceli verildi.

3.2.7. Organik Çözücü

GkNtrA aktivitesi üzerine dimetilsülfoksit (DMSO), etanol (EtOH), asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) etkisi incelendi. % 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 (v/v) oranında organik çözücü varlığında enzim aktivitesi spektroskopik olarak 600 nm'de substrat (resazurin) miktarındaki azalışın mikro plaka okuyucuda takip edilmesiyle ölçüldü. Reaksiyon 25 mM pH 8,5 tris/Cl tampon çözeltisinde 20 µM resazurin, 4,5 µg/mL GkNtrA ve 60 µM NADPH son derişimlerinde 37°C'de gerçekleştirildi.

3.2.8. Kofaktör Tercihi

GkNtrA'nın kofaktör tercihi (NADH veya NADPH) belirlenirken yapay elektron alıcısı (akseptörü) olarak $K_3[Fe(CN)_6]$ kullanıldı. Reaksiyon 25 mM pH 8,3 tris/Cl tampon çözeltisinde 0,8 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (doygun derişimi) ve 0,4 µg/mL GkNtrA (NADPH için) ve 23 µg/mL GkNtrA (NADH için) 50°C'de 2 dakika inkübe edildikten sonra çeşitli derişimlerde NAD(P)H ilavesiyle başlatıldı. Reaksiyon 340 nm'de spektroskopik olarak 2 dakika boyunca takip edildi (NAD(P)H için $\epsilon_{340}=6220 M^{-1}cm^{-1}$ [101]).

3.2.9. Kararlı-Hal (Steady-State) Kinetiği

GkNtrA'nın kararlı hal kinetiği CB1954 ve SN23862 ilaç-öncü bileşikleri, 2,4-DNT patlayıcı bileşik ve nitrofurazon, nitrofurantoin antibiyotikleri kullanılarak gerçekleştirildi.

İlaç-öncülerle gerçekleştirilen tipik bir reaksiyon, 0-1,2 mM aralığında CB1954 (veya 0-210 µM SN23862) serileri % 4 DMSO içeren 25 mM tris/Cl (pH 8,3) tampon çözeltisinde hazırlandı. Bu çözelti içerisine son derişimi 2 µg/mL olacak şekilde GkNtrA ilave edildi. Son derişimi 100 µM olacak şekilde NADPH (veya 183 µM

NADH) ilavesiyle reaksiyon başlatılıp spektroskopik olarak reaksiyon takip edildi. CB1954'ün indirgenmesi sonucu 2- ve/veya 4-hidroksilamin indirgenme ürünlerinin oluşmasının başlangıç hızı 420 nm'de takip edildi (CB1954 için $\epsilon_{420}=1200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [73]). SN23862 reaksiyonu için 340 nm'de kofaktör azalışının başlangıç hızı takip edildi.

Kirletici ve patlayıcılar grubundan 2,4-DNT'in GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonu 0-1200 μM 2,4-DNT, 7,0 $\mu\text{g/ml}$ GkNtrA, 150 μM NADPH (198 μM NADH) % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,5 tris/Cl tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. NAD(P)H ilavesiyle reaksiyon başlatılıp mikro plaka okuyucu spektrofotometre ile 42°C'de 340 nm'de kofaktör azalışının başlangıç hızı takip edildi.

Artan NFZ konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitedeki değişime askorbik asit etkisi incelemek için askorbik asit ilaveli ve ilavesiz olarak reaksiyonlar gerçekleştirilip 340 nm'de mikro plaka okuyucu spektrofotometre ile kofaktör azalışının başlangıç hızı takip edildi. Reaksiyon 0-850 μM NFZ, 6 $\mu\text{g/ml}$ GkNtrA, 1,4 mM askorbik asit ve 214 μM NADH varlığında % 8,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,2 tris/Cl tampon çözeltisinde 37°C'de gerçekleştirildi. Kofaktör hariç diğer reaksiyon bileşenleri eklenip 37°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra kofaktör ilavesiyle reaksiyon başlatılıp başlangıç hızı ölçüldü. Kontrol reaksiyonlarında askorbik asit ilave edilmedi.

Tüm kinetik ölçümler aksi belirtilmediği sürece UV-Vis spektrofotometresi (devir daim su banyosu takılı sistemde) ile 50°C'de gerçekleştirildi (Shimadzu UV-3600). Michaelis–Menten grafikleri OriginPro 9.0 software kullanılarak nonlineer fit (OriginLab, Northampton, MA) modunda çizildi.

3.2.10. Substrat Seçiciliğinin Belirlenmesi

CB1954, SN23862, 4-nitrobenzoik asit (4-NBA), nitrofurantoin (NTOIN), NFZ, 2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT), 2,4,6-trinitrofenol (pikrik asit, PA), 2-nitrotoluen (2-NT), 3-nitrotoluen (3-NT), 4-nitrotoluen (4-NT), 2,6-dinitrotoluen (2,6-DNT) ve 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) bileşikleriyle GkNtrA'nın bu bileşiklerini indirgeme potansiyeli üzerine reaksiyonlar gerçekleştirilip UV-Vis spektrofotometre, HPLC ve GC-MS ile analizler yapıldı.

3.2.10.1. Spektrum Taraması ve Kinetik Ölçümler

Spektrum taramaları 200-800 nm arasında 5 nm aralıkla 1 cm'lik kuvarz küvet kullanılarak mikro plaka okuyucu spektrofotometre cihazında yapıldı. İlk olarak 740 µl 25mM pH 8,5 tris/Cl tampon çözeltisinin spektrumu alınıp bu kör sayılarak sırayla 40 µl substrat (1 mM) eklenip spektrum taraması yapıldı, 10 µl GkNtrA (0,6 mg/ml) eklenip spektrum taraması yapıldı ve en son 10 µl NADH (12 mM) eklenerek reaksiyon başlatılıp hemen ve sonrasında belirli zaman aralıklarıyla 42°C'de spektrum alındı.

GkNtrA'nın mono, di- ve trinitrotoluenli ve nitrofenolik bileşiklere karşı spesifik aktivitesinin belirlenmesinde 50 µM substrat (TNT için 55 µM), 7,0 µg/ml GkNtrA ve 150 µM NAD(P)H varlığında % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,5 tris/Cl tampon çözeltisinde 42°C'de gerçekleştirilen reaksiyon 5 dakika süreyle takip edildi. 340 nm'de kofaktör azalışının başlangıç hızı ölçüldü. Spesifik aktivite (U/mg), NAD(P)H'in 340 nm'deki başlangıç lineer değişimi (azalışı) ölçülerek 1 mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan NAD(P)H'in µmol miktarı olarak tanımlandı.

Üç farklı sıcaklık (30°C, 37°C ve 45°C) seçilerek artan NFZ konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitedeki değişim 440 nm'de 96 kuyucuklu plakalarda mikro plaka okuyucu spektrofotometre ile NFZ indirgenmesinin başlangıç hızı takip edildi. Aynı örneklere 13 ve 30 dk sonra ACN ilavesi yapılarak reaksiyon durduruldu ve HPLC analizleri gerçekleştirildi. Bu deneyde hem sıcaklık hem NFZ konsantrasyonu hem de sürenin substrat azalışı ve ürün oluşumuna etkisi çalışıldı. Reaksiyon 0-3400 µM NFZ (0-0,8 µmol NFZ), 6 µg/ml GkNtrA ve 1090 µM NADH (0,22 µmol NADH) varlığında % 8,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,2 tris/Cl tampon çözeltisinde gerçekleştirildi.

3.2.10.2. Zamana Karşı Metabolit Profilindeki Değişimin İncelenmesi

CB1954 ve SN23862 ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda substratlar, % 2,5 DMSO içeren ortamda final konsantrasyonları 50 µM (SN23862 için 25 µM) olacak şekilde 25 mM Tris-Cl (pH 8,3) tampon çözeltisinde hazırlandı ve filtre edildikten

sonra çözeltilerden 10 dakika argon gazı geçirildi. Reaksiyonlar anaerobik ortamda gerçekleştirildi. Bunu sağlamak için de reaksiyon ortamından devamlı olarak argon gazı geçirildi. GkNtrA ve NADPH final konsantrasyonları da sırasıyla 45 µg/ml ve 112 µM'dır. Reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilip en az 45 dakika devam ettirildi ve belirli zaman aralıklarında örnekler alındı ve HPLC analizleri yapıldı.

4-NBA'in enzimatik indirgenmesi reaksiyonu zamana karşı takip edilerek 0, 10, 30, 60, 120, 180, 190, 240 ve 1560. dakikada örnek alınıp HPLC analizi yapıldı. Reaksiyon 45°C'deki su banyosunda % 0,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamındaki bileşenlerin final konsantrasyonları; 50 µM 4-NBA, 0,6 µg/ml GkNtrA ve 110 µM NADH'dir. Kontrolde enzim hariç diğer bileşenler reaksiyondaki konsantrasyonunda hazırlanıp 45°C'de 1560 dk inkübe edildi. 180 dakikadaki örnek alındıktan sonra tekrar NADH ilave edildi (finalde 110 µM NADH olacak şekilde).

NTOIN'nin de enzimatik indirgenme reaksiyonu zamana karşı takip edilerek 0, 1, 3, 6, 12, 24, 54, 76 ve 116. dakikada örnek alınıp HPLC analizi yapıldı. Reaksiyon 45°C'deki su banyosunda % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamındaki bileşenlerin final konsantrasyonları; 50 µM NTOIN, 0,52 µg/ml (5,2 µg/ml) GkNtrA ve 200 µM NADH'dir. Kontrolde enzim hariç diğer bileşenler reaksiyondaki konsantrasyonunda hazırlanıp 45°C'de 146 dk inkübe edildi.

2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonunda 50 µl 2,4-DNT (220 mM, 40,1 mg/ml), 950 µl DMSO, 600 µl NADH (40 mg/ml) eklenip hacim 18,8 ml'ye 25 mM pH 8,5 tris/Cl tampon çözeltisi ile tamamlandı. Substratın tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra 50 µl örnek 50 µl metanol içerisine alındı (örnek TSK), sonrasında 200 µl GkNtrA (0,6 mg/ml) ile reaksiyon başlatıldı. Enzim eklenir eklenmez 50µl örnek 50 µl metanol içerisine alındı (örnek rxn 10 s). 44°C'de gerçekleştirilen reaksiyonda 10. dakikada ve 60. dakikada yine 50 şer µl örnek 50 µl metanol içerisine alındı (örnekler sırasıyla rxn 10 dk ve rxn 60 dk). 1 saatlik reaksiyonun kalan hacmine 20 ml etil asetat eklenerek reaksiyon sonlandırılıp ekstraksiyon işlemi başlatıldı. Ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrarlanıp her seferinde üst fazlar alınarak ayrı bir tüpte birleştirildi. Ekstraktın hacmi ~10 ml'ye kadar rotada

(63°C) indirilip buradan ~200 µl örnek alınıp üzerine susuz sodyum sülfat eklenerek pamuk yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirilip GC-MS analizi yapıldı.

HPLC analizleri için gerçekleştirilen reaksiyonların sonlandırılması için 1:1 (v/v) soğuk ACN veya MeOH eklendi. 1,5 saat 76°C'de inkübasyondan sonra 13500 devir/dk hızda 10 dk santrifüj edilip süpernetantların HPLC analizleri yapıldı.

3.2.10.3. İkili Enzim Sistemi ile Nitroaromatik Bileşiklerin İndirgenmesi

2-NT, 3-NT, 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, TNT, PA, 4-NBA, NTOIN, NFZ, CB1954 ve SN23862 substratlarının GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunda kofaktör rejenerasyonunu sağlamak amacıyla yardımcı enzim olarak FDH kullanıldı. Tampon (280 µl 35 mM pH 8,5 Tris/Cl), substrat (20 µl, 2 mM), FDH (20 µl, 0,42 mg/ml), amonyum format (20 µl, 1 M), NADP⁺ (20 µl, 2 mM), NADPH (20 µl, 0,2 mM) ilave edildikten sonra örnek alındı. Kontrolde GkNtrA hariç diğer bileşenler mevcuttur. En son GkNtrA ilavesiyle reaksiyon başlatılıp 37°C'de 30 dakika reaksiyon devam ettirildi. 30 dk sonra 1:1 hacim ACN ilavesiyle reaksiyon sonlandırılıp buza alındı. Reaksiyonlar HPLC'de analiz edilene kadar -76°C'de muhafaza edildi.

3.2.11. Metabolit Karakterizasyonu

3.2.11.1. HPLC Analizleri

Analizler koruyucu kolon (30 mm x 4,6 mm, 3 µm) takılı C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, ACE-HPLC, UK) kolonda gerçekleştirildi. Nitrotoluenli bileşiklerin reaksiyon ürünleri için ayarlanan programda mobil faz metanol-su kullanıldı. Nitrotoluenli bileşikler için metanol (% 45 v/v)-su (% 55 v/v) mobil fazı izokritik akışta 1 ml/dk kolon akışına ayarlanıp ölçümler 230 ve 340 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Toplam analiz süresi 30 dk'dır.

NFZ ve NTOIN'in reaksiyon ürünleri için 0-5 dk % 5 ACN v/v, 15-20 dk % 15 ACN v/v ve 23-28 dk % 5 ACN v/v gradient metodu uygulandı. Akış hızı 1,5 ml/dk olarak ayarlanıp 300 ve 340 nm'de analiz yapıldı. Toplam analiz süresi 28 dk'dır.

Pikrik asit için mobil faz olarak % 0,1 formik asit içeren metanol-su karışımı kullanıldı. Pikrik asit için uygulanan gradient 0-4 dk % 20 MeOH v/v, 15-25 dk % 70 MeOH v/v ve 30-35 dk % 20 MeOH v/v program ayarlandı. 1 ml/dk akış hızında 254 ve 280 nm’de analiz yapıldı. Toplam analiz süresi 35 dk’dır.

4-NBA ve reaksiyon ürünleri için ayarlanan programda mobil faz ACN ve % 0,1 formik asit içeren su kullanıldı. 0-3 dk % 5 ACN v/v, 10. dakikada % 15 ACN v/v ve 15. dakikada % 30 ACN’ye ulaşıp 15-20 dk % 30 ACN v/v, 23-30 dk, % 5 ACN v/v program ayarlandı. 1 ml/dk akış hızında 280 ve 340 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Toplam analiz süresi 30 dk’dır.

CB1954 reaksiyon ürünleri için uygulanan gradient metod; 0-5 dk % 10 ACN v/v, 20-25 dk % 30 ACN ve 30-35 dk % 10 ACN v/v olup 1 ml/dk akış hızında 260 ve 350 nm’de analiz yapıldı. Toplam analiz süresi 35 dk’dır.

SN23862 reaksiyon ürünleri için uygulanan gradient metod; 0-5 dk % 10 ACN v/v, 20-30 dk % 60 ACN ve 35-40 dk % 10 ACN v/v olup 1 ml/dk akış hızında 390 ve 450 nm’de analiz yapıldı. Toplam analiz süresi 40 dk’dır.

3.2.11.2. GC-MS Analizleri

Analizler MS kolonunda (Rxi®-5ms Crosbond® 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane 30 meter, 0,25 mmID 0,25 µm df (max prog. Temp 350°C)) gerçekleştirildi. Kolon fırın sıcaklığı 90°C, enjeksiyon sıcaklığı 250°C enjeksiyon modu split ve split oranı -1 olarak ayarlandı. Kullanılan GC programı; 90°C’de 2 dk ile başlamakta ve sonrasında 10°C/dk hızla 280°C’ye çıkmakta ve bu sıcaklıkta 5 dakika süreyle durulması şeklindedir. MS programında iyon kaynağı sıcaklığı 200°C ve arayüz (interface) sıcaklığı 210°C olarak ayarlandı. MS dedektörü 2-25 dk ve 50-550 m/z aralığında scan mod ile data toplaması için ayarlandı.

3.2.12. Modelleme Çalışmaları

Çoklu dizi analizleri BioEdit programında CLUSTRAL W metodu ile oluşturuldu [102]. GkNtrA’nın sekonder yapısı, kristal yapısı belirlenmiş ve GkNtrA ile % 71 gibi

yüksek bir benzerliğe sahip NfrA1 (PDB kodu 5HDJ) model alınarak ESPript web tabanlı program kullanılarak çizildi [103]. Filogenetik ağaç oluşturulması için ise MEGA 6 programı kullanılıp Neighbor-Joining (NJ) metodu ile filogenetik ağaç oluşturuldu [104]. GkNtrA'nın yapısı hakkında daha çok bilgi elde edebilmek adına SWISS-MODEL Workspace web tabanlı software kullanılarak protein yapı homoloji modeli oluşturuldu. SWISS-MODEL şablon kütüphanesinden (SMTL version 2016-05-18, PDB release 2016-05-13) Blast [105] ve HHBlit [106] yoluyla GkNtrA aminoasit dizisi (target sequence) taratılarak benzer yapıya sahip şablon proteinler belirlendi. Bu şekilde bulunan 153 şablon GkNtrA'ya benzerlik yönünden sıralanmış olup 1. sıradaki protein NfrA1 (PDB kodu 5HDJ) [107] ile GkNtrA dizileri temel alınarak ProMod Version 3.70 kullanılarak model oluşturuldu.

3.3. Alternatif İlaç-Öncü Araştırması

3.3.1. Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin NTR (Ssap-NtrB ve GkNtrA) Katalizli İndirgeme Reaksiyonları

Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonlar 21°C'de 25 mM pH 7,5 tris/Cl tampon çözeltisinde ve GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonlar 45°C'de 25 mM pH 8,5 tris/Cl tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Reaksiyonları sonlandırmak için 1:1 hacim soğuk ACN eklendi. Örnekler analiz edilinceye kadar -76°C'de muhafaza edildi.

3.3.1.1. HPLC Analizleri İçin Gerçekleştirilen Reaksiyonlar

Potansiyel ilaç-öncülere karşı nitroredüktazların (Ssap-NtrB ve GkNtrA) aktivitelerinin olup olmadığı HPLC analizi ile araştırıldı. Bir substratın taranması işleminde altı ayrı HPLC analizi gerçekleştirildi. Bunlar; (1) Sadece substrat, (2) Ssap-NtrB ile enzimatik reaksiyon (3) GkNtrA ile enzimatik reaksiyon, (4) Ssap-NtrB için kofaktörün olmadığı durum (kontrol; tampon-substrat-enzim, kısaca (TSE), (5) GkNtrA için kofaktörün olmadığı durum (kontrol, TSE) ve (6) enzimin olmadığı durum (kontrol; tampon-substrat-kofaktör, kısaca (TSK)). Reaksiyon bileşenlerinin

konsantrasyonları hem reaksiyon ve hem de kontrollerde aynı olacak şekilde ayarlandı.

2c, 8a, 8b, 8c, 10 ve 14 kodlu bileşiklerinin Ssap-NtrB ile reaksiyonunda Ssap-NtrB miktarı 14 kodlu bileşik için 7,8 µg/ml; 8a, 8b, 8c, 10 kodlu bileşikler için ise 32,6 µg/ml olacak şekilde kullanıldı. Kullanılan substratların konsantrasyonu 158 µM ve NADH 289 µM şekilde olup, reaksiyon % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 13 dakika (8b ile gerçekleştirilen reaksiyon 25 dakika) sonra reaksiyon sonlandırıldı.

2a, 2d, 2e, 2i, 6 ve 9 kodlu bileşiklerin Ssap-NtrB ile reaksiyonu, 13 µg/ml Ssap-NtrB, 150 µM substrat, 298 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 5 dakika reaksiyon sonlandırıldı.

2b, 2b', 2f, 3a, 3d, 7a, 19, 2b (tekrar sentez), 3b, 3c, 3i, 3i', 11a, 12c, 3g, 2i (tekrar sentez), 3f ve 2g numaralı bileşiklerin Ssap-NtrB ile reaksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. Reaksiyon 150 µM substrat, 636 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. 2b, 2b', 2f, 3a, 3d, 7a, 19 bileşikleri için 13 µg/ml Ssap-NtrB alınmış ve reaksiyon süresi 15 dakikadır. 2b (tekrar sentez), 3b, 3c, 3i, 3i', 11a, 12c, 3g, 2i, 3f ve 2g bileşikleri için 30 µg/ml Ssap-NtrB alınmış reaksiyon süresi 10 dakikadır. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp belirtilen süre sonunda reaksiyon sonlandırıldı.

3e, 8c (tekrar sentez), 11b, 12a, 16, 17, 18, 25d, 25e, 25f ve 26' kodlu bileşiklerin Ssap-NtrB ile reaksiyonu, 37 µg/ml Ssap-NtrB, 100 µM substrat, 429 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 10 dakika sonra reaksiyon sonlandırıldı.

2k, 2j, 8f, 13a, 15, 3g (tekrar sentez), 3j, 3k, 25 cm, 25h, 9 (tekrar sentez), 19 (tekrar sentez), 24e, 26", pikrilamin ve 25i kodlu bileşiklerin Ssap-NtrB ile reaksiyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. 44 µg/ml Ssap-NtrB, 111 µM substrat, 444 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 10 dakika sonra reaksiyon sonlandırıldı.

2c, 8a, 8b, 8c, 10 ve 14 kodlu bileşiklerinin GkNtrA ile reaksiyonu; 6 µg/ml GkNtrA, 150 µM substrat, 268 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde

gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 5 dakika sonra (8b ile gerçekleştirilen reaksiyon 10 dakika) sonra reaksiyon sonlandırıldı.

2a, 2d, 2e, 2i, 6 ve 9 kodlu bileşiklerin GkNtrA ile reaksiyonu; 12 µg/ml GkNtrA, 150 µM substrat, 298 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 5 dakika (8b ile gerçekleştirilen reaksiyon 10 dakika) sonra reaksiyon sonlandırıldı.

2b', 2f, 3a, 3d, 7a, 19, 2b (tekrar sentez), 3b, 3c, 3i, 3i', 11a, 12c, 3g, 2i, 3f ve 2g kodlu bileşiklerin için GkNtrA ile indirgenmesi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. 150 µM substrat, 636 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. 2b, 2b', 2f, 3a, 3d, 7a, 19 bileşikleri için 12 µg/ml GkNtrA alınmış ve reaksiyon süresi 15 dakikadır. 2b (tekrar sentez), 3b, 3c, 3i, 3i', 11a, 12c, 3g, 2i, 3f ve 2g bileşikleri için 15 µg/ml GkNtrA alınıp reaksiyon süresi 10 dakikadır. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp belirtilen süre sonunda reaksiyon sonlandırıldı.

3e, 8c (tekrar sentez), 11b, 12a, 16, 17, 18, 25d, 25e, 25f ve 26' kodlu bileşiklerin GkNtrA ile reaksiyonu, 23 µg/ml GkNtrA, 100 µM substrat, 429 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 10 dakika sonra reaksiyon sonlandırıldı.

2k, 2j, 8f, 13a, 15, 3g (tekrar sentez), 3j, 3k, 25 cm, 25h, 9 (tekrar sentez), 19 (tekrar sentez), 24e, 26'', pikrilamin ve 25i bileşiklerin GkNtrA ile indirgenmesi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. 40 µg/ml GkNtrA, 111 µM substrat, 444 µM NADH ve ortamda % 5 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 10 dakika sonra reaksiyon sonlandırıldı.

3.3.1.2. LC-MS/MS Analizleri İçin Gerçekleştirilen Reaksiyonlar

8a, 8b ve 10 numaralı substratlar DMSO'da çözülerek 3 mM ana çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon ortamındaki her bir reaktifin son derişimleri 150 µM substrat, 580 µM NADH, % 5 DMSO olacak şekildedir. Reaksiyon başlatılmadan önce 100 µL örnek alınıp (reaksiyon öncesi (TSK)), 39 µg/mL Ssap-NtrB (veya 44 µg/mL GkNtrA) eklenerek reaksiyon başlatıldı. 10 dakika sonrasında reaksiyon ve reaksiyon öncesine 1:1 hacim soğutulmuş asetonitril ilave edilip 4000 devir/dk'de 10 dakika santrifüj edilip çözelti (süpernatant) temiz mikrotüpe alındı.

Substratlar (3a, 3b, 3c, 3d, 3f, 3i, 3i', 2b (yeni sentez), 2b', 2c, 2d, 2e, 2g, 2i, 7a, 11a, 12c, 14) DMSO'da çözdürülerek 2 mM stok çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon ortamına final konsantrasyonları 100 µM substrat, 398 µM NADH, % 5 DMSO (3c ve 3d ile reaksiyonlarda %10 DMSO) olacak şekilde ekleme yapıp 100 µl örnek alındı (reaksiyon öncesi (TSK)) ve 50 µg/ml Ssap-NtrB (veya 45 µg/ml GkNtrA) eklenerek reaksiyon başlatıldı. 3 serisi için 6 dk ve diğer substratlarla gerçekleştirilen reaksiyonlar için de 10 dk sonrasında reaksiyon ve reaksiyon öncesine 1:1 hacim soğutulmuş asetonitril ilave edilip buz üzerine alındı.

Substratlar (8c, 2f, 3e, 11b, 12a, 16, 17, 18, 25d, 25e, 25f, 26') DMSO'da çözdürülerek 2 mM stok çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon ortamına final konsantrasyonları 100 µM substrat, 429 µM NADH, % 5 DMSO ve 37 µg/ml Ssap-NtrB (veya 23 µg/ml GkNtrA) olacak şekilde ekleme yapılarak reaksiyon başlatıldı. 10 dakika sonrasında reaksiyona ve reaksiyon öncesine (TSE) 1:1 hacim soğutulmuş asetonitril ilave edilip buz üzerine alındı.

3.3.2. Zamana Karşı Metabolit Profilindeki Değişimin İncelenmesi

Ssap-NtrB aracılı gerçekleştirilen 14 nolu bileşiğin indirgenmesi reaksiyonu, 9,3 µg/mL Ssap-NtrB, 300 µM 14 nolu substrat, 923 µM NADH ve ortamda % 1,6 metanol olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 5, 10, 20 ve 30. dakikada örnek alındı.

GkNtrA ile gerçekleştirilen 14 nolu bileşiğin indirgenmesi reaksiyonu 11,2 µg/mL GkNtrA, 300 µM 14 nolu substrat, 905 µM NADH ve ortamda % 1,6 metanol olacak şekilde gerçekleştirildi. En son kofaktör ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılıp 5, 10, 20 ve 30. dakikada örnek alındı.

3.3.3. İkili Enzim Sistemi ile Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin İndirgenmesi

Ssap-NtrB aracılı 8b'nin redüksiyonu reaksiyonu, 25 µM 8b, 0,1 mg/ml BSA, 0,2 M amonyum format, 24 µg/ml FDH, 24 µg/ml Ssap-NtrB, 500 µM NADP⁺, 50 µM NADPH ve % 20 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi.

Ssap-NtrB katalizli 8c'nin indirgenmesi reaksiyonu aşağıda yazan final konsantrasyonunda gerçekleştirildi. 70 μ M 8c, 0,1 mg/ml BSA, 0,2 M amonyum format, 6,4 μ g/ml FDH, 0,4 μ g/ml Ssap-NtrB, 1000 μ M NADP⁺, 101 μ M NADPH ve %20 DMSO olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.3.4. Metabolit Karakterizasyonu

3.3.4.1. HPLC Analizleri

Örneklerin HPLC analizi öncesinde ön işlem uygulandı. -76°C'de en az 1,5 saat inkübe edilen örnekler 13500 devir/dk'de 15 dakika santrifüj edildi. Karışımın 20 μ l'si koruyucu kolon takılı (30 mm×4,6 mm, 3 μ m) ACE 5 C18 kolona (250 mm×4,6 mm, 5 μ m) enjekte edildi ve 1 mL/dk kolon akış hızı sağlandı. 0-5 dk % 20 ACN-% 80 HPLC sınıf su, 15-22 dk % 80 ACN-% 20 HPLC sınıf su, 27-32 dk % 20 ACN-% 80 HPLC sınıf su değişken akışını sağlayacak program uygulanıp reaksiyon ürünlerinin takibi 254 ve 350 nm'de yapıldı.

3.3.4.2. LC-MS/MS Analizleri

Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli reaksiyon ve kontrollerinin 5 μ l'si kolonsuz olarak doğrudan LC-MS cihazına gönderilip analiz edildi. 'quick scan' modu ile negatif ve pozitif modda 100-500 m/z aralığında tarama yapıldı. Sadece 8a ve 8b ile gerçekleştirilen çalışmalarda örnekler HPLC kolona (Inertsil® ODS-4, 3 μ m 4,6x150 mm) yüklenip substrat ve ürünlerin ayrılması sağlandı. Q3 scan ile negatif ve pozitif modda kütle taraması yapıp ana iyonlar belirlenip o kütleler için 70-350 m/z aralığında ürün iyon (product ion) taraması yapıldı. HPLC metodu olarak 0-5 dk % 30 ACN v/v, 25-35 dk % 90 ACN v/v, 40-42 dk % 30 ACN v/v artışı (gradienti) uygulanıp kolon akış hızı 0,5 mL/dk'dir. Diğer substratlar ile gerçekleştirilen analizlerde kolon kullanılmamış (analiz süresini kısaltmak amacıyla) olup Q3 scan ile negatif ve pozitif modda kütle taraması yapıp ana iyonlar belirlenip o kütleler için 70-350 m/z aralığında ürün iyon (product ion) taraması gerçekleştirildi.

3.3.5. Kararlı-Hal (Steady-State) Kinetiği

2b (yeni), 2b', 2e, 2i, 3a, 3b, 3c, 3d, 3f, 3i, 3i', 7a, 8a, 8b, 8c, 10, 11a, 12c ve 14 bileşiklerinin Ssap-NtrB ve GkNtrA ile reaksiyonun başlangıç hızları ölçülerek kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Substratlar % 20 DMSO içeren 25 mM pH 7,5-8,5 tris/Cl tampon çözeltisinde hazırlanmış (2e % 40 DMSO'da, 2b' % 60 DMSO'da hazırlandı) olup DMSO'nun reaksiyon ortamındaki son derişimi % 5'tir. Ancak bu değer 2e için gerçekleştirilen reaksiyonlarda % 10 ve 2b' için ise % 15'tir. Tipik bir reaksiyonda, 0-800 μ M arasında değişen substrat derişiminde, 0,4-31 μ g/mL Ssap-NtrB (veya GkNtrA) ve 200 μ M NADPH varlığında 25 mM tris tampon çözeltisinde (Ssap-NtrB için pH 7,5 ve GkNtrA için pH 8,5) gerçekleştirildi. Ssap-NtrB katalizli reaksiyonlar 20-23°C'de ve GkNtrA katalizli reaksiyonlar ise 43°C'de gerçekleştirildi. 3i, 3i', 10 ve 3d substratları ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sırasıyla 420, 420, 450 ve 410 nm'lerde takip edildi. 410, 420 ve 450 nm'lerde substrat azalışı ve substrat veya üründen herhangi birinin belirli bir dalga boyunda soğurma vermediği reaksiyonlarda da 340 nm'de kofaktör azalışının başlangıç hızı mikro plaka okutucu spektrofotometre ile takip edildi. (NAD(P)H için $\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [101], 3i için $\epsilon_{420}=0,0093 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 3i' için $\epsilon_{420}=0,0079 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 3d için $\epsilon_{410}=0,0109 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ve 10 nolu bileşik için $\epsilon_{450}=0,0152 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Michaelis–Menten grafikleri OriginPro 9.0 software kullanılarak nonlineer fit kullanılarak çizildi. Spesifik aktivite (U/mg), belirtilen deneysel şartlar altında 1 mg enzimin 1 dakikada dönüşüme uğrattığı substratın μ mol miktarı olarak tanımlandı.

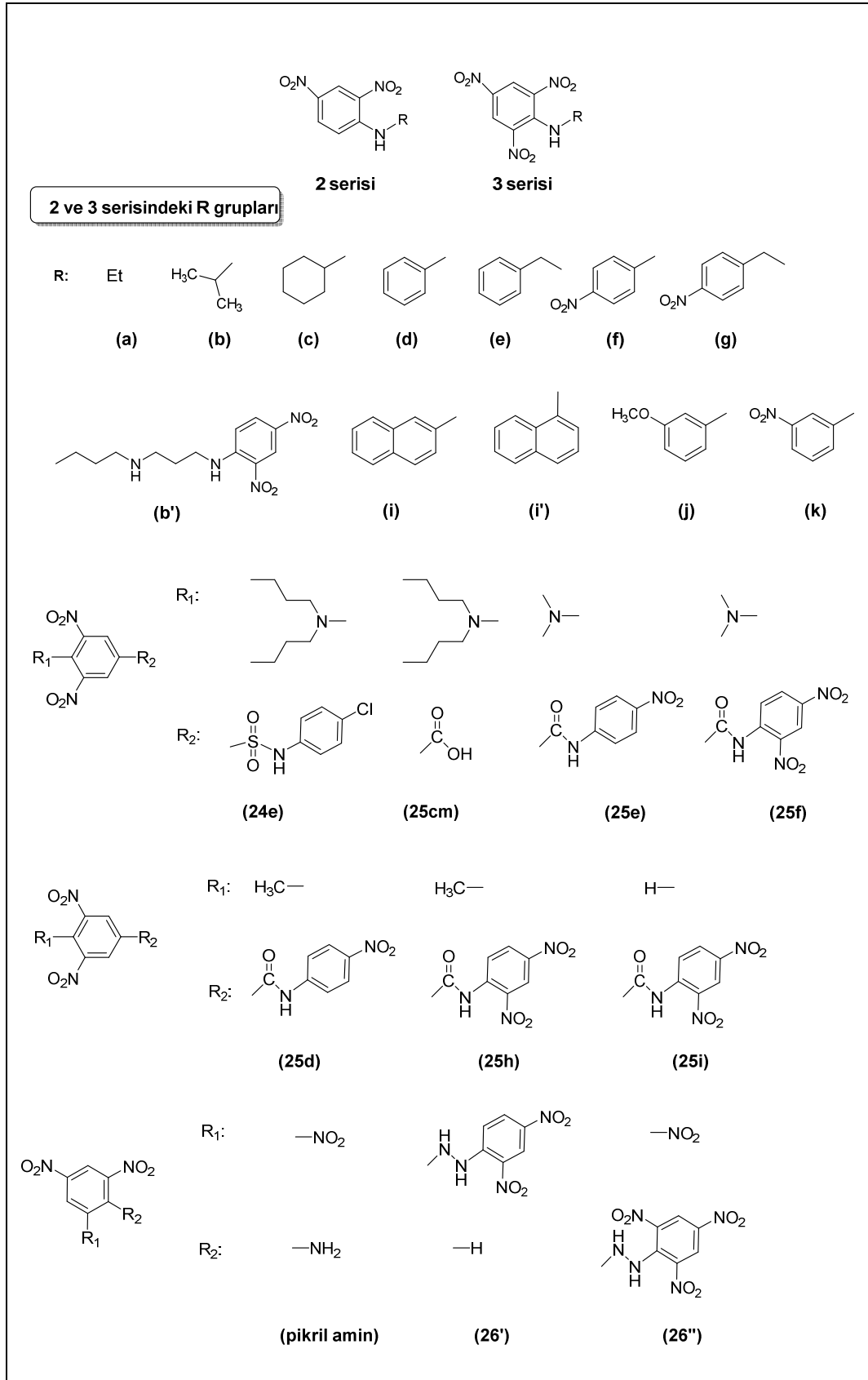
3.3.6. Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksisite çalışmaları Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Dr. Esra TOKAY tarafından 113Z706 nolu Tübitak projesi kapsamında gerçekleştirildi.

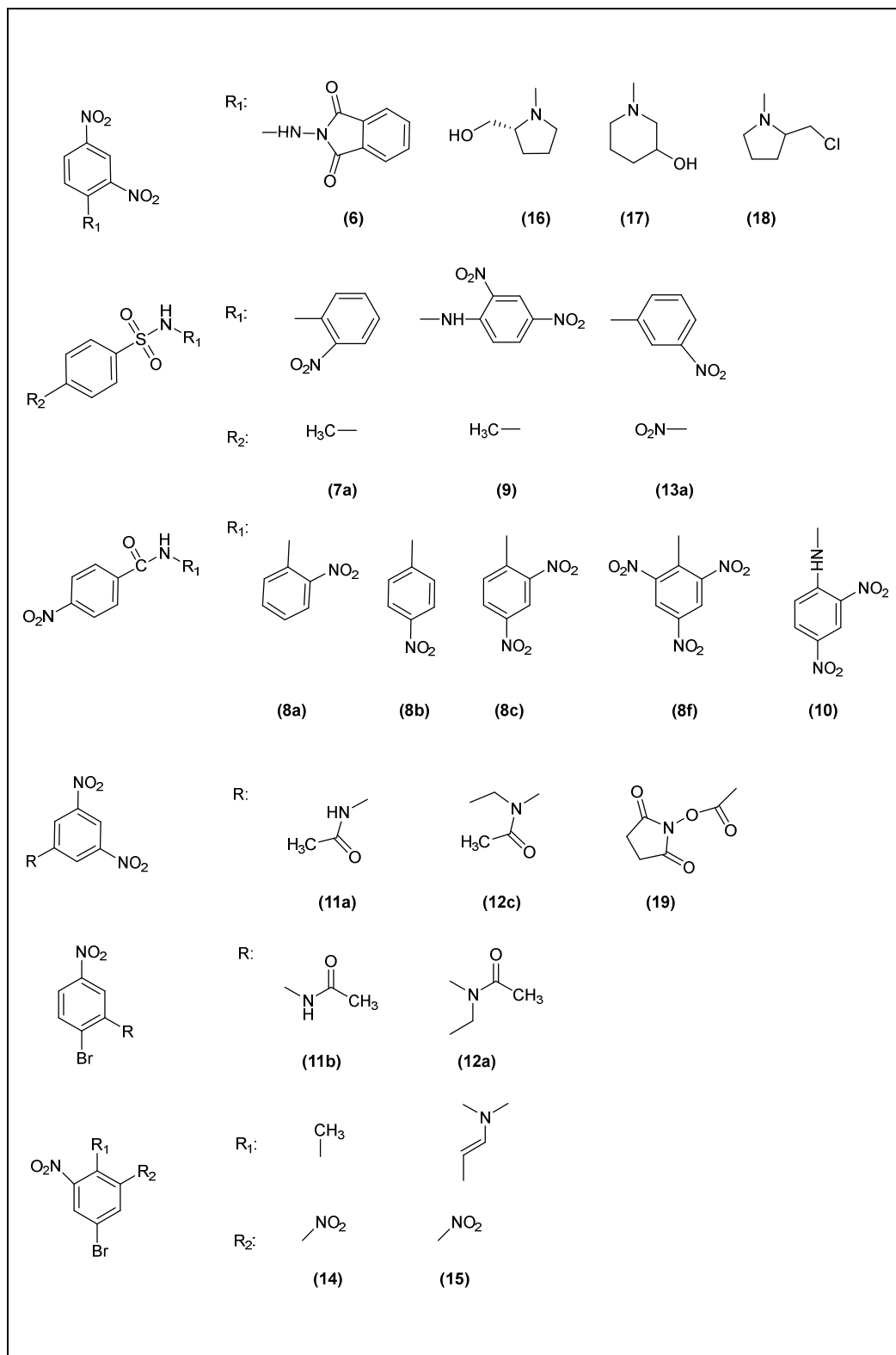
NTR (Ssap-NtrB ve GkNtrA) katalizli indirgenme reaksiyonlarının HPLC analiz sonuçlarına göre belirlenen 40 bileşiğin sitotoksik aktivite çalışmaları MTT (2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl bromid) metodu kullanılarak Hep3B hücreleri

(insan karaciğer kanser hücre hattı) üzerine gerçekleştirildi. Sitotoksosite çalışmalarında maddelere ait 5 farklı konsantrasyon hücrelere uygulanıp 24 ve 48 saat zaman dilimlerindeki etkileri araştırıldı. Aynı zamanda bu 40 bileşik içerisindeki 15 bileşik için HT-29 (insan kolon kanser hücre hattı) ve HUVEC (insan endometriyum göbek kordon endotelyal hücre hattı) hücreleri üzerine sitotoksosite çalışmaları yapıldı. Potansiyel ilaç-öncülerin son konsantrasyonu 150 μ M, 75 μ M, 37,5, 18,8 μ M, 9,4 μ M ve 0 μ M (sadece DMSO) olacak şekilde 96 kuyulu plakalara paylaştırılmış olan hücreler üzerine uygulandı (substratlar DMSO'da çözündürüldü). Madde uygulanmış olan hücreler 24 ve 48 saat boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra MTT protokolüne [108] göre en son 550 nm dalga boyunda ölçüm alındı.

Ayrıca potansiyel ilaç-öncülerin hücre dışı Ssap-NtrB katalizli reaksiyon deneyleri gerçekleştirildi. Hücre dışı oluşturulan reaksiyon sonucu oluşan metabolitlerin toksisitesi Hep3B, HUVEC ve PC3 (insan prostat kanser hücre hattı) hücreleri üzerine araştırıldı. Oluşan metabolitlerin sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi yerine NADH bağımsız yöntem olan Sulforhodamine B (SRB) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. MTT tekniği NADH bağımlı olduğu için reaksiyon deneylerinde ortama ilave edilen NADH kofaktörü sonuçlarda sorun teşkil ettiğinden SRB deneyi MTT'ye alternatif olarak denendi. Final konsantrasyonları 150 μ M substrat, 31 μ g/ml Ssap-NtrB ve 600 μ M NADH olacak şekilde 25 mM pH 7,5 tris/Cl tampon çözeltisinde 10 dk (CB1954 için 30 dakika) süre ile gerçekleştirilen reaksiyondan 100 μ L 96 kuyulu plakalara paylaştırılmış olan hücreler üzerine eklendi. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra SRB protokolüne [109] göre işlemler devam edip en son 492 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Reaksiyon denemelerinde CB1954'te yer aldı ve potansiyel ilaç-öncülerden elde edilen sonuçlarla CB1954 sonuçları karşılaştırıldı. Hücre sayısı çalışılan hücreye göre değişmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda Hep3B hücreleri için 30.000 hücre sayısı yeterli olurken, HUVEC ve HT-29 hücreleri 10.000 hücre sayısı ile optimize edildi.



Şekil 3.1: Tez çalışması kapsamında kanser terapilerinde kullanılma potansiyeli araştırılan ilaç-öncü bileşikleri ve açık yapıları.



Şekil 3.1: Devam.

3.4. Nitroredüktaz Kullanılarak Pro-Antibiyotik Aktivasyonu

3.4.1. Spektrum Taraması ve Kararlı-Hal (Steady-State) Kinetiği

Spektrum taramaları 200-600 nm arasında 5 nm aralıkla 1 cm'lik kuvarz küvet kullanılarak spektrofotometrede yapıldı. İlk olarak 565 µl 25 mM pH 7,5 tris/Cl tampon çözeltinin spektrumu alınıp bu kör sayılarak sırayla 200 µl NO₂-SMX (3) (200 µM, %20 DMSO da hazırlandı) eklenip spektrum taraması yapıldı, 5 µl SsapNtrB (1,6 mg/ml) eklenip spektrum taraması yapıldı ve en son 30 µl NADH (5,5 mM) eklenerek reaksiyon başlatılıp hemen ve sonrasında belirli zaman aralıklarıyla 24°C'de spektrum alındı.

Pro-antibiyotik olan NO₂-SMX'ün Ssap-NtrB katalizli indirgenmesi reaksiyonunun başlangıç hızı ölçülerek kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Tipik bir reaksiyonda, 0-500 µM arasında değişen NO₂-SMX derişiminde, 8 µg/ml Ssap-NtrB ve 275 µM NADH varlığında 25 mM pH 7,5 tris tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Spektrum taramasında substrat ve ürünün takibini sağlayacak absorbans değişimi gözlenemediğinden reaksiyonda 340 nm'de kofaktör azalışı takip edildi. Michaelis-Menten grafiği OriginPro 9 software kullanılarak nonlineer fit (OriginLab, Northampton, MA) kullanılarak çizildi. Spesifik aktivite (U/mg), belirtilen deneysel şartlar altında NADH'in 340 nm'deki başlangıç lineer değişimi (azalışı) ölçülerek 1 mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan NADH'in µmol miktarı olarak tanımlandı ($\epsilon_{340}=6,220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [101]).

3.4.2. NO₂-SMX'ün Ssap-NtrB/FDH İkili Enzim Sistemi Katalizli Reaksiyonu

10,79 mg NO₂-SMX 1 ml DMSO içerisinde çözündürüldü. Sırasıyla pH 7,5 tris/Cl tampon çözeltisi (15,5 ml, 25 mM), BSA (0,2 ml, 10 mg/ml), sodyum format (1 ml, 4 M), FDH (1 ml, 0,2 mg/ml), NADP⁺ (0,15 ml, 100 mM), NADPH (0,15 ml, 10 mM) ilave edildi. En son Ssap-NtrB (1ml, 0,8 mg/ml) eklemesiyle reaksiyon başlatıldı. 22°C'de su banyosunda 20 devir/dk karıştırma hızında reaksiyon gerçekleştirildi. 20 saat 30 dakika sonunda reaksiyon karışımı -76°C'ye kaldırıldı.

Reaksiyon ürününün liyofilize edilmesi için 50 ml'lik falkon tüp içerisindeki 20 ml hacminde reaksiyon karışımı önce sıvı azotta donduruldu. Liyofilizatöre konan tüp içerisindeki hacmin 26 saat sonunda daha fazla azalmadığı ve sabit kaldığı gözlemlendi ve liyofilizasyon işlemi sonlandırıldı. Yaklaşık 2 ml hacimde viskoz sarı renkli karışım elde edildi. Daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

3.4.3. Analitik Metodlar

3.4.3.1. HPLC Analizleri

NO₂-SMX'ün enzimatik olarak indirgenip ürün oluşup oluşmadığını gözlemlemek için HPLC analizleri gerçekleştirildi. Örnekler HPLC analizi öncesinde ön işlem uygulandı. -76°C'de en az 1,5 saat inkübe edilen örnekler 13500 devir/dk'de 15 dk santrifüj edildi. Karışımın 20 µl'si koruyucu kolon takılı (30 mm×4,6 mm, 3 µm) ACE 5 C18 kolona (250 mm×4,6 mm, 5 µm) enjekte edildi. NO₂-SMX ve enzimatik reaksiyon ürünleri için uygulanan gradient metod; % 20 ACN v/v 5 dk, % 35 ACN 20 dk ve % 20 ACN v/v 5 dk olmak üzere 1 ml/dk akış hızında 254 ve 340 nm'de analiz yapıldı. Toplam analiz süresi 43 dk'dır. Mobil faz olarak asetonyitril-% 0,1 formik asit içeren su (18,2 MΩ cm) kullanıldı.

3.4.3.2. LC-MS/MS Analizleri

ThermoDionex Ultimate 3000 LC ünitesi mevcut olan Thermo TSQ Quantum Access Max LC-MS/MS cihazında analizler gerçekleştirildi. Analizlerde C18 (50 mm x 4,6 mm, 1,8 µm, Zorbax SB-C18) kolon kullanıldı. LC-MS/MS analizlerinde kullanılan gradient metod; % 15 ACN v/v 1 dk, % 85 ACN 2 dk ve % 15 ACN v/v 6 dk olmak üzere 0,5 ml/dk akış hızında analiz yapıldı. Toplam analiz süresi 15 dk'dır. Mobil faz olarak asetonyitril-% 0,1 formik asit içeren su (18,2 MΩ cm) kullanıldı.

Liyofilize reaksiyon ürünü (ikili enzim sistemi (SsapNtrB/FDH) ile kofaktör sınırlaması kaldırılarak gerçekleştirilen 20 saat 30 dk'lık reaksiyonuna ait 1:1 hacim hazırlanan ACN-25 mM pH 7,5 tris/Cl ile 9 kat seyreltilip negatif ve pozitif modda LC-

MS/MS analizi (fullscan ve product fragmentation) gerçekleştirildi. Sadece negatif modda sonuç alındı.

3.4.4. Antibakteriyel Duyarlılık Testleri

3.4.4.1. Besiyerleri ve Bakteri Büyüme Şartları

0,5 McFarland standardının hazırlanması için 25 µl % 1,75 w/v BaCl₂.2H₂O ve 4975 µl % 1 v/v H₂SO₄ karıştırılıp 625 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. 0,5 McFarland standardının 1 cm'lik ışık yolunda 625 nm'de OD 0,008-0,1 dir.

S.saprophyticus, pepton yeast ekstrakt sıvı besiyerinde (PYB) [110] ve nutrient broth besiyerinde büyütüldü. PYB besiyeri; 10 gL⁻¹ pepton, 5 gL⁻¹ yeast ekstrakt, 1 gL⁻¹ glukoz, 5 gL⁻¹ NaCl, 1gL⁻¹ Na₂HPO₄.2H₂O, pH 7,3 bileşenlerinden oluşmaktadır. *E. coli* ise LB besiyerinde büyütüldü. Disk difüzyon denemelerinde ise Mueller Hinton Agar II (MHA-II) kullanıldı.

3.4.4.2. Disk Difüzyon Testi

S. saprophyticus duyarlılık testi için *S. saprophyticus* nutrient agar petrisinden 4-5 koloni pipet ucu ile alınarak 5 ml'lik nutrient broth besiyerine aşılandı. 37°C'de 220 devir/dk'de büyümeye bırakılıp 4 saat sonra 625 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. 0,5 McFarland standardına denk gelecek şekilde 4h'lik kültürden 100 ul alınıp Mueller Hinton Agar II petrisine cam boncukla ekimi yapıldı. 6 mm lik steril disklerle (Bioanalyse) 10 µl antibiyotik stoklarından ve NO₂-SMX'un Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen 20 saat 30 dakikalık liyofilize reaksiyon karışımından emdirilip petriye kondu. 37°C'de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı.

IPTG indüksiyonu ile *E. coli* duyarlılık testi için *E. coli* BL21 DE3 kompetent hücre gliserol stoktan ve p-SsapNtrB plasmidi içeren *E. coli* BL21 DE3 gliserol stoktan 10'ar µl alınıp LB besiyerine ayrı tüplere ekim yapıldı. 37°C'de 220 devir/dk'de büyümeye bırakılıp 4 saat sonra 625 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Mueller Hinton Agar II petrisine 100 µl 21 mM IPTG eklenip ve cam boncukla tüm petriye

yayıldı. Sonra 0,5 McFarland standardına denk gelecek şekilde *E. coli* BL21 DE3 4 saatlik kültürden 100 µl alınıp 100 µl nutrient broth eklenerek seyreltilerek buradan 100 µl Mueller Hinton Agar II petrisine cam boncukla ekimi yapıldı. 6 mm lik steril diskler 10 µl antibiyotik stoklarından ve NO₂-SMX'un Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen 20 saat 30 dakikalık liyofilize reaksiyon karışımından emdirilip petriye kondu. 37°C'de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.4.3. Sıvı Kültür Yöntemi

3.4.4.3.1. Sıvı Besiyerinde *S. saprophyticus* Büyümesine DMSO Etkisinin İncelenmesi

PYB, DMSO ve gecelik kültürden Tablo 3.3'te verilen miktarlarda alınarak toplamda 5 ml'lik kültürler hazırlandı. İçerisinde % 0-10 DMSO bulunan kültürler 25°C ve 250 devir/dk karıştırma hızında inkübasyona bırakılıp belirli zaman aralıklarında örnek alınarak 600 nm de OD ölçümleri spektrofotometre yapıldı. Tabloda yer alan gecelik kültür 17 saatlik *S. saprophyticus* kültürüdür ve OD₆₀₀ değeri 0.844 olarak ölçülmüştür.

Tablo 3.3: Sıvı besiyerinde *S. saprophyticus* büyümesine DMSO etkisinin incelenmesi deneyinde bileşenler.

Final % DMSO	PYB (µl)	DMSO (µl)	Gecelik kültür (µl)
0	4500	0	500
1	4450	50	500
2	4400	100	500
3	4350	150	500
4	4300	200	500
6	4200	300	500
8	4100	400	500
10	4000	500	500

Tablo 3.3'te PYB, DMSO ve gecelik kültürden alınan miktarlar ve her bir deneydeki son DMSO yüzdesi verilmiştir.

3.4.4.3.2. Sıvı Besiyerinde *S. saprophyticus* Büyümesine SMX ve NO₂-SMX Etkisinin İncelenmesi

18,5 mg SMX tartılıp 146 µl DMSO ile çözünmesi sağlandı. 0,5 M (127 mg/ml) SMX stoğu hazırlandı. 19,5 mg NO₂-SMX tartılıp 137 µl DMSO ile çözünmesi sağlandı. 0,5 M (142 mg/ml) NO₂-SMX stoğu hazırlandı. Tablodaki gibi hazırlanan her bir deneme 25°C'de 250 devir/dk karıştırma hızında inkübasyona bırakılıp belirli aralıklarla alınan örneklerin 600 nm'de OD ölçümleri 1 cm'lik plastik küvetler kullanılarak spektrofotometrede gerçekleştirildi. Büyüme saatine karşı OD değerleri grafiğe geçirilerek büyüme eğrisi çıkarıldı.

Tablo 3.4: Sıvı besiyerinde *S. saprophyticus* büyümesine DMSO ve (pro)antibiyotik etkisinin incelenmesi deneyinde bileşenler.

Stoklar	Stoktan alınan (µl)	Gecelik kültür (µl)	PYB (µl)	Final % DMSO	Final Derişimler
-	0	1000	9000	0	% 0 DMSO
DMSO	100	1000	8900	1	% 1 DMSO
500 mM SMX	100	1000	8900	1	5 mM SMX
500 mM NO ₂ -SMX	100	1000	8900	1	5 mM NO ₂ -SMX

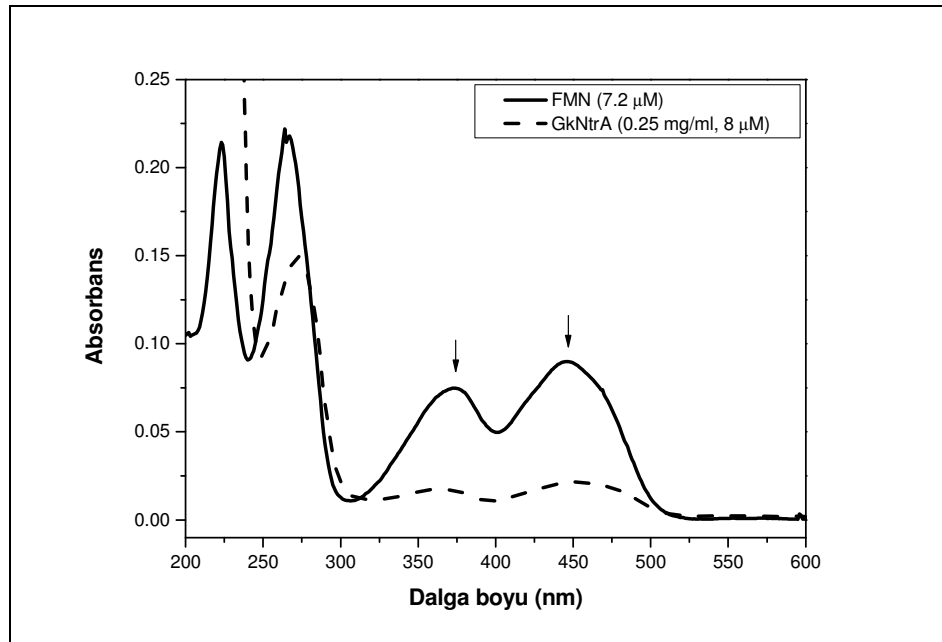
16 saatlik *S. saprophyticus* kültürünün OD₆₀₀ değeri 0.761 olarak ölçüldü. Tablo 3.4'te DMSO, SMX (500 mM), NO₂-SMX (500 mM), gecelik kültür ve PYB'den alınan miktarlar ve her bir deneydeki son derişimler verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. GkNtrA'nın Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.1.1. Flavın Analizi

Bazı flavoredüktazlar eski sarı enzim ailesindendirler (old yellow enzyme family). Nitroredüktazlar yapılarında prostetik grup olarak FMN veya FAD bulundurlar [3]. Saf enzime sarı rengini veren flavinin hem spektrum hem de HPLC analizi sonucu FMN olduğu belirlendi. GkNtrA'dan flavin ekstraksiyonu sonrası numunenin HPLC analizi yapılmış ve ticari FMN standart olarak kullanıldı. GkNtrA'dan ekstrakte edilen flavinin kolonda alıkonma süresi 14,26 dk ve standart FMN'in alıkonma süresi 14,25 dk olarak görüldü (Şekil 4.2). Ayrıca saf enzime ait UV-Vis spektruma bakıldığında 366 nm ve 450 nm değerlerinde pikler gözlemlendi. Bu pikler ticari FMN'de de (372 nm ve 445 nm) mevcuttur (Şekil 4.1).



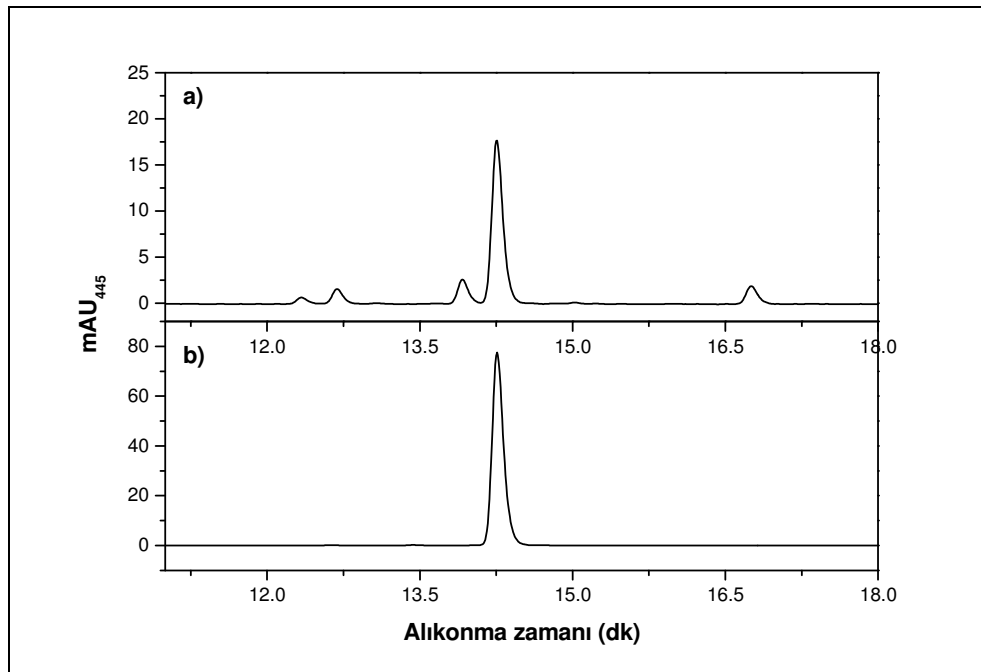
Şekil 4.1: GkNtrA ve ticari FMN'ye ait UV-Vis spektrumu. Düz çizgi (—) ticari FMN (7,2 µM), kesikli çizgi (---) GkNtrA (0,25 mg/ml, 8 µM).

Saf enzimin FMN ile doyurulması deneyi öncesi ve sonrasında kaydedilen UV-Vis spektrumları (200-600 nm aralığında) dikkate alınarak yapılan hesaplama sonrasında GkNtrA için 1 mol enzimin 0,3 mol FMN içerdiği hesaplandı. Enzimin FMN ile doyurulması işleminden sonra ise bu oranın 0,7'ye çıktığı görüldü.

Tablo 4.1: GkNtrA ve ticari FMN'ye ait spektrum verileri.

	Absorbans 280 nm	Absorbans 445 nm	Flavin Derişimi (μ M)	Enzim Derişimi (μ M)	Flavin: Protein Oranı
FMN standardı	0,13	0,090	7,2	—	—
GkNtrA+fmn	0,24	0,066	5,3	7,4	0,7
GkNtrA	0,13	0,021	1,7	5,1	0,3

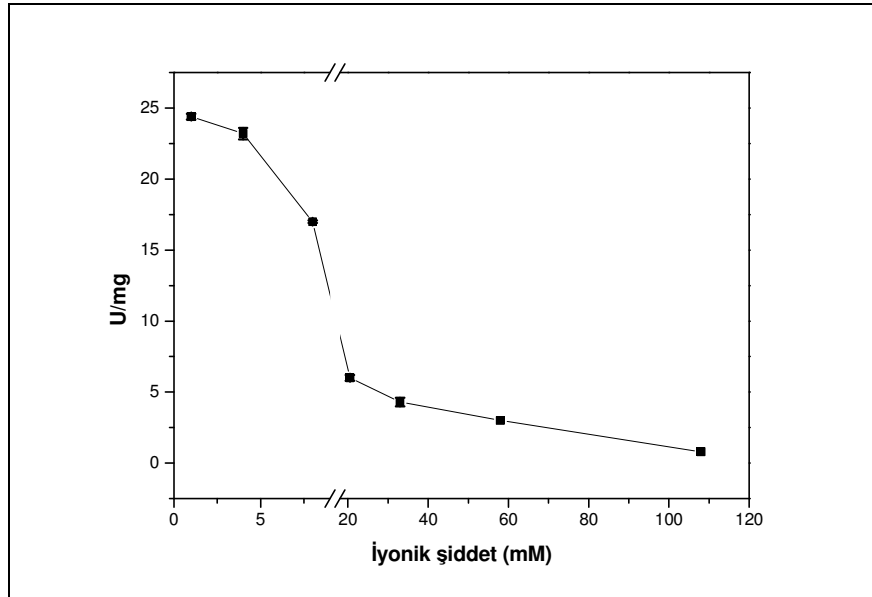
Tablo 4.1'de saf enzime, FMN ile doyurulmuş saf enzime ve ticari FMN'ye ait spektrum verileri ayrıca bu verilere dayanarak hesaplanmış konsantrasyonlar verildi.



Şekil 4.2: FMN'e ait HPLC kromatogramları a) ticari FMN, b) GkNtrA'dan flavin ekstraksiyon örneği.

4.1.2. İyonik Şiddet

GkNtrA aktivitesine iyonik şiddet etkisini belirlemek için pH 8,0'de farklı iyonik şiddetteki tris/Cl tampon sistemleri kullanıldı. 10 mM tris/Cl ($\mu=0$ mM), 25 mM tris/Cl ($\mu=1$ mM), 50 mM tris/Cl ($\mu=2$ mM) ve 12,5-100 mM NaCl ilave edilmiş 50 mM tris/Cl pH 8,0 tampon sistemlerinin iyonik şiddetleri sırasıyla 14,5 mM, 27 mM, 52 mM ve 102 mM'dır. En yüksek aktivite iyonik şiddetin en az olduğu 10 mM tris/Cl tamponunda görülmüş olup iyonik şiddet arttıkça enzim aktivitesinin düştüğü belirlendi (Şekil 4.3). Sonraki çalışmalarda tampon konsantrasyonu 25 mM kullanıldı. Bu şekilde hem tampon sistemi zayıf kalmamakta hem de enzimin maksimum verimde çalışabilmesi amaçlandı.

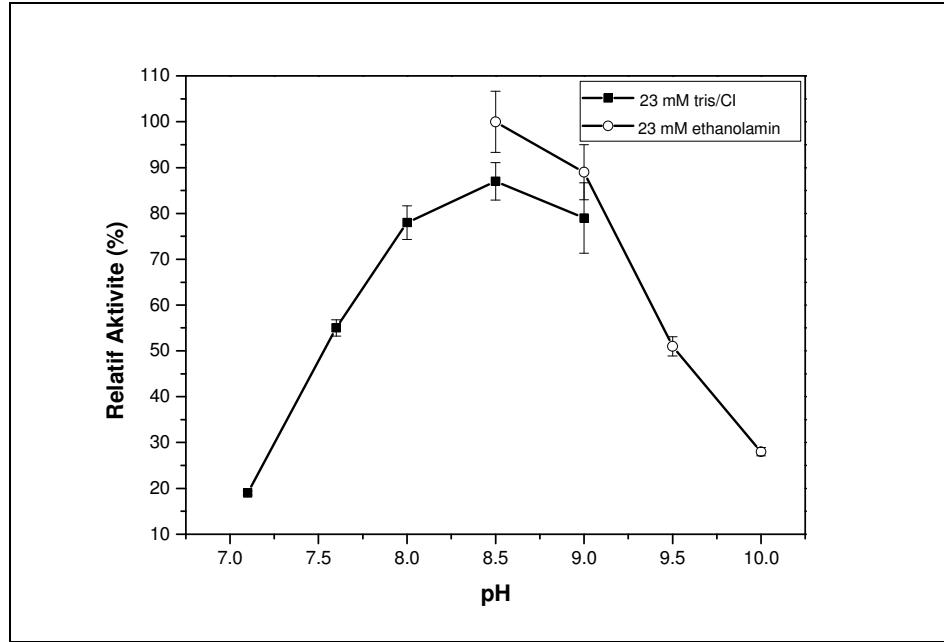


Şekil 4.3: GkNtrA aktivitesine iyonik şiddet etkisi. Reaksiyon, 100 μ M NFZ, 9 μ g/ml GkNtrA, 198 μ M NADH ve % 2 DMSO kullanılarak 49°C'de gerçekleştirildi.

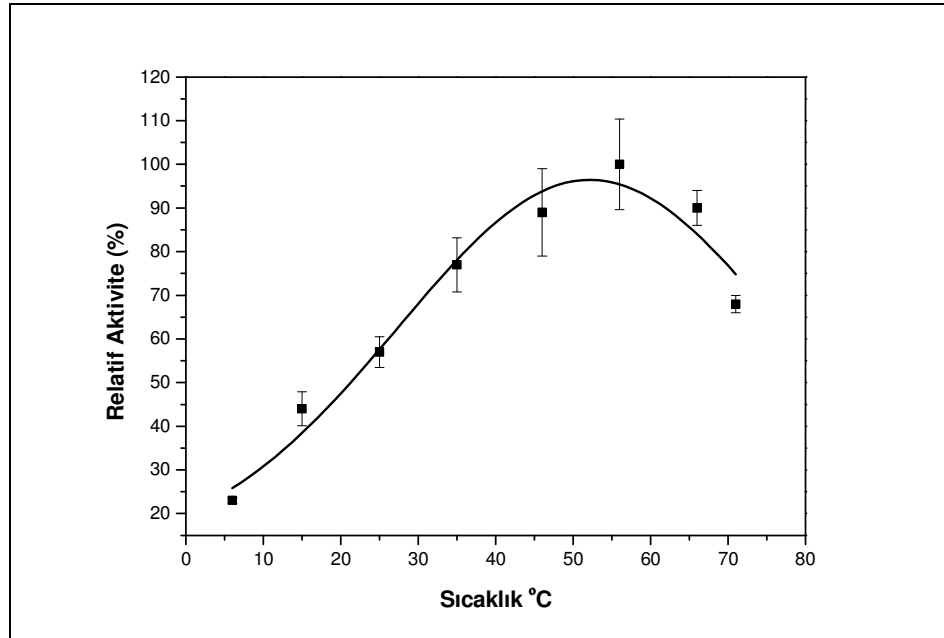
4.1.3. Optimum pH, Sıcaklık ve Isıl Kararlılık

GkNtrA'nın pH profilini çıkarmak için nitrofurazon kullanıldı. Tampon sisteminde iyon şiddeti sabit tutulmuş ve toplam iyon şiddeti 23 mM olacak şekilde tamponlar hazırlandı. İyon şiddetini eşitlemek için NaCl kullanıldı. GkNtrA'nın çalıştığı optimum pH aralığı 8,0-9,0 olarak belirlendi (Şekil 4.4). Enzim aktivitesi 5-

70°C aralığında çeşitli sıcaklıklarda ölçülmüş olup enzimin çalıştığı optimum sıcaklık 45-65°C aralığı olarak belirlendi (Şekil 4.5).

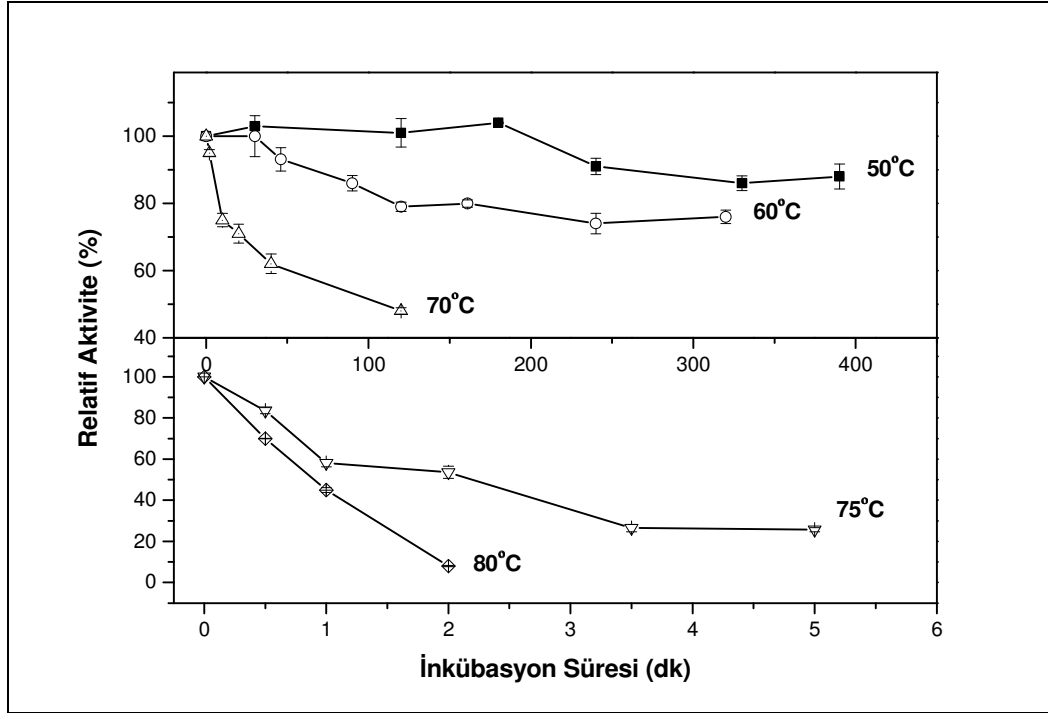


Şekil 4.4: pH'nın GkNtrA aktivitesi üzerine etkisi. Reaksiyon 11 µg/ml GkNtrA, 150 µM NFZ, 263 µM NADPH ve ortamda % 4 DMSO olacak şekilde 50°C de belirtilen tamponlarda gerçekleştirildi.



Şekil 4.5: Sıcaklığın GkNtrA aktivitesi üzerine etkisi. Reaksiyon, 100 µM NFZ, 15 µg/ml GkNtrA ve 221 µM NADH ve ortamda % 2 DMSO olacak şekilde 23 mM pH 8,0 sodyum fosfat tamponunda gerçekleştirildi.

GkNtrA'nın ısı kararlılığının belirlenmesi, 50-80°C aralığında çeşitli sıcaklıklarda ve 0-400 dakika aralığında değişen inkübasyon süresinde tutulan enzimin kalan aktivitesinin optimum sıcaklıkta ölçülmesiyle sağlandı. Enzimin aktivitesinin yarıya düştüğü sıcaklık (yarılanma ömrü) belirlendi.



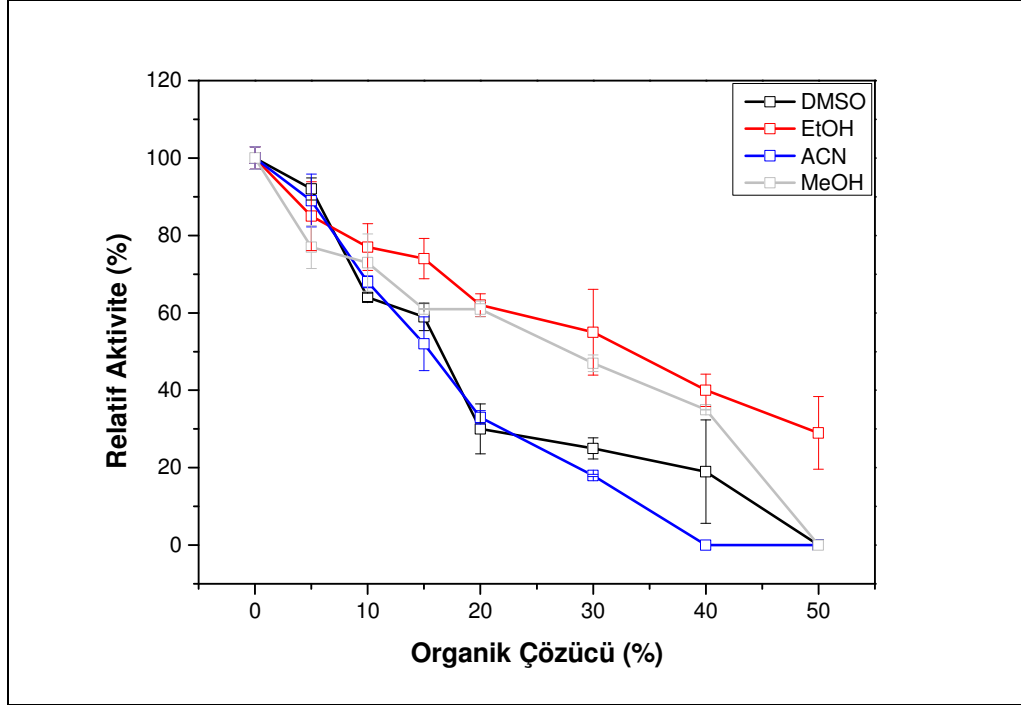
Şekil 4.6: GkNtrA'nın ısı kararlılığının belirlenmesi.

Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 50°C'de 390 dakikalık (6,5 saat) inkübasyon sonrasında enzim aktivitenin yalnızca % 12'sini kaybettiği görüldü. 60°C'de 320 dakikalık (5 saat 20 dak) inkübasyon sonrasında ise aktivitenin % 24 azaldığı görüldü. 70°C'de ise 120 dakikada (2 saat) enzim aktivitesinin % 50'sini kaybettiği ve bu sıcaklıktan sonra aktivitenin dramatik bir şekilde düştüğü gözlemlendi. Enzimin yarılanma ömrünün 75°C'de 2 dakika ve 80°C'de 1 dakika olduğu belirlendi (Şekil 4.6).

4.1.4. Organik Çözücü

DMSO, EtOH, ACN ve MeOH'ın GkNtrA aktivitesi üzerine etkileri incelendi ve ortamda hiç organik çözücü olmayan durumdaki aktivite değeri 100 kabul edilerek

diğerleri bu değere göre oranlanmış ve göreceli aktivite değerleri hesaplandı. Buna göre ortamda % 5 DMSO, EtOH, ACN ve MeOH olduğundaki aktivite değerleri sırasıyla % 92, 85, 89, 77'dir.

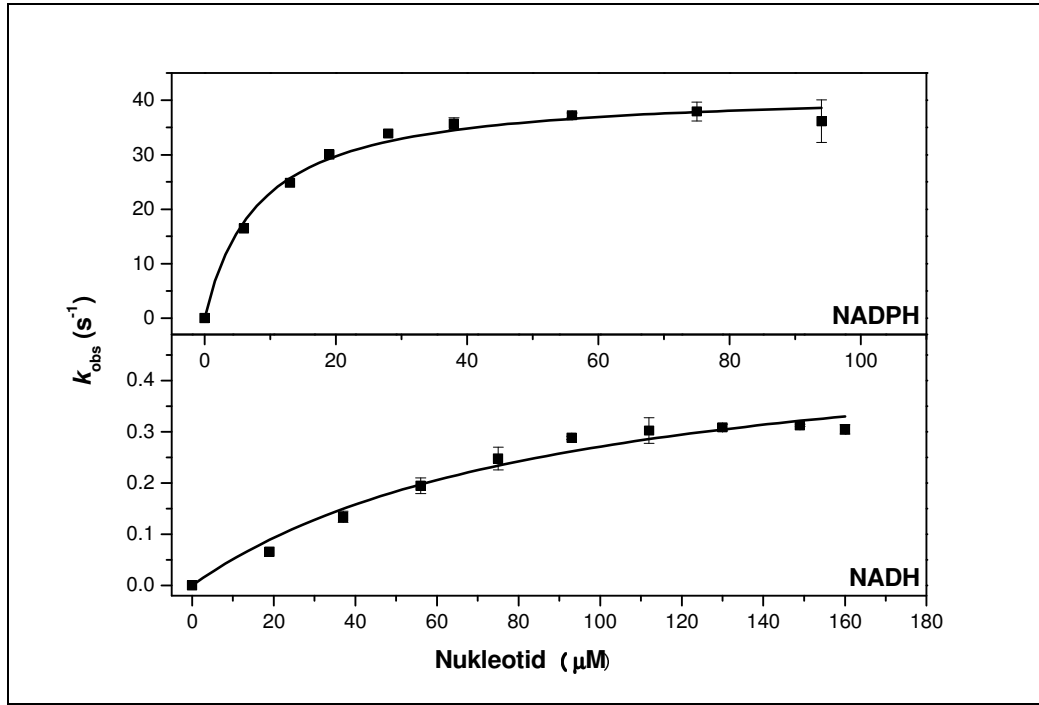


Şekil 4.7: GkNtrA aktivitesi üzerine organik çözücü etkisi.

Organik çözücü yüzdesi arttıkça aktivitede düşüş görüldü. % 40 ACN varlığında aktivitenin tamamen yitirildiği görülürken % 40 DMSO, EtOH ve MeOH'de sırasıyla % 19, 40 ve 35 aktivite görüldü. Bununla birlikte % 50 organik çözücü varlığında ise GkNtrA aktivitesinin, EtOH hariç olmak üzere % 29 aktive mevcut hala, tamamen yok olduğu görüldü (Şekil 4.7).

4.1.5. Kofaktör Tercihi

GkNtrA'nın kofaktör tercihinin belirlenmesi deneyinde yapay elektron alıcı olarak $K_3[Fe(CN)_6]$ kullanıldı. NAD(P)H oksidasyonu takip edildi. K_M değeri NADH için $91,08 \pm 23,37 \mu M$ ve NADPH için $8,27 \pm 1,10 \mu M$ olarak ve k_{obs} NADH ve NADPH için sırasıyla $0,52 \pm 0,06 s^{-1}$ ve $42,01 \pm 1,25 s^{-1}$ olarak hesaplandı.

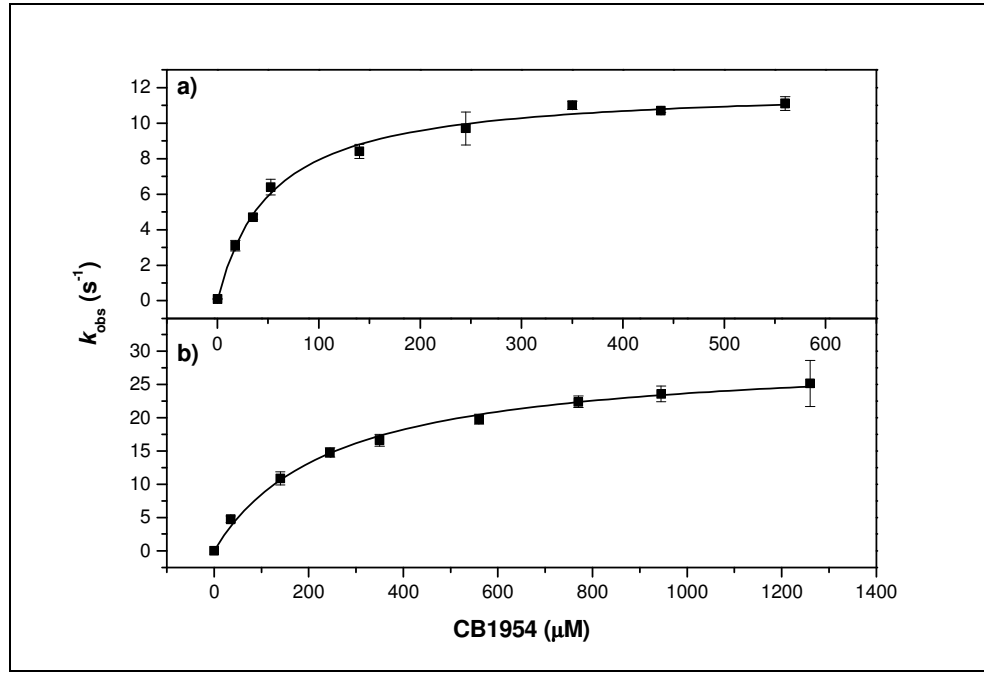


Şekil 4.8: GkNtrA'nın kofaktör tercihi için Michaelis–Menten grafiği. Aktivite değerleri 0,8 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,4-23 μ g/ml GkNtrA, 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 50°C'de belirlendi.

Enzimin her iki kofaktörü de kullanabildiği ancak katalitik etkinlikleri (k_{cat}/K_M) karşılaştırıldığında NADPH'a ilgisinin NADH'e göre 890 kat daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.8).

4.1.6. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

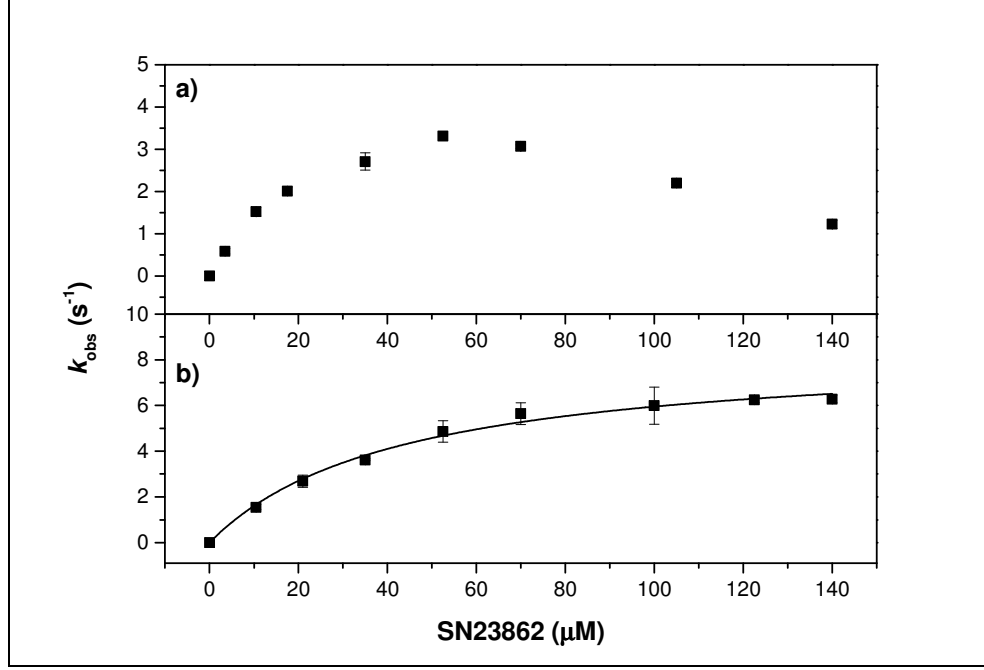
CB1954, SN23862, 2,4-DNT, NFZ ve NTOIN ile Michaelis–Menten kinetiğine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. CB1954 indirgenmesinde her iki kofaktörle de gerçekleştirilen reaksiyonların Michealis Menten'e uygunluğu gözlenirken SN23862 ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda kofaktör olarak NADH kullanıldığında inhibisyon gözlemlendi (Şekil 4.10, a)). Substrat konsantrasyonuna karşı başlangıç hızı ile çizilen grafiklerde Origin programı kullanılarak non-lineer fit opsiyonu ile kinetik parametrelerden k_{cat} ve K_M hesabı yapıldı. CB1954 indirgenmesinde GkNtrA için K_M değeri NADH ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için $52,04 \pm 4,27 \mu$ M ve NADPH ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için ise $248,96 \pm 21,42 \mu$ M olarak hesaplandı. Ayrıca k_{obs} NADH ve NADPH için sırasıyla $12,06 \pm 0,24 s^{-1}$ ve $29,56 \pm 0,80 s^{-1}$ olarak hesaplandı.



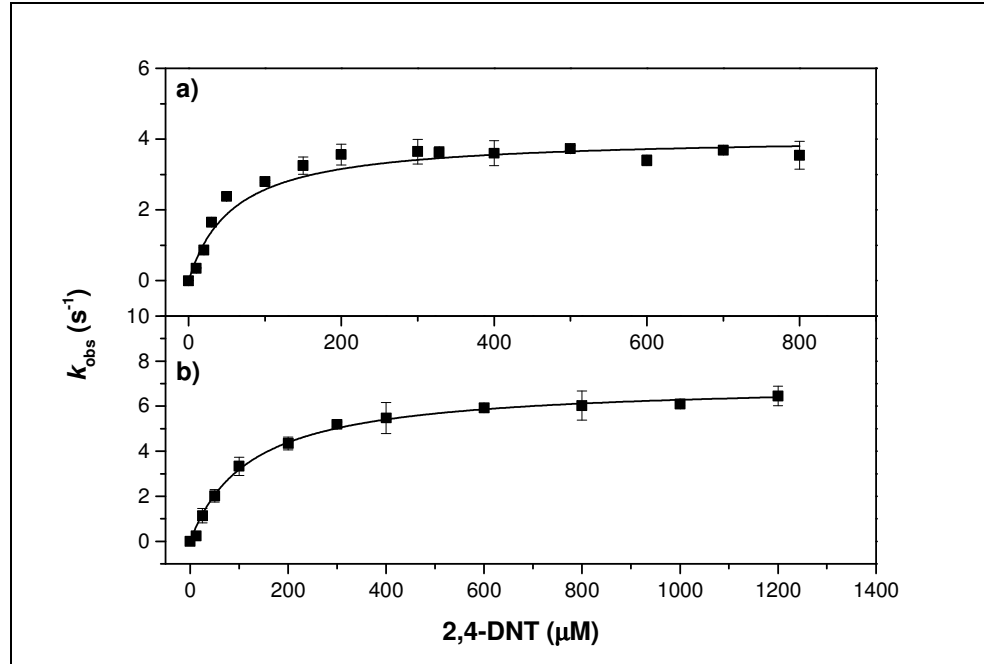
Şekil 4.9: a) NADH ve b) NADPH kullanılarak GkNtrA'nın CB1954'ü indirgemesi reaksiyonunun kararlı hal kinetiği. Aktivite değerleri 0-1,2 mM CB1954, 2 $\mu g/ml$ GkNtrA, 100 μM NADPH (veya 183 μM NADH) %4 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 50°C'de belirlendi.

GkNtrA'nın CB1954'ü indirgemesi reaksiyonuna ait k_{cat}/K_M değerleri ise 231745 $s^{-1}M^{-1}$ ve 118734 $s^{-1}M^{-1}$ (sırasıyla NADH ve NADPH için) olarak hesaplandı (Şekil 4.9). Kanseri terapileri için ilaç öncü maddesi olan diğer bileşik SN23862'ye karşı GkNtrA'nın aktif olduğu görüldü. NADH ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda 52,5 μM substrat konsantrasyonundan sonra aktivitenin azaldığı görüldü. Reaksiyonda NADPH kullanıldığında ise 140 μM 'dan sonra düşüş gözlemlendi. K_M değeri NADPH ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için $43,03 \pm 5,30$ μM olarak ve k_{obs} $8,51 \pm 0,39$ s^{-1} olarak hesaplandı (Şekil 4.10). k_{cat}/K_M değeri 197788 $s^{-1}M^{-1}$ olarak hesaplandı.

Nitrotoluenli bileşiklerden 2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgemesi NAD(P)H kofaktörü kullanılarak gerçekleştirilmiş ve kinetik parametreler hesaplandı. K_M değeri NADH ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için $58,62 \pm 10,11$ μM ve NADPH ile gerçekleştirilen reaksiyonlar için ise $120,81 \pm 9,23$ μM olarak hesaplandı. Ayrıca k_{obs} NADH ve NADPH için sırasıyla $4,08 \pm 0,19$ s^{-1} ve $7,04 \pm 0,13$ s^{-1} olarak hesaplandı. k_{cat}/K_M değerleri ise 69596 $s^{-1}M^{-1}$ ve 58273 $s^{-1}M^{-1}$ (sırasıyla NADH ve NADPH için) olarak hesaplandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.10: a) NADH ve b) NADPH kullanılarak GkNtrA'nın SN23862'yi indirgemesi reaksiyonunun kararlı hal kinetiği. Aktivite değerleri 0-140 μM SN23862, 2 $\mu g/ml$ GkNtrA, 100 μM NADPH (180 μM NADH) %4 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 50°C'de belirlendi.



Şekil 4.11: a) NADH ve b) NADPH kullanılarak GkNtrA'nın 2,4-DNT'i indirgemesi reaksiyonunun kararlı hal kinetiği. Aktivite değerleri 0-1200 μM 2,4-DNT, 7,0 $\mu g/ml$ GkNtrA, 150 μM NADPH (198 μM NADH) % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 42°C'de belirlendi.

CB1954 ve 2,4-DNT substratlarının indirgenmesine ait kinetik verilere bakıldığında NADPH kullanılan reaksiyonlarda maksimum katalitik hız daha yüksek olmasına rağmen K_M değerleri NADH kullanılan reaksiyonlarda daha düşük gözlemlendi. Bu durumun enzimin yüksek afiniteyle NADPH'a bağlanmasından ve ayrılmasının daha zor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebeple de katalitik etkinlikleri karşılaştırıldığında NADH ile gerçekleştirilen reaksiyonların k_{cat}/K_M değerleri daha yüksek gözlemlendiği söylenebilir. Tablo 4.2'de literatürde mevcut tip I NTR'lerden bazılarının kinetik verileri karşılaştırıldı. Burada NTR'lerin Ping Pong kinetik mekanizmaya göre indirgeme yapan iki substratlı oksidoredüktaz olmaları önemli bir noktadır. Substrat indirgenme hızı farklı NAD(P)H konsantrasyonlarında değişiklik gösterecektir. Tabloda verilen kinetik parametreler farklı olmakla birlikte bu durum relatif k_{cat}/K_M değerini etkilemediği belirtilmektedir [44].

Tablo 4.2: Literatürde yer almış tip I NTR'lerin CB1954'e karşı aktiviteleri.

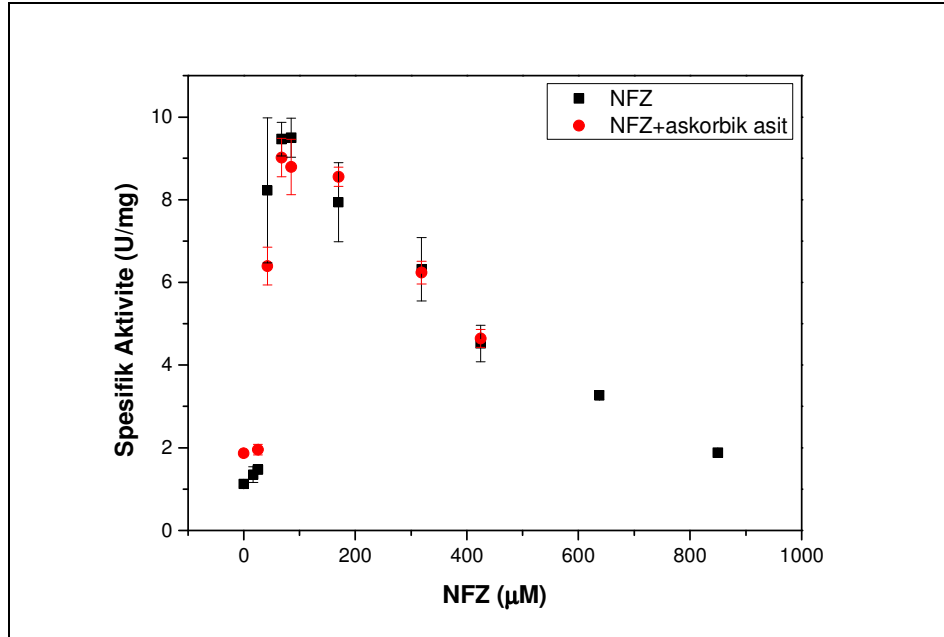
Nitroredüktaz	Aile	K_M (μM)	k_{obs} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)	Kofaktör	Ürün(ler)	Referans
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	880	6	6800	NADH (60 μM)	2HX:4HX (1:1)	[111]
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	900	6,2	7000	NADH (60 μM)	2HX:4HX (1:1)	[73]
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	17000	140	7000	NADH (0-1 mM)	2HX:4HX (1:1)	[112]
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	8000	50	6000	NADH (50 μM)	2HX:4HX (1:1)	[76]
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	2600	15	5800	NADPH (50 μM)	2HX:4HX (1:1)	[76]
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	11000	62	5600	NADH (250 μM)	2HX:4HX (1:1)	[75]
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	3600	26	7300	NADPH (250 μM)	2HX:4HX (1:1)	[75]
NfsB (<i>E. coli</i>)	NfsB	79	2	26000	NADPH (60 μM)	2HX:4HX (1:1)	[113]
FRaseI (<i>A. fischeri</i>)	NfsB	890	11	12000	NADPH (250 μM)	-	[114]
NfsB (<i>K. pneumoniae</i>)	NfsB	21000	200	9600	NADH (250 μM)	2HX:4HX (1:1)	[115]
RdxA (<i>H. pylori</i>)	NfsB	35	10	300000	NADPH (90 μM)	-	[113]
Ydgl (<i>B. subtilis</i>)	NfsB	1800	7,7	4300	NADH (250 μM)	2HX:4HX (3:2)	[115]

Tablo 4.2: Devam.

Nitroredüktaz	Aile	K _M (μM)	k _{obs} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ M ⁻¹)	Kofaktör	Ürün(ler)	Referans
YfkO (<i>B. licheniformis</i>)	NfsB	30	1100	3,5x10 ⁷	NADPH (500 μM)	4HX	[100]
YfkO (<i>B. subtilis</i>)	NfsB	2400	60	25000	NADPH (250 μM)	4HX	[115]
Ssap-NtrB (<i>S. saprophyticus</i>)	NfsB	1065	2,3	2120	NADPH (200 μM)	2HX:4HX (1:1)	[9]
NfsA (<i>E. coli</i>)	NfsA	140	21	150000	NADPH (50 μM)	2HX	[76]
NfsA (<i>E. coli</i>)	NfsA	18	2,6	150000	NADH (50 μM)	2HX	[76]
NfsA (<i>E. coli</i>)	NfsA	220	16	73000	NADPH (250 μM)	2HX>>4HX	[75]
NfsA (<i>E. coli</i>)	NfsA	46	2,9	63000	NADH (250 μM)	2HX>>4HX	[75]
Frp (<i>V. harveyi</i>)	NfsA	100	22	220000	NADPH (250 μM)	2HX	[115]
NfrA (<i>B. subtilis</i>)	NfsA	150	14	97000	NADPH (250 μM)	2HX	[115]
NfsA (<i>A. fischeri</i>)	NfsA	53	14	260000	NADPH (250 μM)	-	[115]
NfsA (<i>K. pneumoniae</i>)	NfsA	1700	37	22000	NADPH (250 μM)	2HX	[115]
NfsA (<i>S. enterica</i>)	NfsA	21	0,4	18000	NADPH (250 μM)	2HX	[115]
YcnD (<i>B. subtilis</i>)	NfsA	35	15	430000	NADPH (250 μM)	-	[115]
GkNtrA (<i>G. kaustophilus</i>)	NfsA	52	12	231745	NADH (183 μM)	2HX	Tez çalışması
GkNtrA (<i>G. kaustophilus</i>)	NfsA	249	30	118734	NADPH (100 μM)	2HX	Tez çalışması
YwrO (<i>B. myloliquefaciens</i>)	YwrO	620	8,2	13000	NADPH (250 μM)	4HX	[71], [72]
AzoR (<i>E. coli</i>)	AzoR	1400	0,15	110	NADPH (250 μM)	4HX	[75]
AzoR (<i>E. coli</i>)	AzoR	6600	0,15	23	NADH (250 μM)	4HX	[75]
NemA (<i>E. coli</i>)	NemA	56	0,22	3900	NADPH (250 μM)	4HX	[75]
NemA (<i>E. coli</i>)	NemA	55	0,048	880	NADH (250 μM)	4HX	[75]

Tablo 4.2’de verilen kinetik parametrelerin kesintili HPLC metodu datalarından türetilmiş olanlar italik yazılmıştır. Diğerleri ise spektroskopik olarak devamlı takip edilen datalardan elde edilmiştir.

NFZ ve NTOIN’in GkNtrA ile indirgenmesi reaksiyonlarında her iki kofaktörle de substrat konsantrasyonu arttıkça aktivitenin düştüğü görüldü.

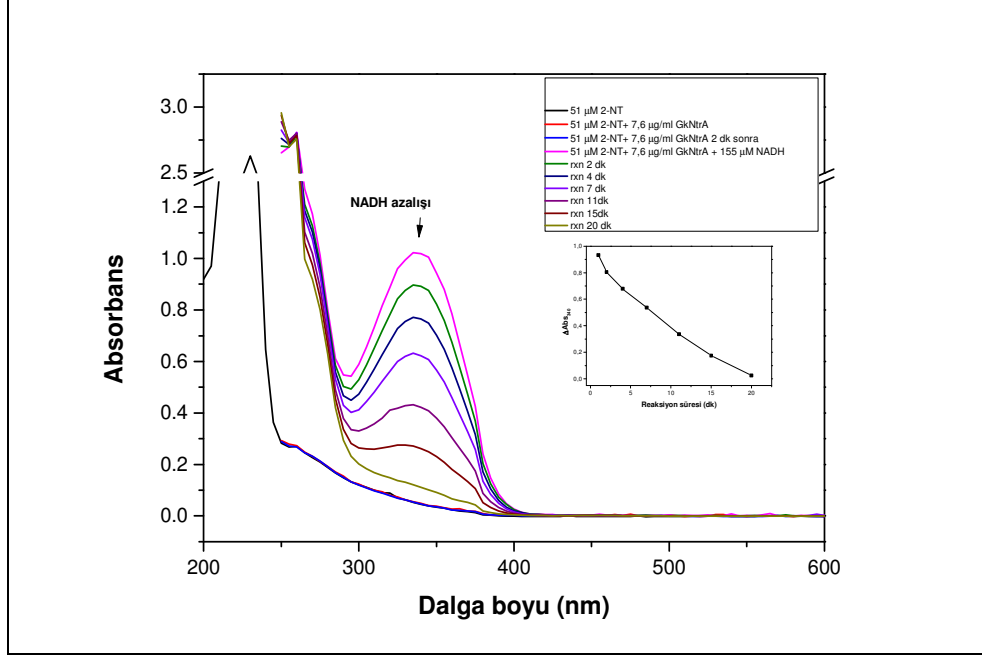


Şekil 4.12: NFZ ve NFZ/askorbik asit içeren reaksiyonlarda GkNtrA aktivite değişiminin karşılaştırılması. Reaksiyon 0-850 μM NFZ, 6 μg/ml GkNtrA ve 214 μM NADH % 8,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,2 tris/Cl tamponunda 37°C’de gerçekleştirildi. Kare: kontrol, yuvarlak: 1,4 mM askorbik asit varlığında gerçekleştirilen reaksiyon. 340 nm kofaktör azalışı takip edildi.

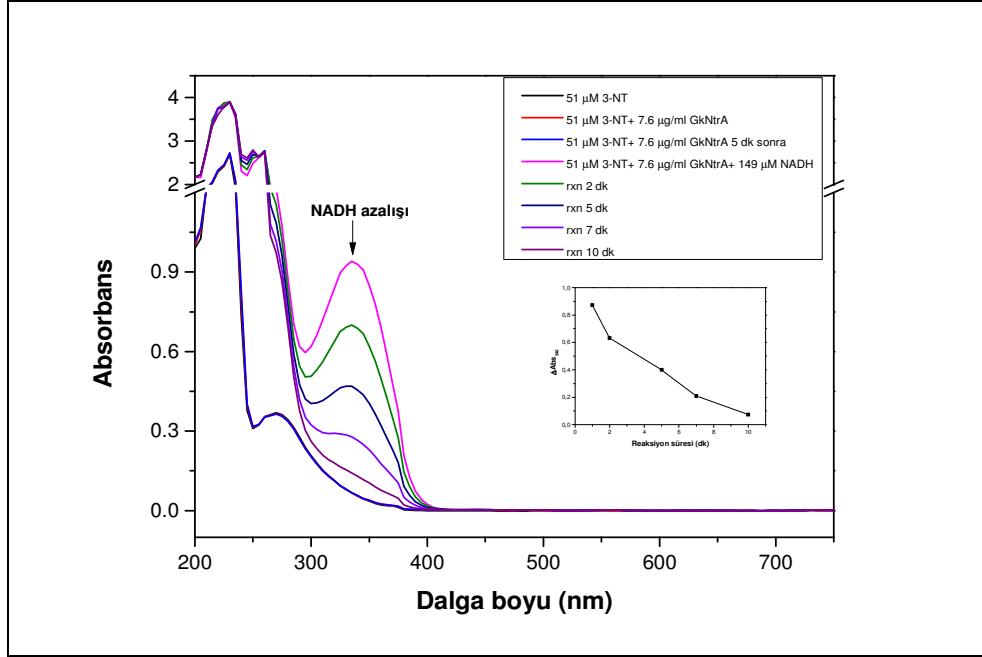
NFZ model substrat alınarak reaksiyonda yüksek substrat konsantrasyonunda aktivitenin düşmesinin sebebi substrat inhibisyonu mu yoksa tip II (oksijen hassasiyeti olan) nitroredüktazların tek elektron üzerinden indirgemeyi sağlarken ortamda oluşan süperoksit radikalinden [3] dolayı mı diye araştırılmak üzere askorbik asitli ortamda reaksiyon hızı ölçüldü. Bilindiği gibi askorbik asit, indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrosil radikali ($OH^{\cdot}$) ile reaksiyona girerek onları ortamdaki temizler. Hipotezimize göre GkNtrA eğer tip II nitroredüktaz sınıfından ise reaksiyon sırasında oluşacak radikalden dolayı enzimin aktivitesinde düşüş meydana gelmiş olabilirdi. Ancak askorbik asitli ortamda radikallerin tutulması sebebiyle enzim aktivitesinde düşüş

görülmemeliydi. Şekil 4.12’de görüldüğü gibi askorbik asitin ortamda bulunması aktivitenin düşmesine engel olmadığı gözlemlendi. Bu durumda süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) dışında başka bir radikal (NfrA1 (PDB kodu 3N2S) daki gibi hidrojen peroksit (H_2O_2)) oluşuyor olabilir veya normal bir substrat inhibisyonu durumu söz konusu olabilir.

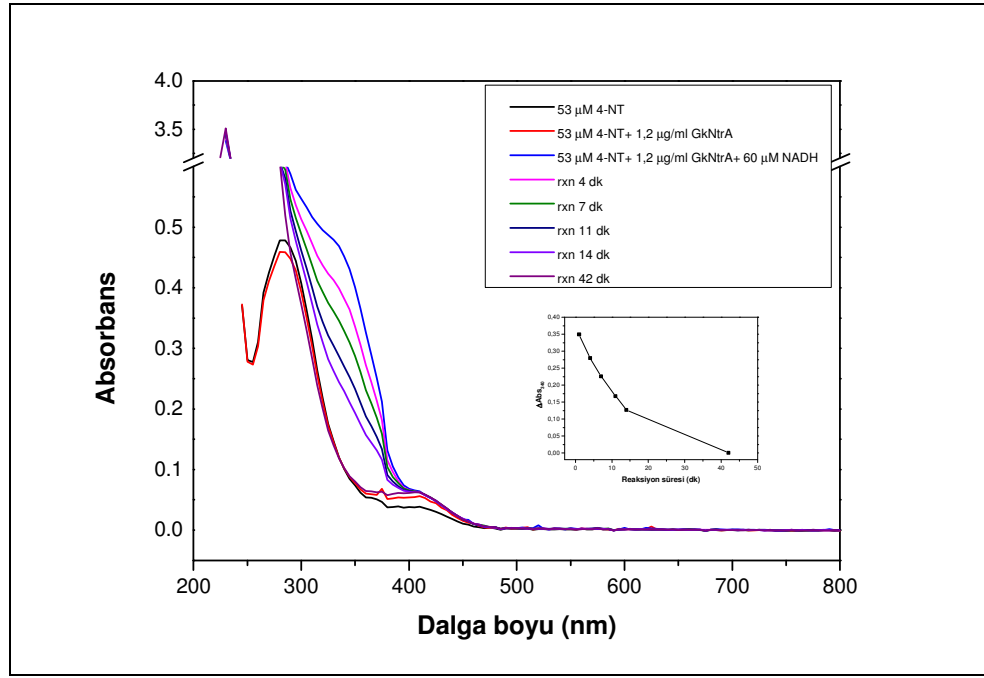
GkNtrA’nın nitrofenolik ve nitrotoluenli bileşiklere karşı aktivitesi olup olmadığına ilk önce spektrum taraması ile bakıldı. Spektrum tarama sonuçlarına bakıldığında net bir kofaktör azalışı gözlemlendi (Şekil 4.13-4.19). Sonrasında GkNtrA’nın bu bileşiklere karşı spesifik aktivitesi hem NADH hem de NADPH varlığında ölçüldü. Kinetik ölçümler sonucu Tablo 4.3’te verilen tüm bileşiklere karşı GkNtrA’nın aktivitesi olduğu görüldü ancak HPLC sonuçlarına bakıldığında 230 ve 340 nm’lerde 2-NT, 4-NT ve TNT için herhangi bir ürün pikine rastlanılmadı. Bununla birlikte kofaktör ve substratta net bir azalış gözlemlendi. Bu durumda çeşitli olasılıklar akla gelmektedir. Literatürde mevcut bir NTR gibi GkNtrA’nın da NADH oksidaz aktivitesi [116] olabilir ve reaksiyon sonunda radikalik bileşikler oluşmasından dolayı substrat miktarında azalma gözlenmiş olabilir. Yani ürün oluşmuyor da enzim kofaktörü boşa harcıyor olma ihtimali de mevcuttur. Ya da oluşan ürünler parçalanıyor olabilir, reaksiyon sırasında çöküyor, enzime bağlanıyor veya polimerleşiyor olabilir ki TNT reaksiyonunda rengin bulanıklaştığı gözle görüldü. Bu sebeplere bağlı olarak HPLC’de UV dedektörle tespit edilememiş olabilirler. Bu sebeple sadece kinetik çalışma yapılarak, nitroredüktazlar için söylemek gerekirse, enzimin aktivitesi olduğunu söylemek çok doğru bir yaklaşım olmayacaktır. Çünkü kofaktör oksidasyonuna dayalı kinetik ölçümlerde enzimin kofaktörü ürün oluşturmaksızın kullanma ihtimali mevcuttur.



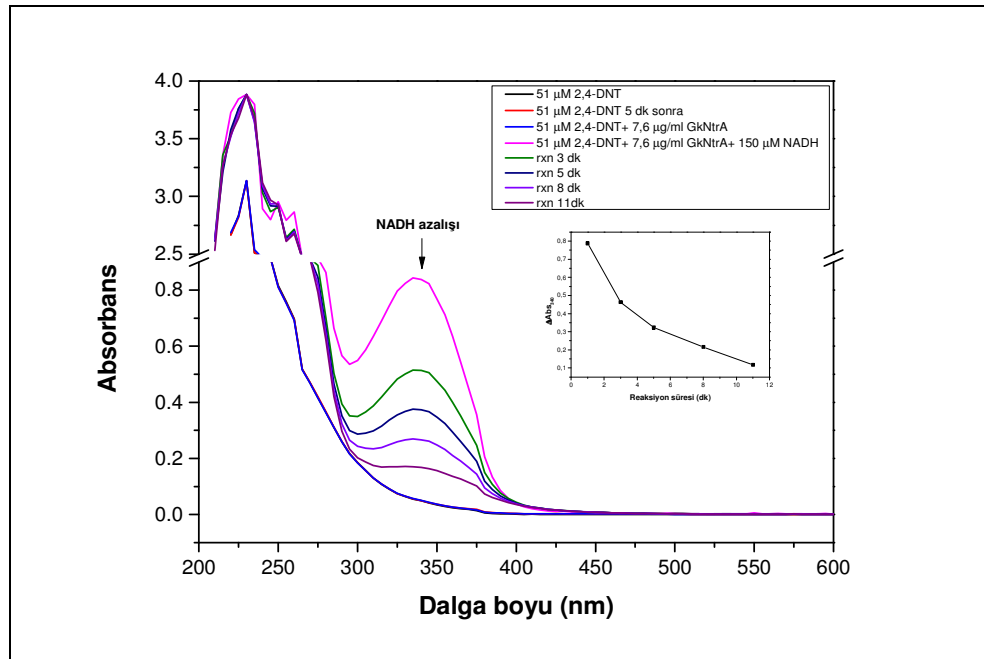
Şekil 4.13: 2-NT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm'deki absorbans değişimini (ΔAbs_{340}) göstermektedir.



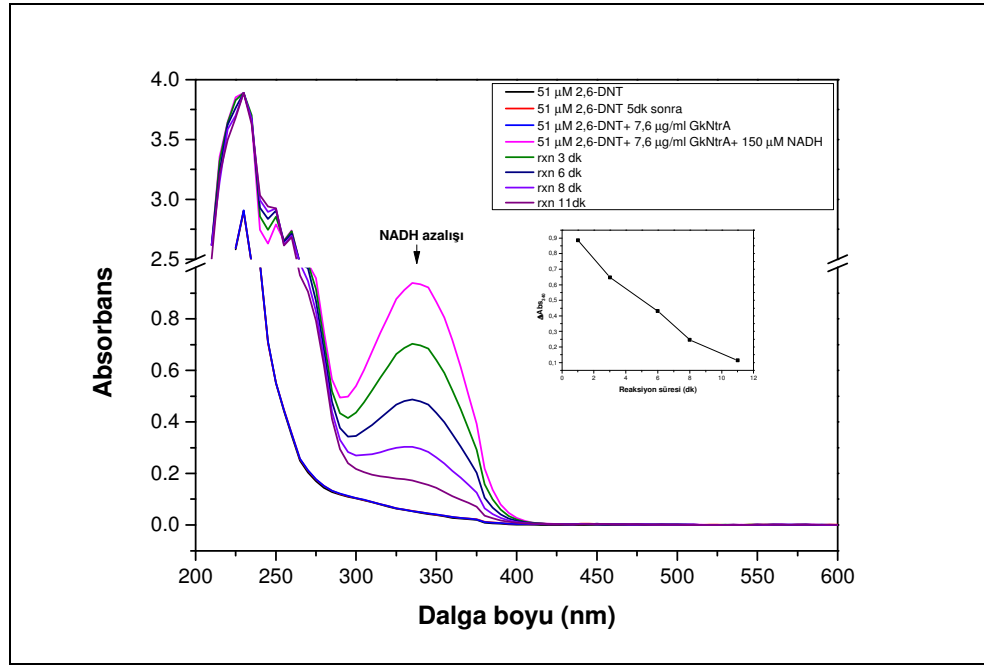
Şekil 4.14: 3-NT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm'deki absorbans değişimini (ΔAbs_{340}) göstermektedir.



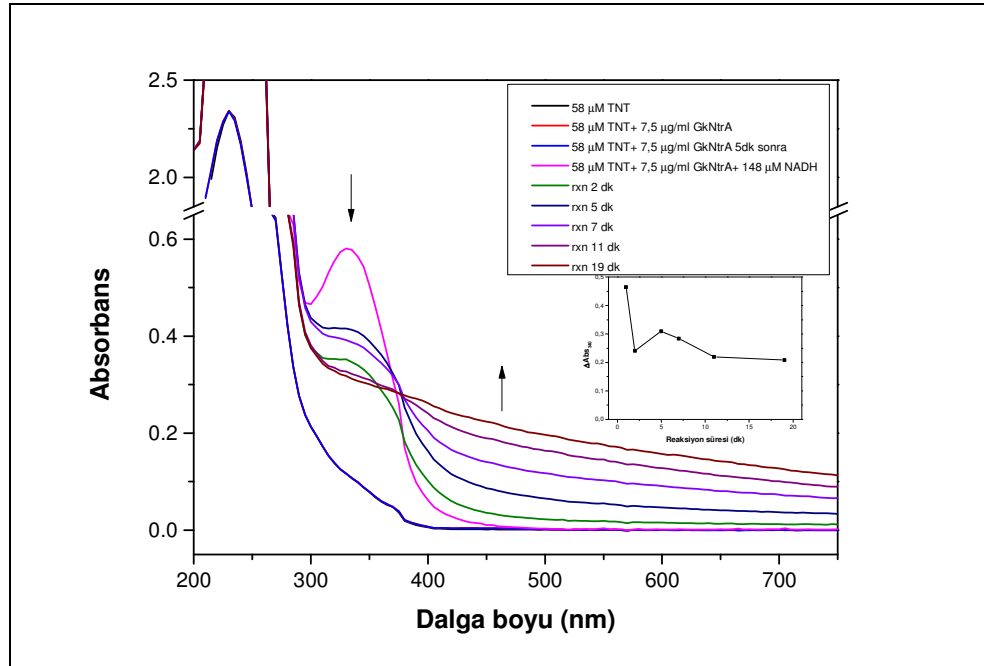
Şekil 4.15: 4-NT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm'deki absorbans değişimini (Δ Abs₃₄₀) göstermektedir.



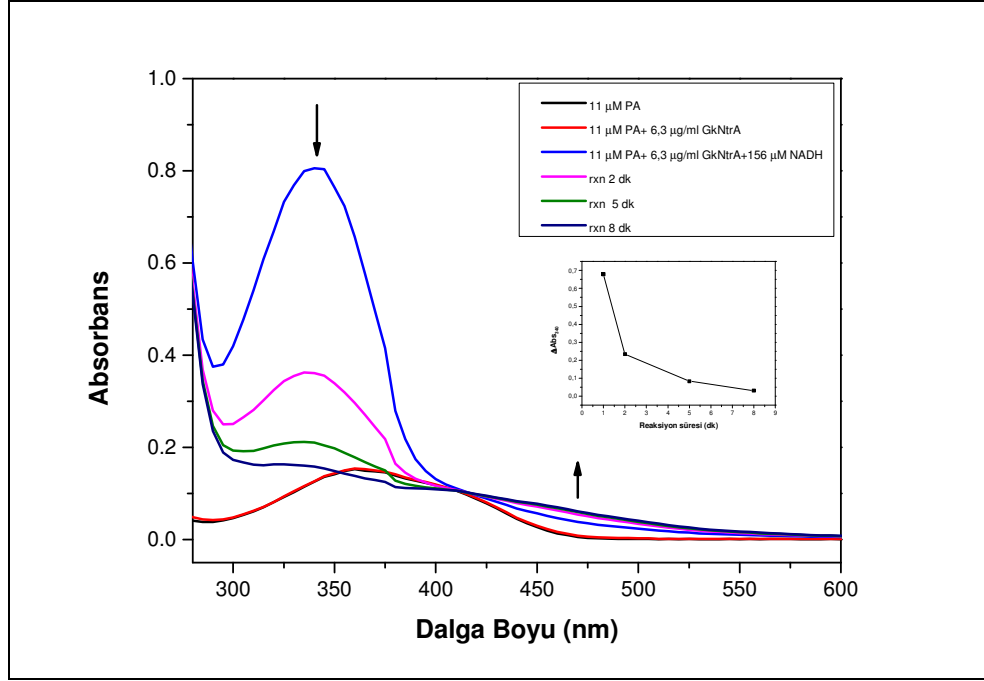
Şekil 4.16: 2,4-DNT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm'deki absorbans değişimini (Δ Abs₃₄₀) göstermektedir.



Şekil 4.17: 2,6-DNT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm'deki absorbans değişimini (ΔAbs_{340}) göstermektedir.



Şekil 4.18: TNT ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm'deki absorbans değişimini (ΔAbs_{340}) göstermektedir.



Şekil 4.19: Pikrik asit ve GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm’deki absorbans değişimini (ΔAbs_{340}) göstermektedir.

Tablo 4.3: GkNtrA’nın çeşitli nitro substütiye bileşiklere karşı spesifik aktivitesi.

Substrat	Enzim aktivitesi $\mu\text{mol/dk/mg}$		Açıklama
	NADPH	NADH	
CB1954	21,3 $\pm$ 1,9	16,5 $\pm$ 0,8	140 μM CB1954, 180 μM NADH (100 μM NADPH), % 4 DMSO, 50°C, 420 nm
SN23862	9,5 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 0,0	52,5 μM SN23862, 180 μM NADH (100 μM NADPH), % 4 DMSO, 50°C, 340 nm
NFZ	-	9,5 $\pm$ 0,5	85 μM NFZ, 214 μM NADH, % 8,5 DMSO, 37°C, 340 nm
		14,4 $\pm$ 0,0	85 μM NFZ, 1090 μM NADH, % 8,5 DMSO, 37°C, 440 nm
NTOIN	-	18,4 $\pm$ 1,0	35 μM NTOIN, 178 μM NADH, % 4 DMSO, 50°C, 420 nm
4-NBA	-	2,8 $\pm$ 0,2	50 μM 4-NBA, 114 μM NADH, % 0,5 DMSO, 37°C, 340nm
2-NT	0,9 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	50 μM 2-NT, 150 μM NAD(P)H, % 5 DMSO, 42°C, 340nm
3-NT	0,1 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,1	50 μM 3-NT, 150 μM NAD(P)H, % 5 DMSO, 42°C, 340nm
4-NT	0,7 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	50 μM 4-NT, 150 μM NAD(P)H, % 5 DMSO, 42°C, 340nm
2,4-DNT	3,2 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4	50 μM 2,4-DNT, 150 μM NAD(P)H, % 5 DMSO, 42°C, 340nm
2,6-DNT	0,5 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,0	50 μM 2,6-DNT, 150 μM NAD(P)H, % 5 DMSO, 42°C, 340nm
TNT	9,6 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,0	50 μM TNT, 150 μM NAD(P)H, % 5 DMSO, 42°C, 340nm

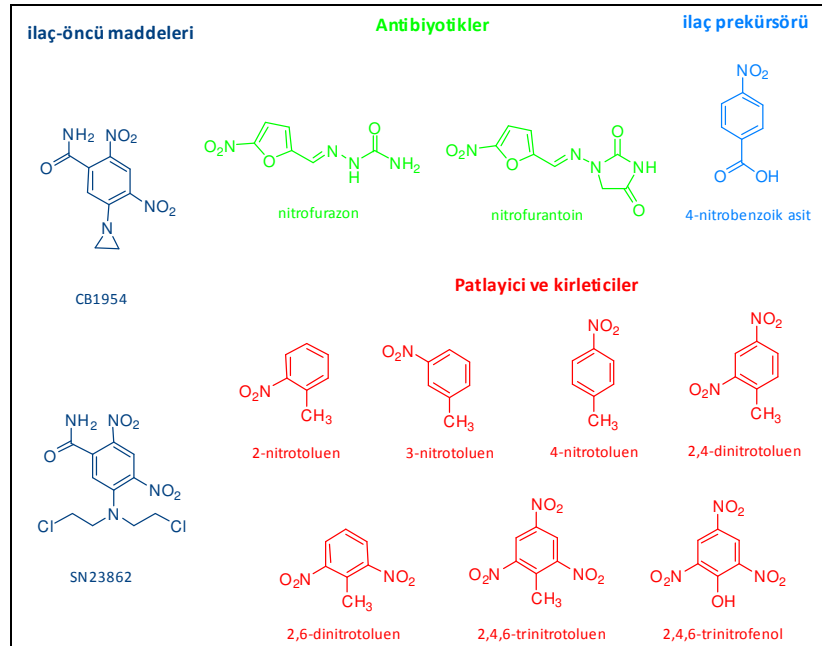
Tablo 4.3: Devam.

Substrat	Enzim aktivitesi $\mu\text{mol/dk/mg}$		Açıklama
	NADPH	NADH	
PA	0,6 $\pm$ 0,0	ND	50 μM PA, 150 μM NAD(P)H, % 5 DMSO, 42°C, 340nm

Tablo 4.3'te verilen enzim aktivitesinin bir ünitesi 1 mg enzim tarafından 1 dakikada kofaktörün (oksidasyonu) veya substratın (indirgenmesi) μmol olarak dönüşümünü ifade etmektedir. Enzimatik reaksiyon 25 mM tris/Cl (pH 8,3-8,5) tamponunda gerçekleştirildi.

4.1.7. GkNtrA'nın Substrat Seçiciliği

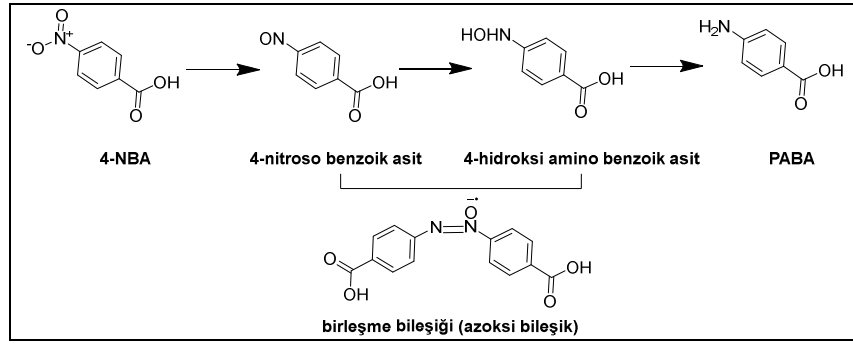
GkNtrA'nın substrat seçiciliğinin belirlenmesinde antibiyotikler ve ilaç prekürsörü, patlayıcı ve kirleticilerden oluşan bir seri nitroaromatik bileşik ile çalışıldı (Şekil 4.20). Nitroaromatik bileşiklerin nitroredüktaz katalizli indirgenmesiyle nitroso, hidroksilamin ve amin türevi bileşikler oluşmakta ve bununla birlikte azoksi türevi birleşme ürünleri de yan ürün olarak oluşabilmektedir [117].



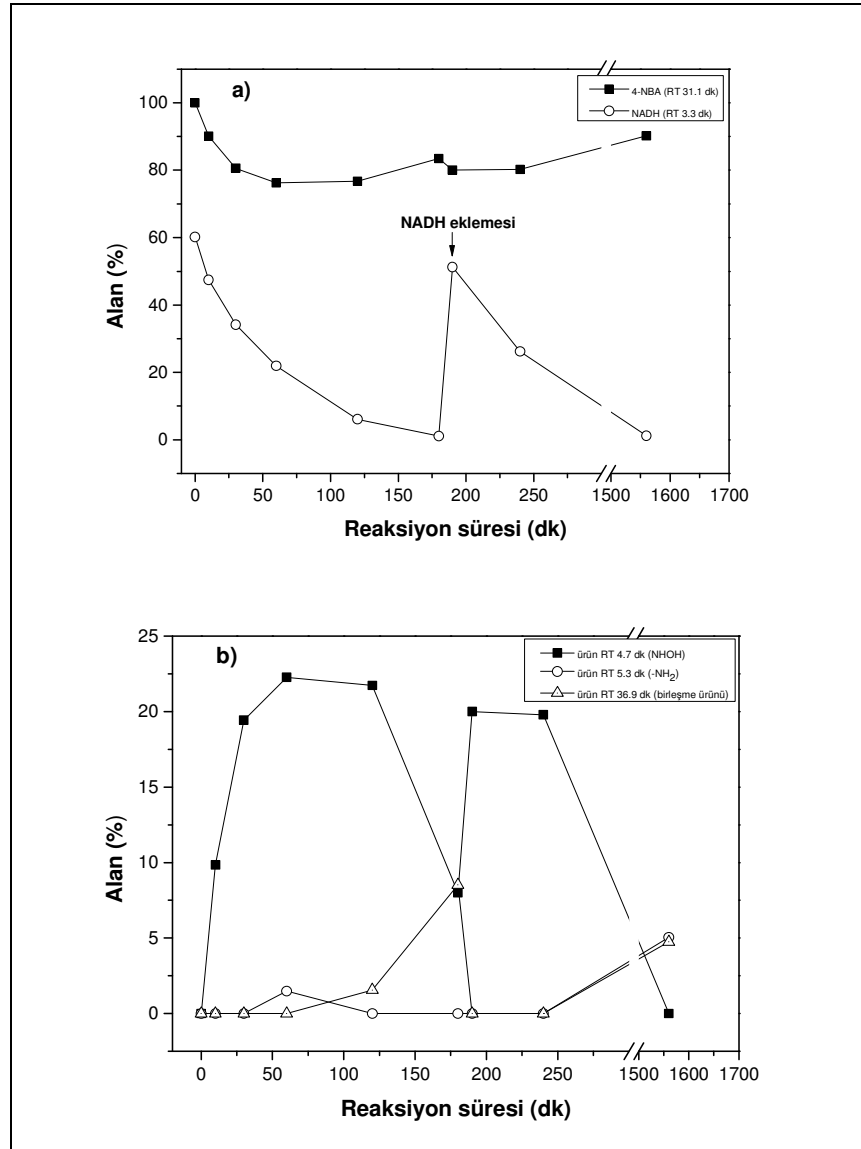
Şekil 4.20: GkNtrA'nın substrat seçiciliğinin belirlenmesinde kullanılan bileşikler ve açık yapıları.

4-NBA, amino ester grubuna sahip lokal anestezi ilaçlarından “Procaine” ve folik asitin prekürsörü olan organik bir bileşiktir. 4-NBA’nın indirgenmiş formu PABA çeşitli mikroorganizmaların büyümesini artırmaktadır. Bazı mikroorganizmaların anaerobik metabolizmaları için ise esansiyel bir bileşik olmakla birlikte bakteriyel vitamin H ve sulfonamid ilaçların antagonisti olarak bilinmektedir. Kullanım alanlarında ise özellikle ilaç endüstrisi öne çıkmakla birlikte besin takviyesi olarak ve poliüretan ve boyaların çapraz bağlanmasında ajan olarak kullanılmaktadır [118].

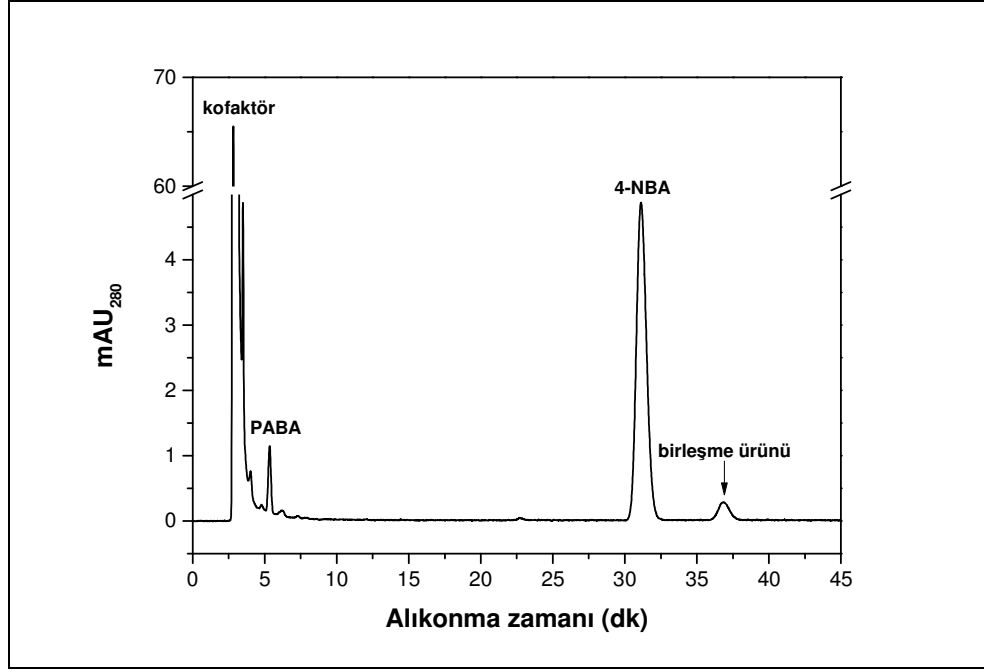
4-NBA’nın GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu temel olarak üç ürünün oluştuğu HPLC analizlerinde gözlemlendi. Kofaktörün yaklaşık 3 saat sonra bittiği önceki çalışmalardan bilindiği için reaksiyonun 3. saatinden sonra tekrar NADH ilavesi yapıldı. Kofaktörün ilavesiyle birlikte 4,7 dk’da gelen pik miktarının tekrar artışı ve 36,9 dk’da gelen pikin de azalışı gözlemlendi. Süreye bağlı olarak oluşan tüm ürünlerin, substrat ve kofaktörün miktarındaki değişim Şekil 4.22’de gösterildi. İlk oluşan ve 4,7 dakika alıkonma süresine sahip ürünün daha sonra miktarının azalmasına ve PABA’dan önce kolondan gelmesine dayanılarak 4-hidroksi amino benzoik asit olduğu düşünülmektedir. Daha önce yapılmış bir çalışmada yine 4-NBA’nın nitroredüktaz katalizli indirgenmesinin C18 kolonda analizi yapılmış ve 4-hidroksi amino benzoik asit, PABA ve 4-NBA sırasıyla kolondan geldiği görüldü. Ayrıca söz konusu çalışmada 4-NBA, enzimatik olarak sadece hidroksilamin basamağına kadar indirgenebildi amine indirgemek için çeşitli indirgeyici ajanlar kullanıldı [119]. PABA standart olarak kullanılmak üzere Sigma’dan temin edildi ve HPLC analizi sonucu 5,3 dk alıkonma süresinde kolonda tespit edildi. Reaksiyonun 26. saatinde de 5,3 dakikada gelen pik gözlemlenmiş ve standart ile karşılaştırıldığında aynı alıkonma süresinde gelmesi sebebiyle bu pikin 4-NBA’nın amine kadar indirgenmiş formu olan PABA’ya ait olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.23). 4-NBA’ten daha sonra kolondan gelen yani daha apolar bir bileşik olması beklenen diğer bir ürünün (alıkonma süresi 36,9 dk) nitroso ve hidroksilamin bileşiklerinin spontane olarak birleşmesi sonucu oluşan azoksi bileşiği olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: 4-NBA'nın ve indirgeme ürünlerinin açık yapısı.

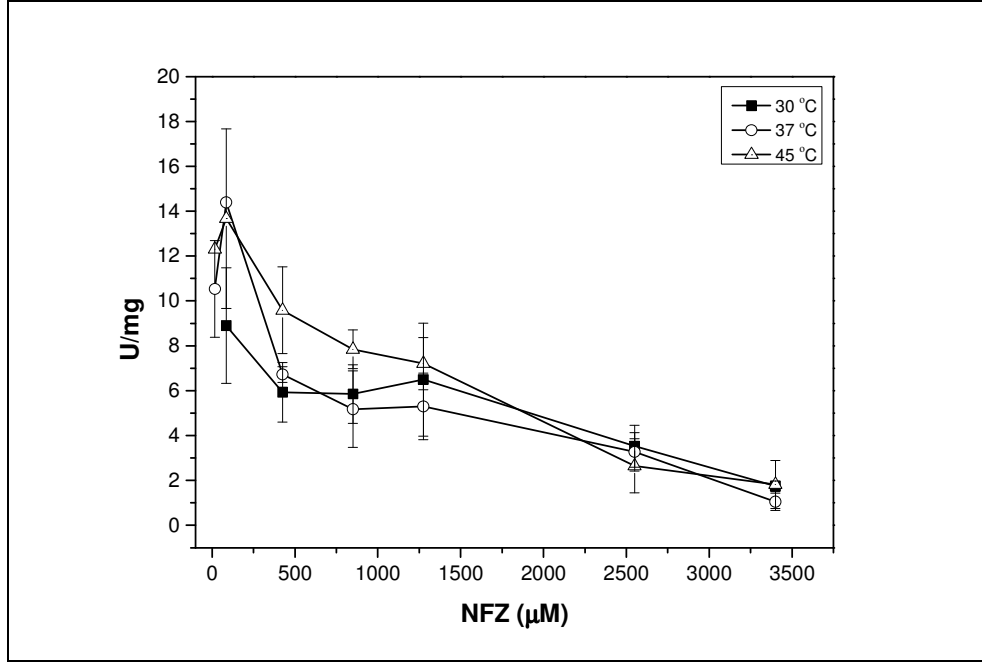


Şekil 4.22: 4-NBA'nın GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı a) substrat ve kofaktör azalışı ve b) ürün oluşumu. Reaksiyon 50 μ M 4-NBA, 0,6 μ g/ml GkNtrA ve 110 μ M NADH % 0,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 45°C'de gerçekleştirildi. % Alan HPLC verilerine göre hesaplandı.

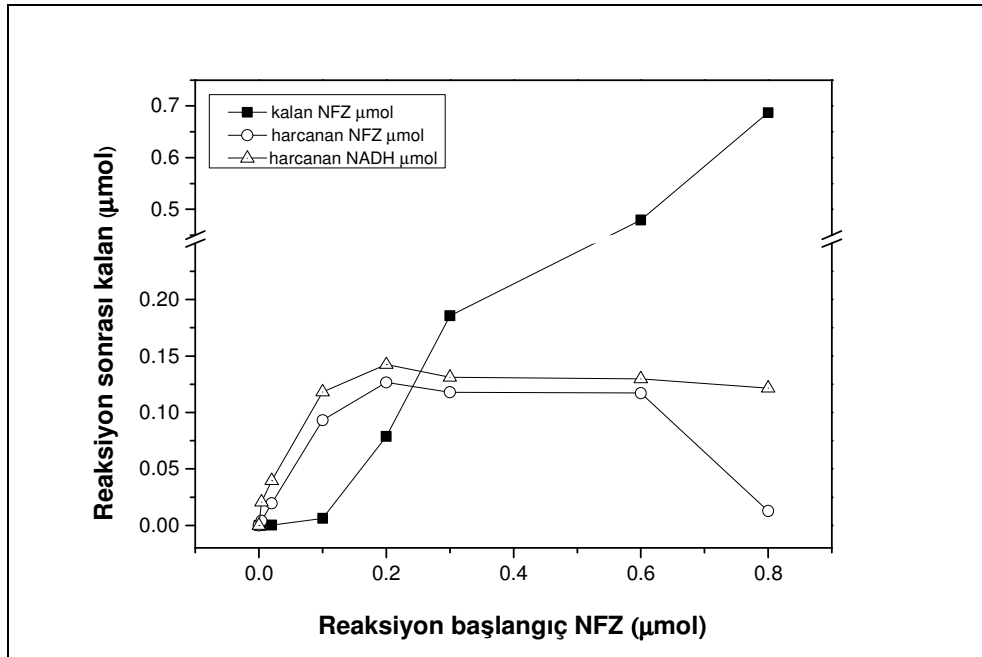


Şekil 4.23: 4-NBA'nın GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun 26. saatine ait HPLC kromatogramı. Reaksiyon 50 μ M 4-NBA, 0,6 μ g/ml GkNtrA ve 110 μ M NADH % 0,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 45°C'de gerçekleştirildi.

NFZ ve NTOIN'nin GkNtrA ile indirgenmesine yönelik çalışmalarda elde edilen sonuçlarda her iki substrat ile de substrat konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak enzim aktivitesinde azalış gözlemlendi. NFZ model substrat olarak seçilerek farklı sıcaklıklarda aktivite ölçümü (NFZ azalışı takip edilerek) gerçekleştirilmiş ve aynı örneklerin HPLC analizleri de yapılarak kinetik sonuçlarla HPLC sonuçları karşılaştırıldı. Reaksiyonun başlangıç hızı ölçülerek hesaplanan spesifik aktivite değerleri her üç sıcaklık değeri için de birbirine yakın olarak gözlemlendi ve daha önceki deneylerde görüldüğü gibi NFZ konsantrasyonu arttıkça aktivitenin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.24). HPLC'den alınan sonuçlara göre 13 dakikalık reaksiyon sonucunda harcanan ve geriye kalan substrat ve harcanan NADH miktarları grafiğe geçirilmiş ve buna göre reaksiyonda NADH'ın NFZ'ye oranla biraz daha fazla olmakla birlikte neredeyse bire bir oranında harcanıldığı gözlenmektedir. 0,6 μ mol (2250 μ M) NFZ'den sonra NFZ harcanmasının azaldığı ancak bunun NADH'e yansımadağı gözlemlendi (Şekil 4.25).

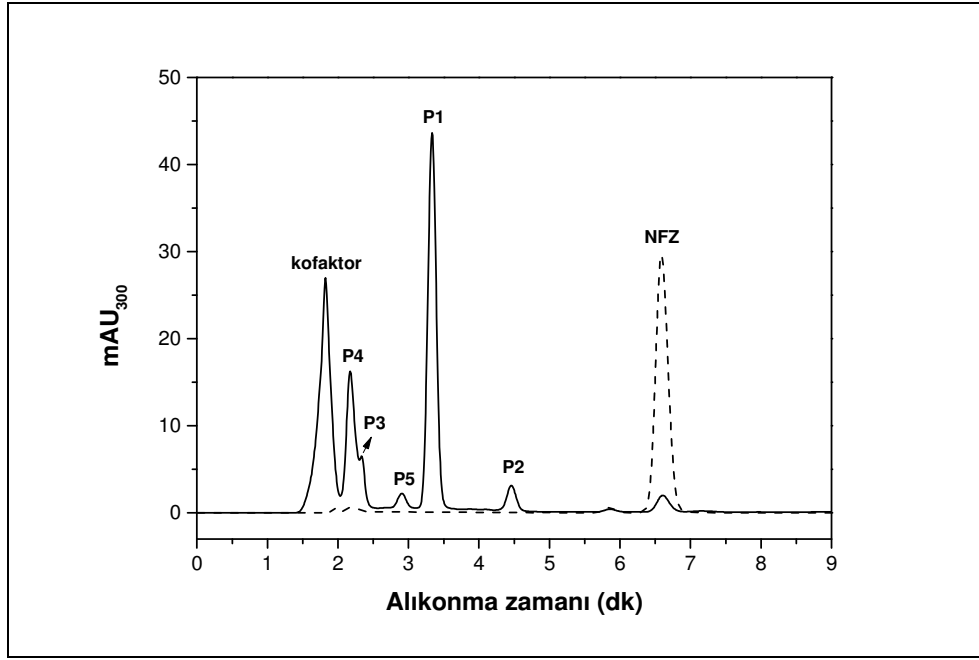


Şekil 4.24: Artan NFZ konsantrasyonuna karşı farklı sıcaklıklarda ölçülen GkNtrA'nın spesifik aktivitesi. Reaksiyon 0-0,8 μmol NFZ, 6 $\mu\text{g/ml}$ GkNtrA ve 0,22 μmol NADH % 8,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,2 tris/Cl tamponunda 30, 37 ve 45°C'de gerçekleştirilmiş olup 440 nm'de NFZ azalışı takip edildi.



Şekil 4.25: NFZ'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunda başlangıç ve reaksiyon sonrası NFZ ve NADH'in miktar değişim grafiği. Reaksiyon 0-0,8 μmol NFZ, 6 $\mu\text{g/ml}$ GkNtrA ve 0,22 μmol NADH % 8,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,2 tris/Cl tamponunda 30°C'de 13 dk süresince gerçekleştirildi.

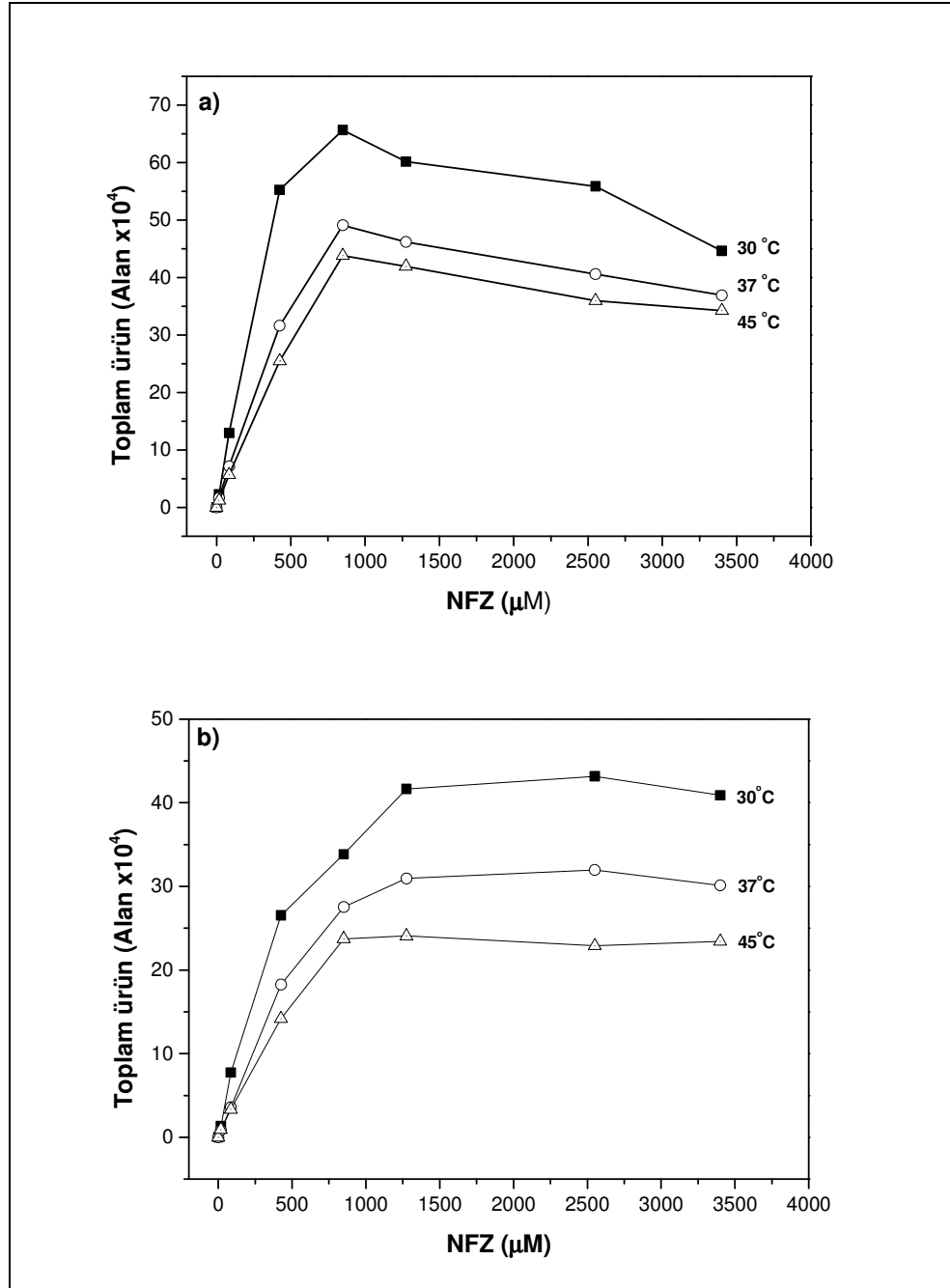
NFZ'nin GkNtrA katalizli enzimatik indirgenmesi sonucu başlıca bir ürün (Alıkonma zamanı 3,3 dk) oluşmaktadır (Şekil 4.26). Bu ürün alıkonma zamanı olarak daha önce Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilip karakterize edilen hidroksilamin ürününe denk gelmektedir [9]. 6,6 dk alıkonma süresinde NFZ; 1,8 dk alıkonma süresinde NADH kolonda görüldü. Ayrıca 2,2 dk, 2,9 dk ve 4,5 dk alıkonma sürelerinde gelen pikler ise minör ürünler olarak adlandırıldı.



Şekil 4.26: NFZ'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. Reaksiyon 500 μ M NFZ, 6 μ g/ml GkNtrA ve 1090 μ M NADH % 8,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,2 tris/Cl tamponunda 30°C'de 13 dk süreyle gerçekleştirildi.

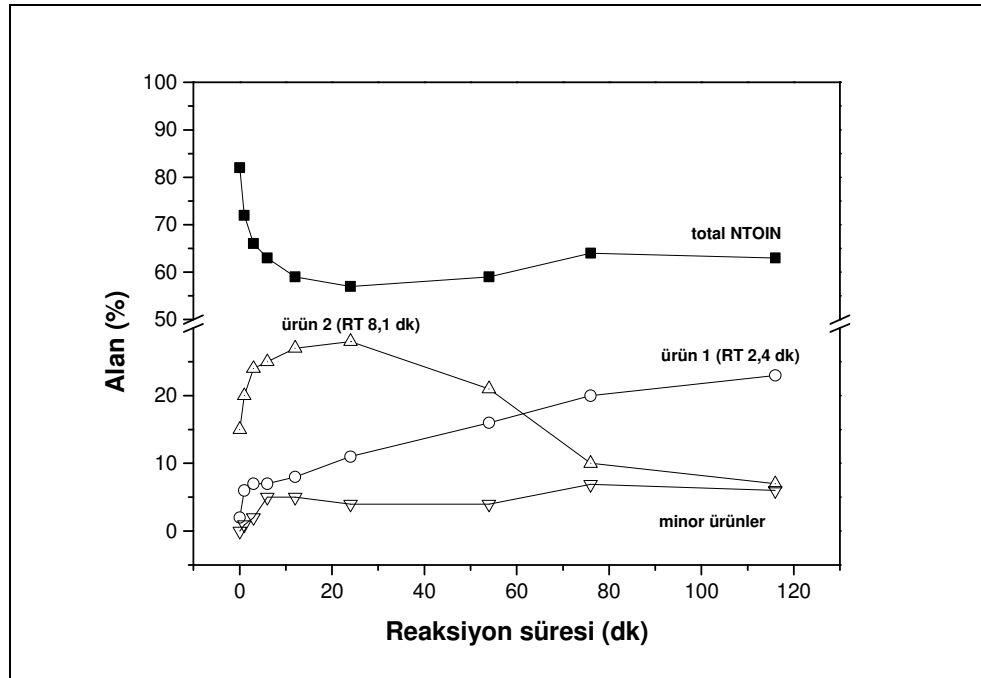
Ürünlerin tamamı bir bütün olarak düşünülüp artan NFZ konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildiğinde; 13 dakikalık reaksiyonda çalışılan üç sıcaklık değerinde de (30, 37 ve 45°C) NFZ artışına bağlı olarak belirli bir noktaya kadar ürün miktarı artmış sonrasında azaldı (Şekil 4.27 (a)). 30 dakikalık reaksiyonda ise hiperbolik bir eğri görülmekte 13 dakikalık reaksiyondan farklı olarak yüksek substrat konsantrasyonunda ürün miktarında azalış gözlenmedi (Şekil 4.27 (b)). Reaksiyon süresi uzadıkça ürün oluşumunu etkileyen faktörün (substratın inhibisyon ve/veya radikal oluşumu) de etkisinin azaldığı gözlemlendi. Her iki süre çalışmasında da sıcaklık

arttıkça oluşan ürün miktarı azaldı. Bu durum sıcaklığın yükselmesinin ürün oluşumu üzerine negatif bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

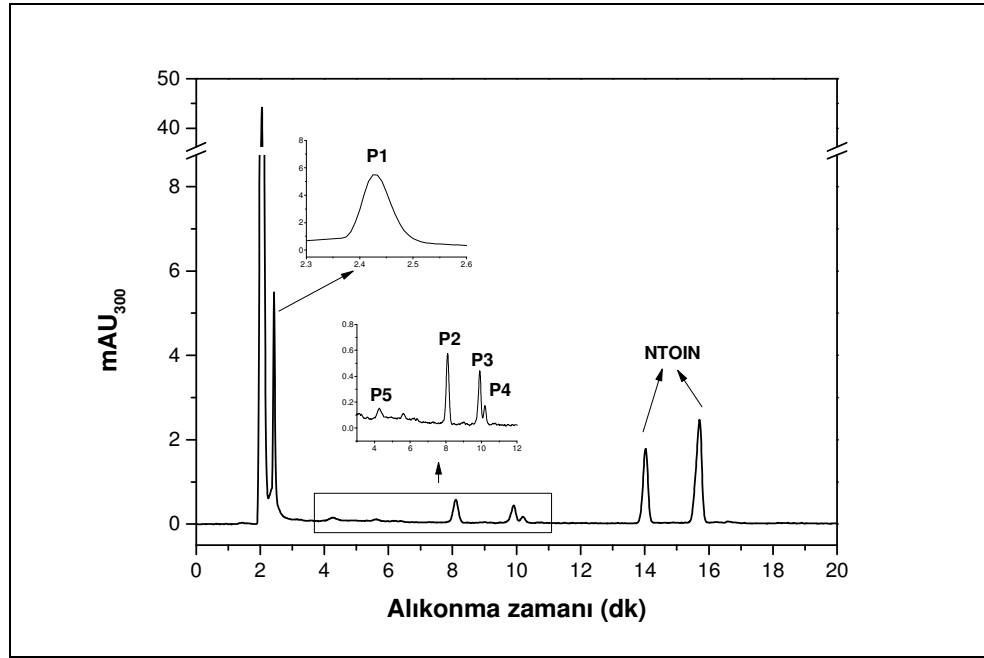


Şekil 4.27: NFZ'nin GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu oluşan toplam ürünlerin sıcaklığa ve artan NFZ konsantrasyonuna göre değişimi a) 13 dakikalık reaksiyon b) 30 dakikalık reaksiyon. Reaksiyon 0-3400 μM NFZ, 6 μg/ml GkNtrA ve 1090 μM NADH % 8,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,2 tris/Cl tamponunda 30, 37 ve 45°C'de gerçekleştirildi.

NTOIN'nin indirgenme reaksiyonunda iki farklı enzim konsantrasyonunda (10 kat fark) çalışıldı. Enzim konsantrasyonu 10 kat yüksek olan reaksiyonda enzim ilave edilir edilmez (0. dk örneği) substratın neredeyse 2/3'ünün tükendiği ve 1 dakika sonra tamamen bittiği görülürken enzim konsantrasyonu düşük reaksiyonda 24. dakikada sadece % 43'ünün tükendiği ve 116. dakikaya kadar izlenen reaksiyonda da substratta daha fazla azalışın görülmeyerek reaksiyonun sabit kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.28). GkNtrA NTOIN'i substrat olarak kabul etmiş ve başlıca alıkonma süresi 2,4 dk ve 8,1 dk olmak üzere iki ürün oluştuğu gözlemlendi. Bunun yanında birden çok küçük pikler oluşmuş ve bunların toplamı da minör ürünler olarak adlandırıldı (Şekil 4.29). 2,4 dk'da gelen ürün reaksiyonun ilk dakikalarında hızlı bir artış göstermiş ve artış hızı azalsa da ürün miktarı artmaya devam ettiği gözlemlendi. Alıkonma süresi 8,1 dk olan ürün de ise bu ürün miktarının reaksiyonun 24. dakikasından sonra sürekli azaldığı gözlemlendi. Minör ürünler de başta artıştan sonra neredeyse sabit kaldıkları gözlemlendi.

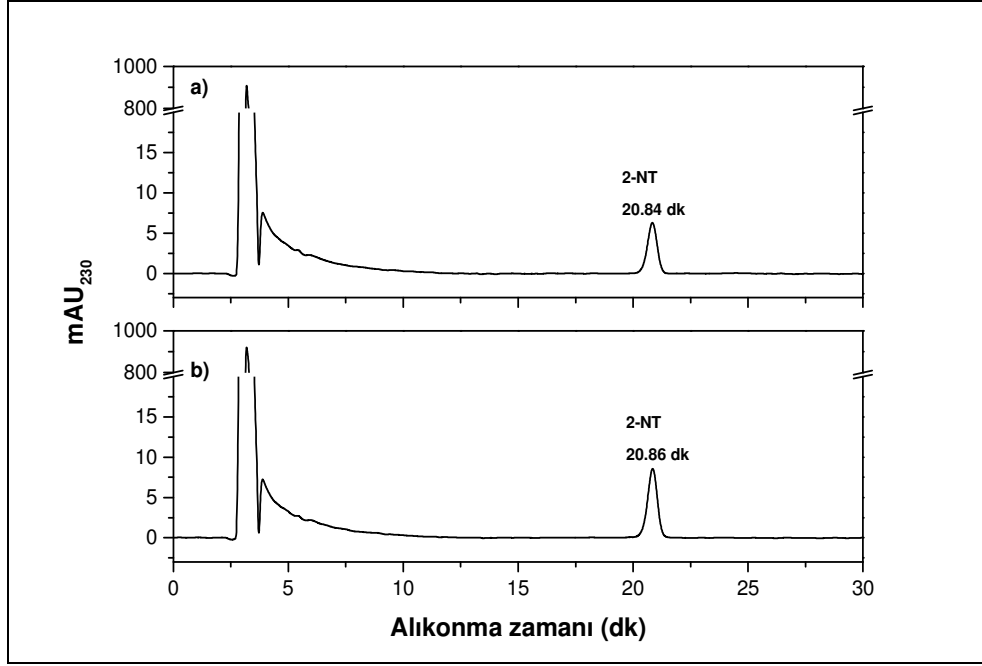


Şekil 4.28: NTOIN'in GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı substrat azalışı ve ürün oluşumu. Reaksiyon 50 μ M NTOIN, 0,52 μ g/ml GkNtrA ve 200 μ M NADH % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 45°C'de gerçekleştirildi. % Alan HPLC verilerine göre hesaplandı.

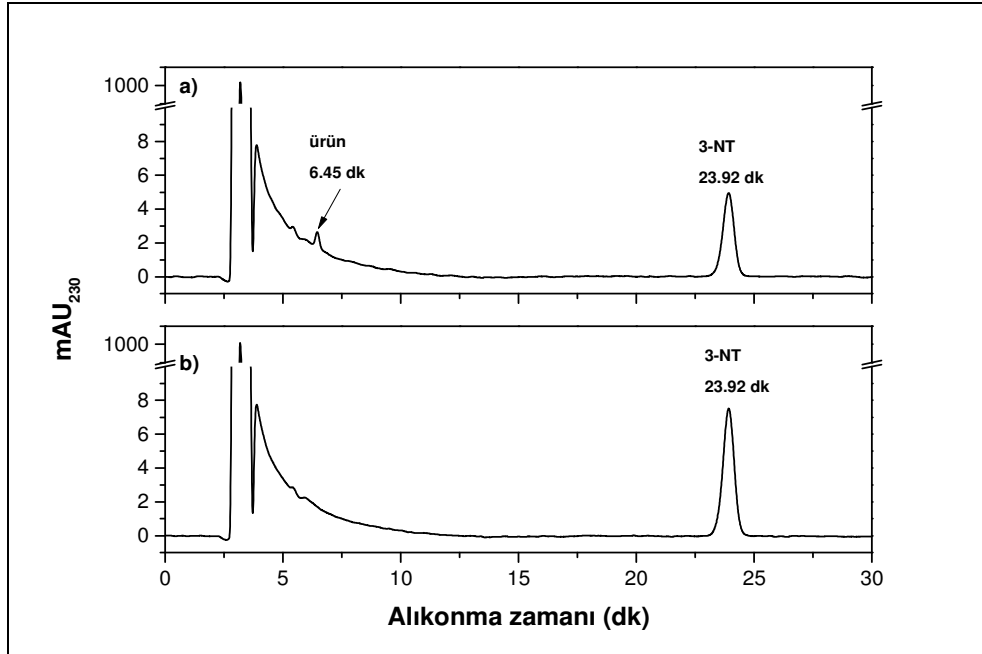


Şekil 4.29: NTOIN'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun 116. dakikasına ait HPLC kromatogramı. Reaksiyon 50 μ M NTOIN, 0,52 μ g/ml GkNtrA ve 200 μ M NADH % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 45°C'de gerçekleştirildi.

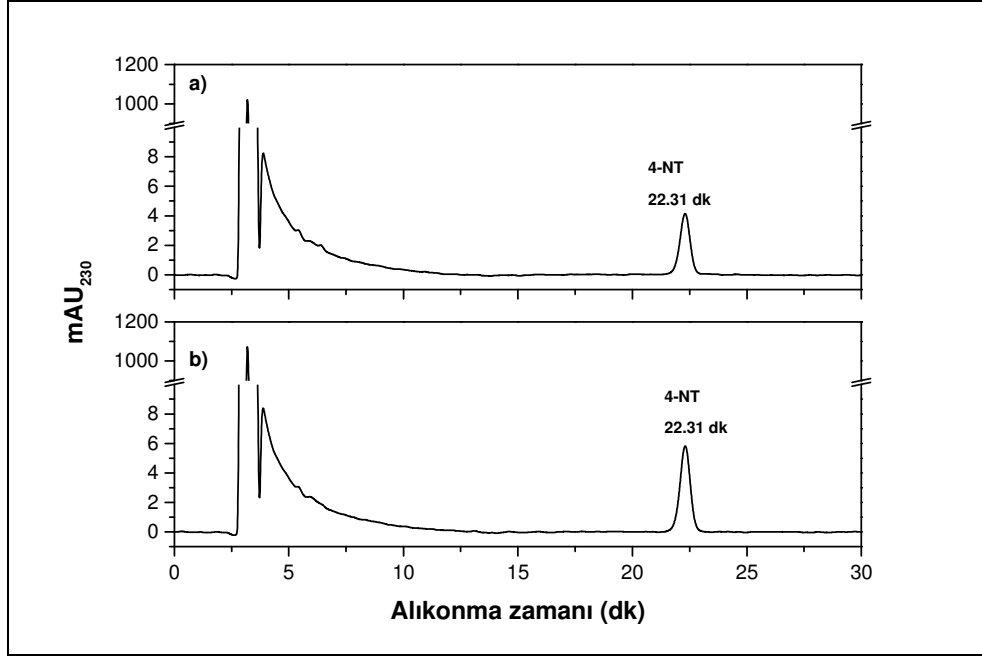
2-NT, 3-NT, 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, TNT ve pikrik asitin ikili enzim sistemi (GkNtrA/FDH) ile gerçekleştirilen indirgenme reaksiyonları HPLC ile takip edildi. FDH yardımcı enzimi kofaktör rejenerasyonunu sağlayarak reaksiyondaki kofaktör sınırlamasını kaldırmak amacıyla kullanıldı. 3-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT ve pikrik asitte ürün oluşumu gözlenirken 2-NT, 4-NT ve TNT'de takip edilen dalga boyunda herhangi bir ürün piki gözlenmedi (Şekil 4.30-4.36). Buna karşın bu substratların miktarlarında kontrole göre reaksiyonlarda sırasıyla % 28, % 32 ve % 35 azalma tespit edildi. 2-NT, 4-NT ve TNT'nin kolonda alıkonma süreleri sırasıyla 20,8 dk, 22,3 dk ve 13,6 dk'dır. Bu üç substratın GkNtrA katalizli reaksiyon sunucunda HPLC kromatogramında herhangi bir ürün gözlenmezken UV-Vis spectrum taramasında NADH'nin belirgin bir biçimde zamanla azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.13-4.19). Bu durumda ya enzim kofaktörü ürün oluşturmaksızın harcamakta ya da oluşan ürünler ölçtüğümüz dalga boyunda takip edilememektedir. Bazı nitroredüktazların NADH oksidaz aktivitesinden söz edilmektedir. GkNtrA'nın da böyle bir aktivitesi olabilir bu durumda enzim herhangi bir indirgenme ürünü oluşturmaksızın indirgenmiş kofaktörü okside ediyor olabilir. Ayrıca literatürde geçen NADH oksidaz aktivitesi olan NTR'la yapılan reaksiyonlarda H₂O₂ oluşumu gözlemlendi [116].



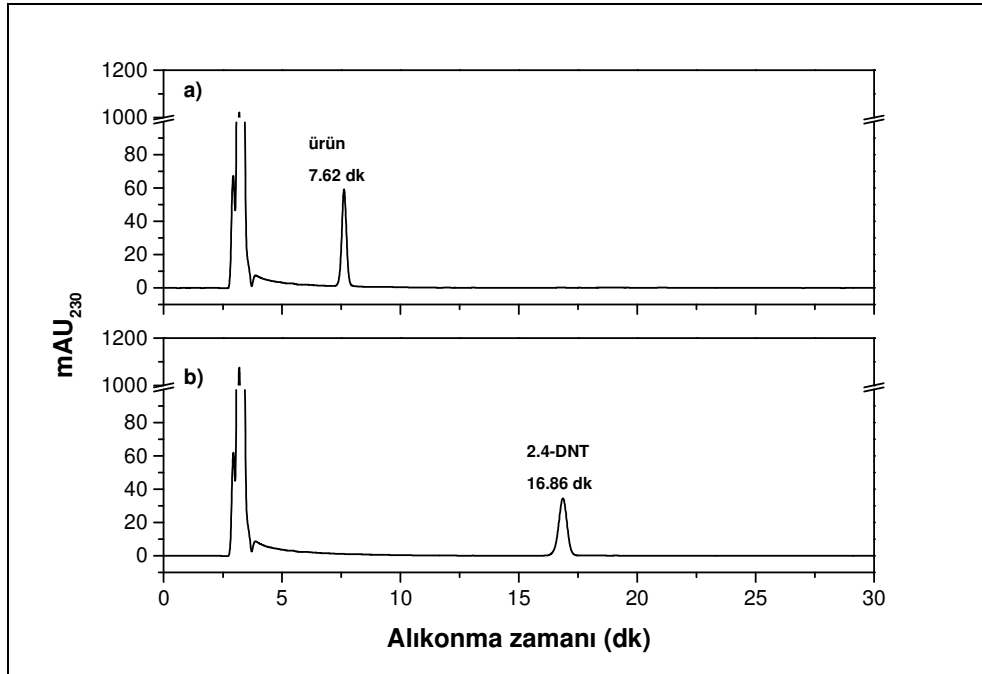
Şekil 4.30: 2-NT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. a) Reaksiyon; 98 μ M 2-NT, 21 μ g/ml FDH, 49 mM amonyum format, 98 μ M NADP⁺, 10 μ M NADPH, 4 μ g/ml GkNtrA ve % 5 DMSO içeren 24 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 37°C'de 30 dk süreyle gerçekleştirildi. b) Kontrol; GkNtrA hariç reaksiyondaki bileşenleri içermektedir.



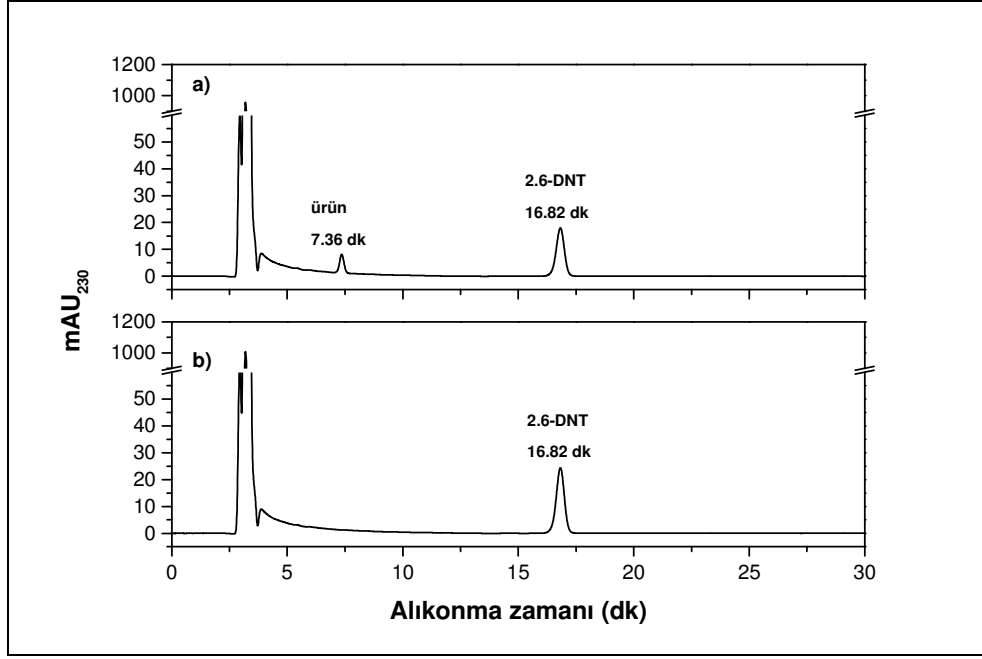
Şekil 4.31: 3-NT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. a) Reaksiyon; 98 μ M 3-NT, 21 μ g/ml FDH, 49 mM amonyum format, 98 μ M NADP⁺, 10 μ M NADPH, 4 μ g/ml GkNtrA ve % 5 DMSO içeren 24 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 37°C'de 30 dk süreyle gerçekleştirildi. b) Kontrol; GkNtrA hariç reaksiyondaki bileşenleri içermektedir.



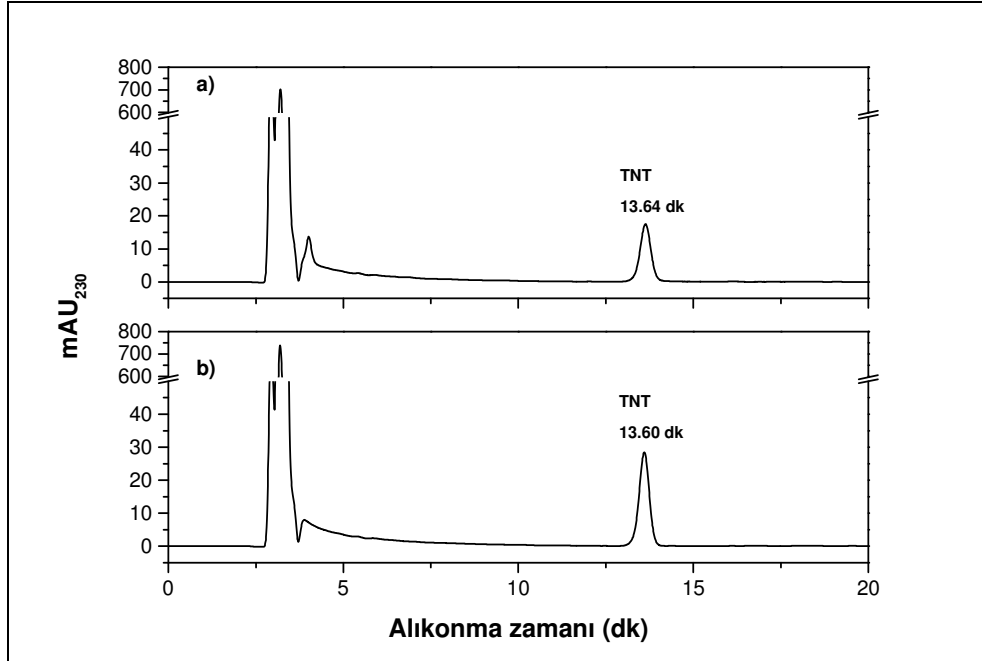
Şekil 4.32: 4-NT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. a) Reaksiyon; 98 μ M 4-NT, 21 μ g/ml FDH, 49 mM amonyum format, 98 μ M NADP⁺, 10 μ M NADPH, 4 μ g/ml GkNtrA ve % 5 DMSO içeren 24 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 37°C'de 30 dk süreyle gerçekleştirildi. b) Kontrol; GkNtrA hariç reaksiyondaki bileşenleri içermektedir.



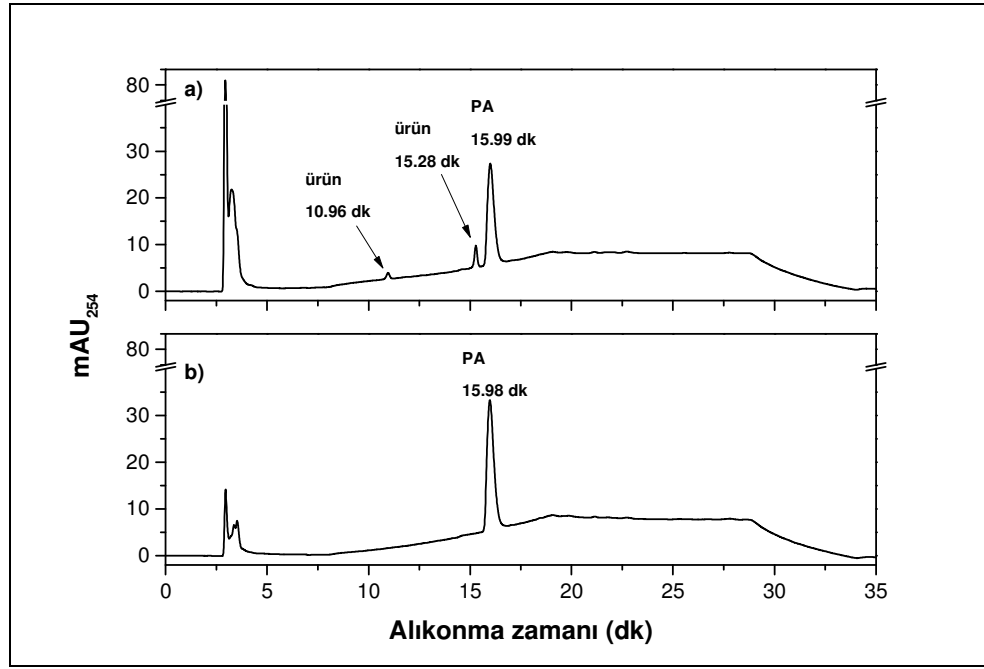
Şekil 4.33: 2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. a) Reaksiyon; 98 μ M 2,4-DNT, 21 μ g/ml FDH, 49 mM amonyum format, 98 μ M NADP⁺, 10 μ M NADPH, 4 μ g/ml GkNtrA ve % 5 DMSO içeren 24 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 37°C'de 30 dk süreyle gerçekleştirildi. b) Kontrol; GkNtrA hariç reaksiyondaki bileşenleri içermektedir.



Şekil 4.34: 2,6-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. a) Reaksiyon; 98 μ M 2,6-DNT, 21 μ g/ml FDH, 49 mM amonyum format, 98 μ M NADP⁺, 10 μ M NADPH, 4 μ g/ml GkNtrA ve % 5 DMSO içeren 24 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 37°C'de 30 dk süreyle gerçekleştirildi. b) Kontrol; GkNtrA hariç reaksiyondaki bileşenleri içermektedir.



Şekil 4.35: TNT'in GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. a) Reaksiyon; 98 μ M TNT, 21 μ g/ml FDH, 49 mM amonyum format, 98 μ M NADP⁺, 10 μ M NADPH, 4 μ g/ml GkNtrA ve % 5 DMSO içeren 24 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 37°C'de 30 dk süreyle gerçekleştirildi. b) Kontrol; GkNtrA hariç reaksiyondaki bileşenleri içermektedir.

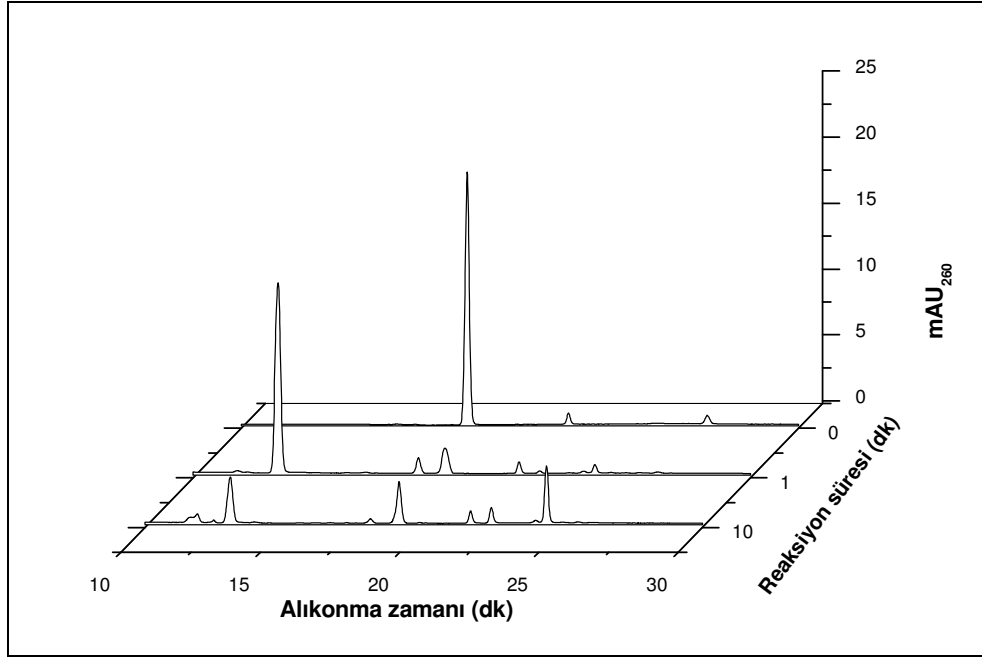


Şekil 4.36: PA'nın GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait HPLC kromatogramı. a) Reaksiyon; 98 μ M PA, 21 μ g/ml FDH, 49 mM amonyum format, 98 μ M NADP⁺, 10 μ M NADPH, 4 μ g/ml GkNtrA ve % 5 DMSO içeren 24 mM pH 8,5 tris/Cl tamponunda 37°C'de 30 dk süreyle gerçekleştirildi. b) Kontrol; GkNtrA hariç reaksiyondaki bileşenleri içermektedir.

4.1.8. Metabolit Karakterizasyonu

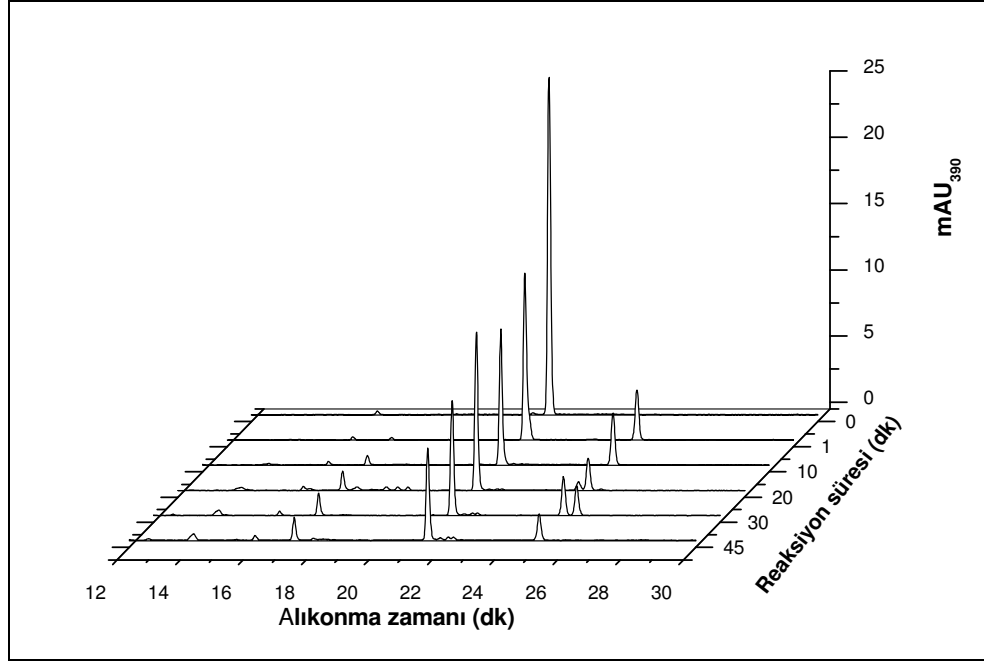
Kanser terapilerinde NTR kombinasyonlu olarak en çok kullanılan ilaç öncü bileşiklerinden CB1954 ve SN23862'nin GkNtrA katalizli indirgenmesinin ürün profili HPLC ile çalışıldı. Şekil 4.37'de HPLC kromatogramına bakıldığında 18,08 dakikada CB1954'e ait bir pik ve 13,04 dakikada 2HX [5-(aziridin-1-yl)-2-hidroksilamino-4-nitrobenzamid] ürününe ait pik görülmektedir (literatürdeki bilgilere dayanılarak) [9]. Deneysel şartları yukarıda belirtilen koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonun 1 dakika sonrasında ürün profili değiştiği ve 2HX ürünü azalırken başka ürünlerin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.37). Bu durumun büyük olasılıkla oluşan ürünün kararsız yapısından kaynaklandığı söylenebilir. CB1954'ten sonra kromatogramda görülen pikler muhtemelen nitroso ve hidroksilamin indirgeme ürünlerinin birleşmesinden oluşan azoksi bileşikleridir [120]. Literatürdeki NTR'lara bakıldığında CB1954 indirgemesinde, NfsA ailesine mensup NTR'ların sadece 2HX indirgeme ürünü oluşturdukları görülürken NfsB ailesine ait olanların büyük çoğunlukla 2HX ve 4HX

karışımı (oranları değişiklik göstermekte) veya 4HX indirgeme ürünü oluşturdukları görülmektedir [44]. CB1954'ün 4HX indirgenmiş formu daha toksik [120] olmasına karşın 2HX ile karşılaştırıldığında 2HX metabolitinin bystander etkisi daha yüksektir [68].



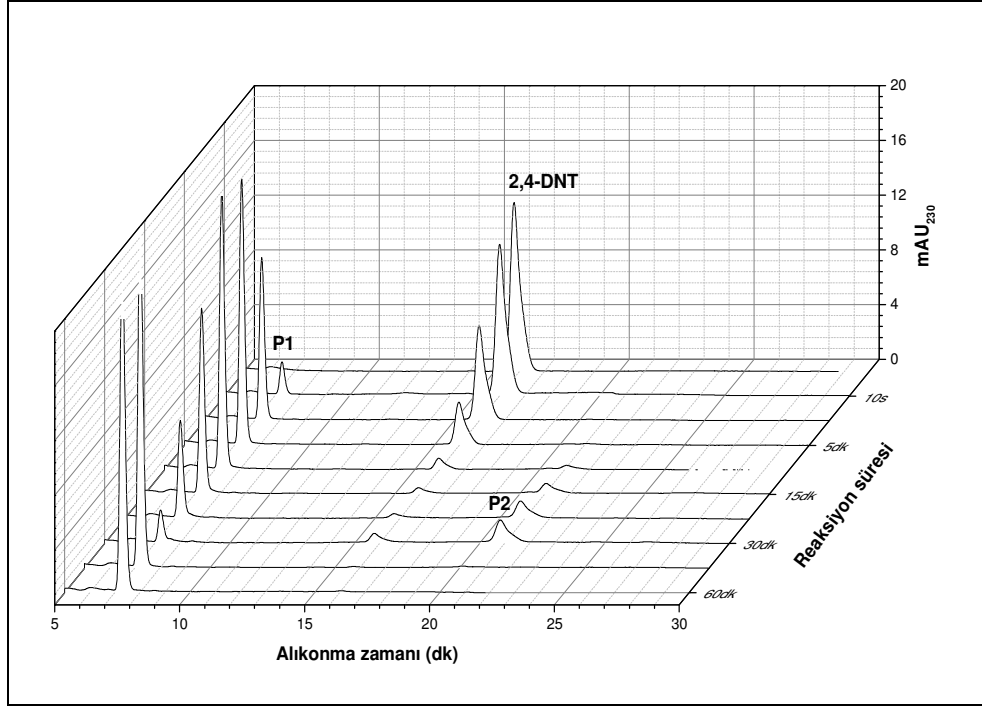
Şekil 4.37: CB1954'ün GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonunun 0, 1 ve 10. dakikalarına ait HPLC kromatogramı. Reaksiyon, % 2,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 50 μ M CB1954, 45 μ g/ml GkNtrA ve 112 μ M NADPH içermektedir. (0. dk'de kofaktör hariç diğer reaksiyon bileşenleri mevcuttur.)

SN23862'nin Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonun aksine [9] GkNtrA katalizli reaksiyon sonucunda alıkonma zamanı 25,01 dakika olan tek bir ürün oluştuğu gözlenmiş olup CB1954'te olduğu gibi reaksiyonun 1 dakika sonrasında itibaren oluşan ürünün başka ürünlere dönüştüğü gözlemlendi. SN23862'nin alıkonma zamanı 21,46 dakikadır (Şekil 4.38).



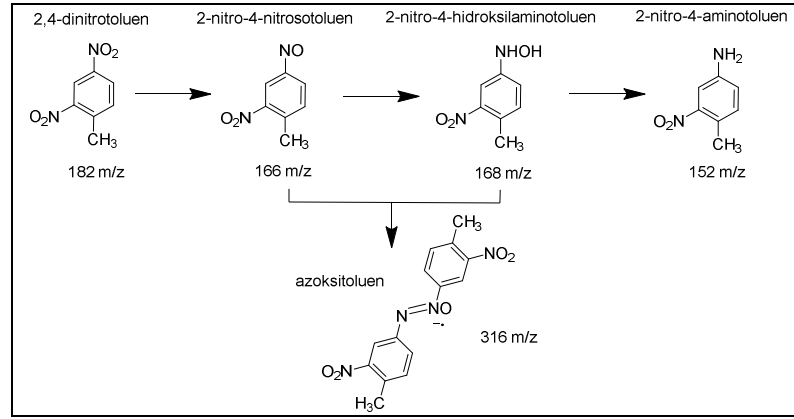
Şekil 4.38: SN23862'nin GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonunun 0, 1, 10, 20, 30 ve 45. dakikalarına ait HPLC kromatogramı. Reaksiyon, % 2,5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 25 μ M SN23862, 45 μ g/ml GkNtrA ve 112 μ M NADPH içermektedir. (0. dakikada kofaktör hariç diğer reaksiyon bileşenleri mevcuttur.)

Mono ve di-nitrotoluen bileşiklerinden GkNtrA kataliziyle indirgenme sonucu HPLC'de ürün gözlenenler arasından, metod kısmında açıkça anlatılan reaksiyon şartlarında, en yüksek verimle ürüne dönüşen substratın 2,4-DNT olduğu görüldü. Diğer nitrotoluenli bileşiklerde olduğu gibi spektruma bakıldığında net bir şekilde kofaktör azalışı gözlemlendi (Şekil 4.33). 2,4-DNT substratı model alınarak ayrıntılı reaksiyon takibi yapıldı. HPLC analizi sonucu C18 kolonda 2,4-DNT, ürün 1 ve ürün 2'nin alıkonma süreleri sırasıyla 16,0 dk, 7,2-7,3 dk ve 20,8-21,1 dk olarak gözlemlendi. Öncü çalışmalardan elde edilen bilgiyle kofaktör bitiminde reaksiyonun devamını sağlamak için 30. dakika örneği alındıktan sonra tekrar NADH ilavesi yapıldı (Şekil 4.39). Kromatogramda P1 miktarının NADH ilavesiyle tekrar artmış olarak görüldü. Bu reaksiyonun ve reaksiyonda kullanılan konsantrasyonda substratın GC-MS analizi yapıldı ancak ne substrat ne de ürün tespit edildi. Bunun sebebi olarak başlangıç maddesinin yani substratın tespit edilme limitinin altında çalışılmış olabileceği düşünüldü.



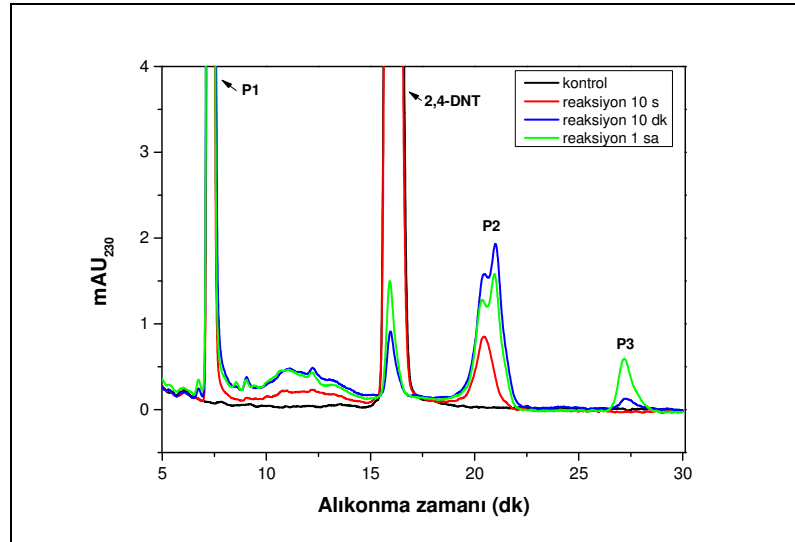
Şekil 4.39: 2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı substrat azalışı ve ürün oluşumuna ait HPLC kromatogramı. Reaksiyon 50 μ M 2,4-DNT, 3,8 μ g/ml GkNtrA ve 150 μ M NADH % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 45°C'de gerçekleştirildi. 30. dk örneği alındıktan sonra tekrar NADH eklemesi yapıldı.

Bu sebeple daha yüksek miktarda substrat kullanılarak tekrar reaksiyon yapılmış ve HPLC ile takibi de gerçekleştirildi (Şekil 4.41). Bu reaksiyonda enzim eklenir eklenmez kofaktörün neredeyse yarısının harcandığı ve 10. dakikada ise tamamen bittiği gözlemlendi (Şekil 4.43). 1 saatlik reaksiyon etil asetat ile ekstrakte edilip GC-MS analizi yapıldı. GC-MS analizinde standart madde, literatür ve NIST kütüphanesindeki karşılaştırmayla; GC kromatogramında alıkonma süresi 10,60 dk olan pikin 2,4-DNT'e, 10,71 dk olan pikin 2-nitro-4-aminotoluen ve 24,81 dk olanın ise birleşme ürünü olan azoksi bileşiği olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre HPLC kromatogramında P1 olarak adlandırdığımız pikin 4 pozisyonundaki nitro grubunun amine kadar indirgenmiş formu olan 2-nitro-4-aminotoluen olduğu ve substrattan sonra gelen P2 ürününün de nitroso ve hidroksilamin ürünlerinin kendiliğinden birleşmesi sonucu oluşan azoksi bileşiği olduğu düşünülmektedir [117], [121]. Şekil 4.44-4.47'de GC kromatogramları ve MS spektrumları verildi.

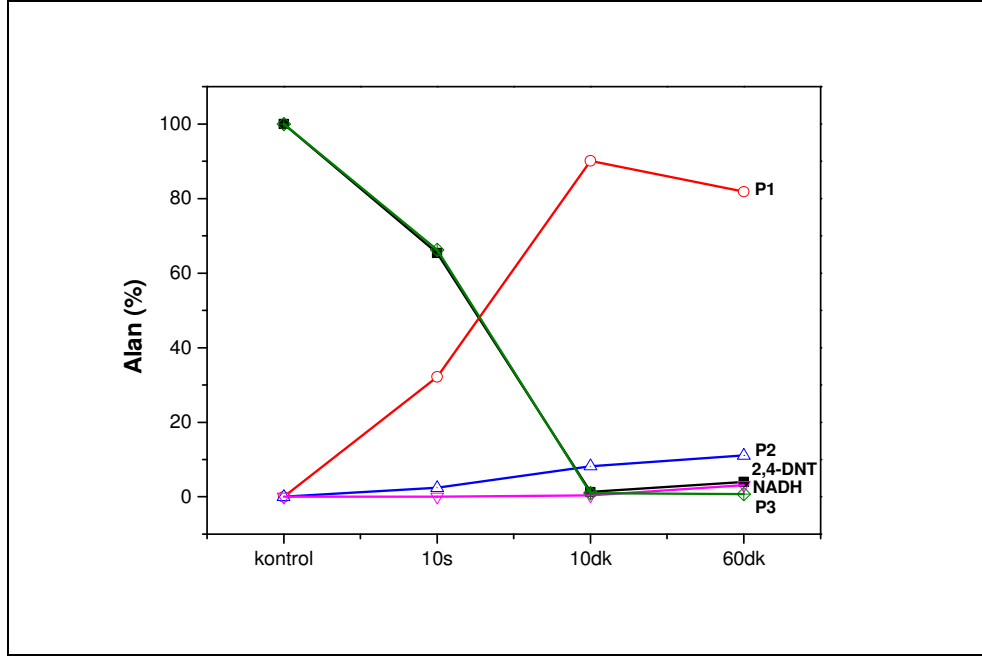


Şekil 4.40: 2,4-DNT'nin indirgenmesi sonucu oluşması muhtemel bileşikler ve kütleleri.

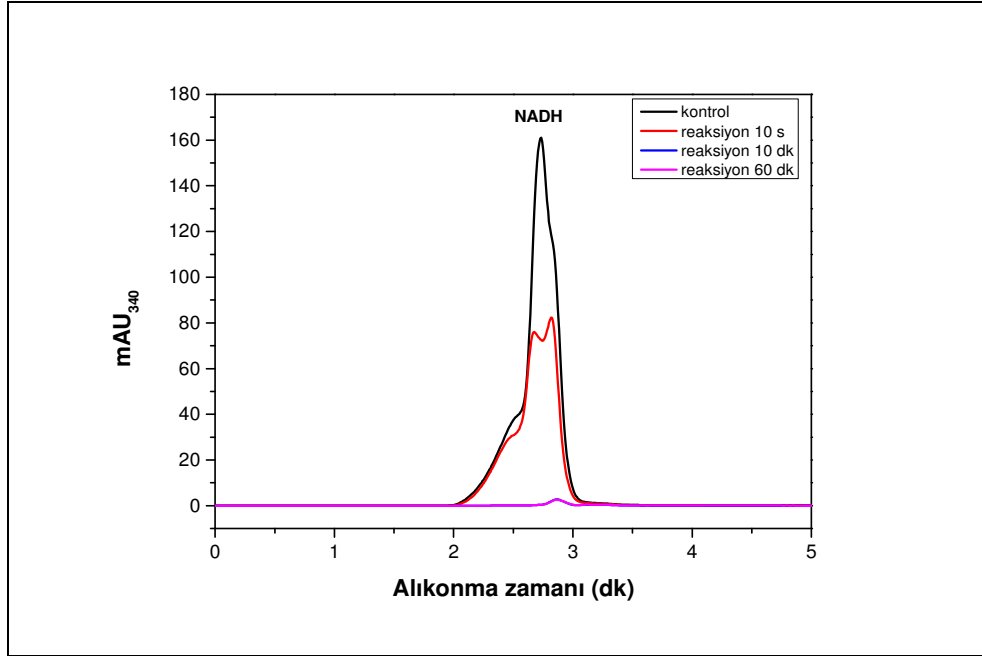
Nitroaromatik patlayıcıların ve kirleticilerin biyolojik olarak yıkımına yönelik araştırmalar günden güne artmaktadır [122-124]. 2,4-DNT'in enzimatik olarak indirgenmesinde *E. coli* NfsB nitroredüktazının bu bileşiği sadece hidroksilamin basamağına kadar indirgeyebildiği yapılan mutasyonlarla da sadece regioseçicilik yönünde değişme meydana geldiği görüldü [123]. GkNtrA hidroksilaminden amine geçen basamağı da katalizleme gücüne sahip olması bakımından önemli bir nitroredüktaz olarak öne çıkmaktadır.



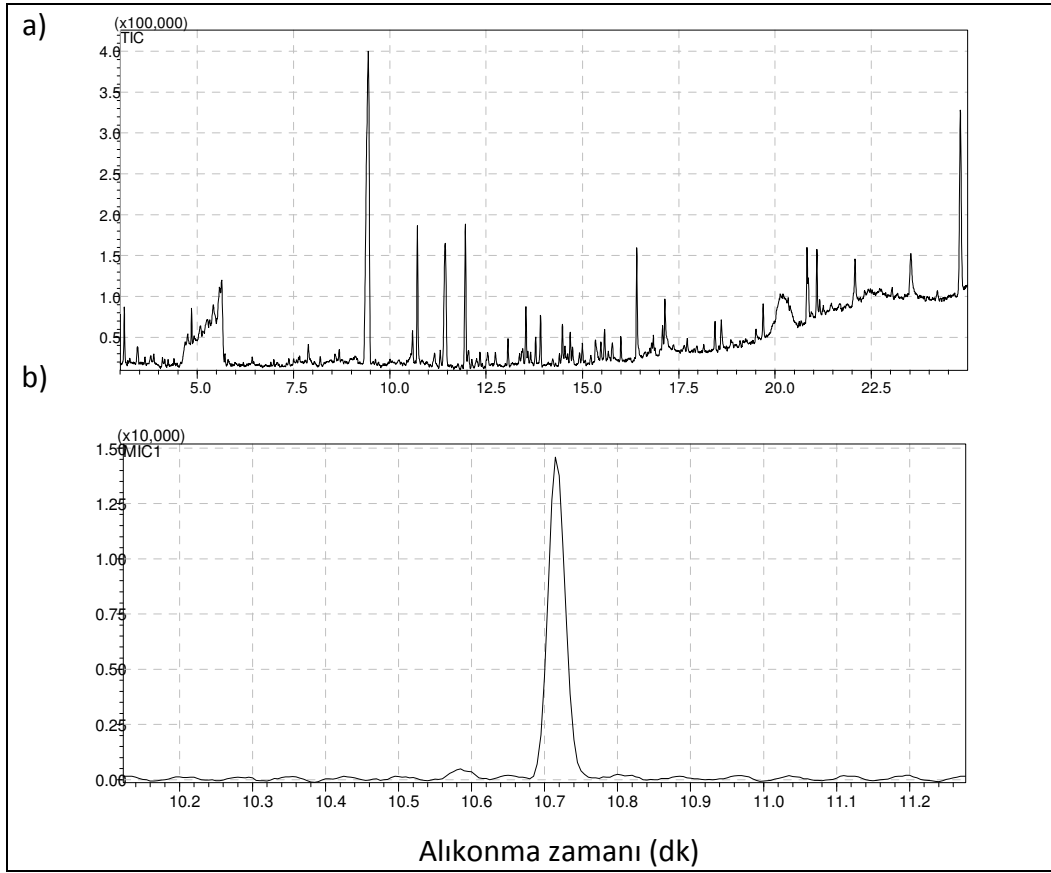
Şekil 4.41: 2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunda kontrol ve 10 s, 10 dk, 1 saatlik reaksiyona ait HPLC kromatogramı. Kontrol (TSK; GkNtrA hariç diğer bileşenler) ve 10 s, 10 ve 60. dakika örnekleri 550 μ M 2,4-DNT, 6 μ g/ml GkNtrA ve 1,7 mM NADH ve % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 44°C'de gerçekleştirildi.



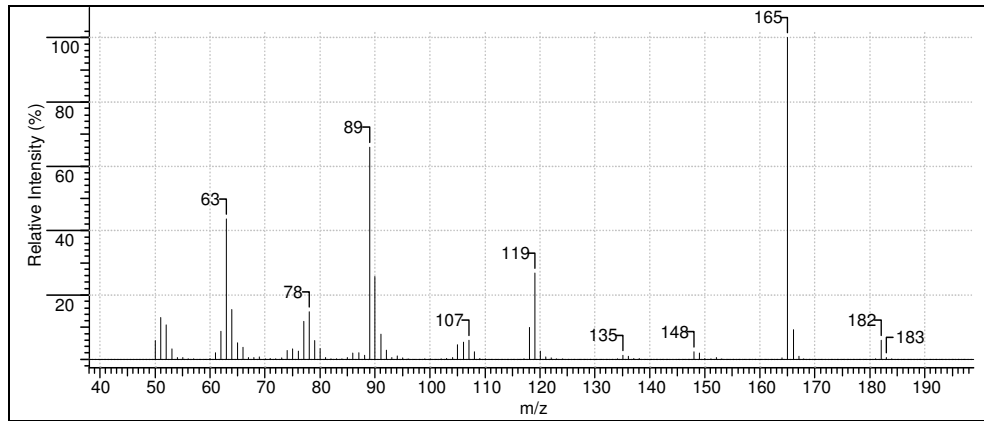
Şekil 4.42: 2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonunda reaksiyon bileşenlerinin zamana karşı % alan değişimi. Kontrol (TSK) ve 10 saniye, 10 ve 60. dakika örnekleri 550 μ M 2,4-DNT, 6 μ g/ml GkNtrA ve 1,7 mM NADH ve % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 44°C'de gerçekleştirildi. % alan hesabı HPLC datalarına göre yapıldı.



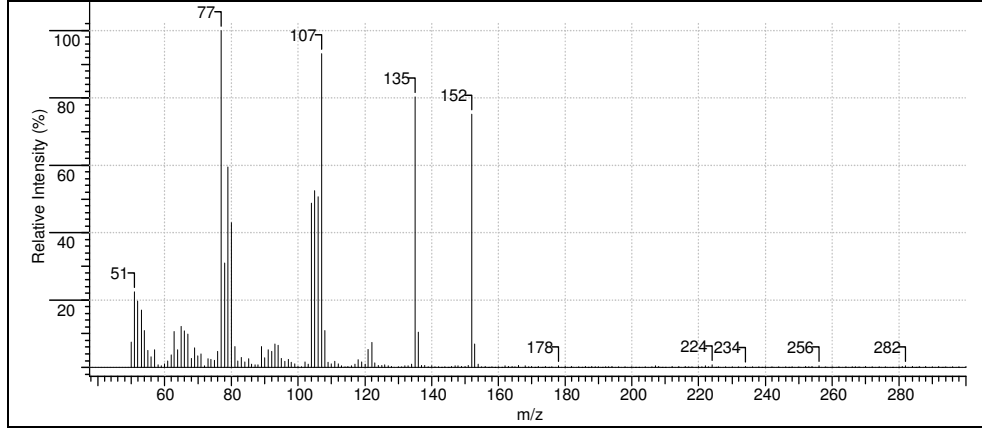
Şekil 4.43: 2,4-DNT'nin GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunda HPLC analizinde zamana karşı NADH değişimi (340 nm). Kontrol (TSK) ve 10 s, 10 ve 60. dakika örnekleri 550 μ M 2,4-DNT, 6 μ g/ml GkNtrA ve 1,7 mM NADH ve % 5 DMSO içeren 25 mM pH 8,3 tris/Cl tamponunda 44°C'de gerçekleştirildi.



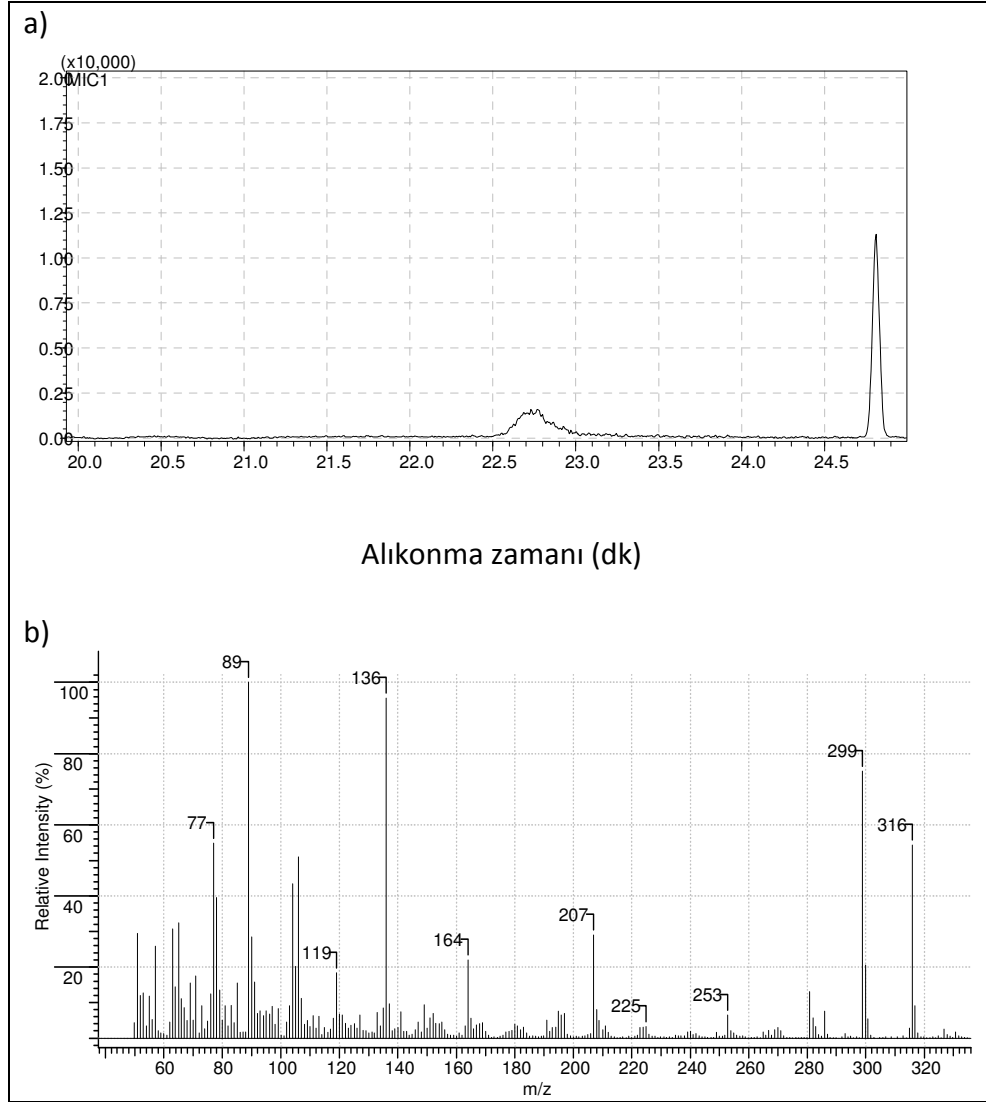
Şekil 4.44: 2,4-DNT'in GkNtrA katalizli indirgenme reaksiyonunun GC-MS analizine ait a) TIC (Total Ion Chromatogram) ve b) 182 ve 152 kütleleri seçilerek elde edilen MIC kromatogramı.



Şekil 4.45: 182 kütleli 10,60 dakika alıkonma süresinde gelen pikin (2,4-DNT) kütle spektrumu.



Şekil 4.46: 152 kütleli 10,71 dakika alıkonma süresinde gelen pikin (2-nitro-4-aminotoluen) kütle spektrumu.

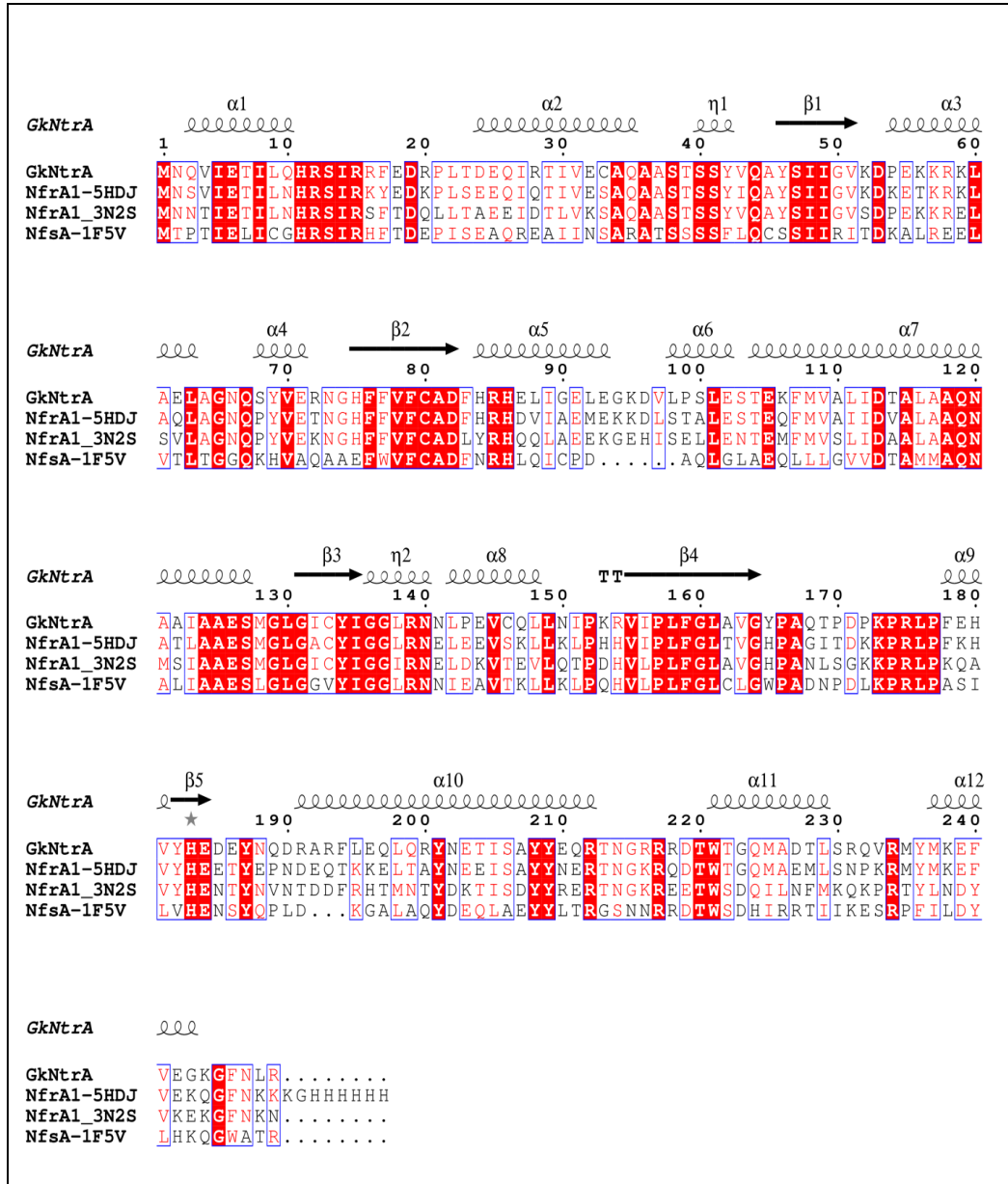


Şekil 4.47: 316 kütleli 24.81 dakika alıkonma süresinde gelen pikin (azoksi bileşiği) a) GC kromatogramı ve b) kütle spektrumu.

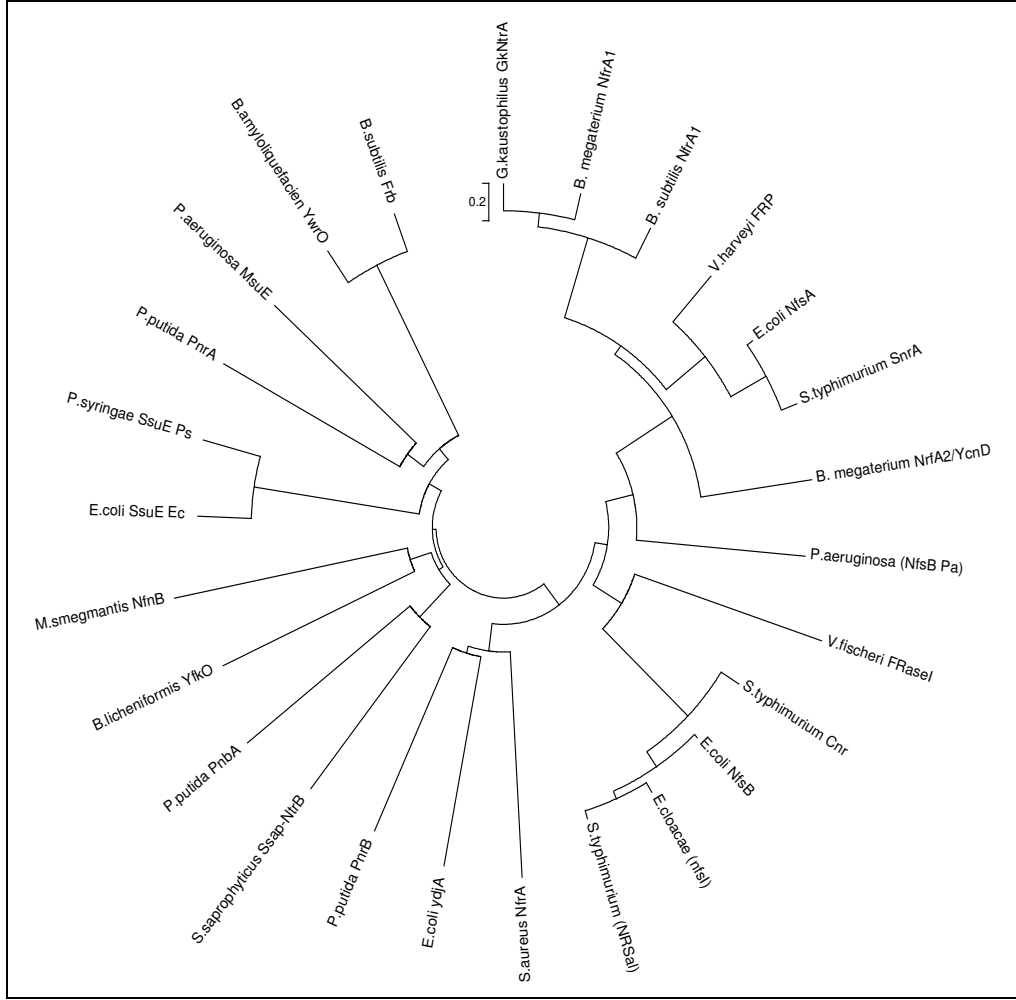
4.1.9. GkNtrA Modelleme Çalışmaları

NTR'lar nitroaromatik bileşikleri bir veya iki elektron transferi yoluyla indirgeyebilmesi bakımından diğer bir deyişle oksijenli ortamda verdikleri cevap bakımından tip I ve tip II olarak ikiye ayrılırlar. Tip II (oksijen hassasiyeti olan) nitroredüktazlar nitro grubunu tek elektron ile indirgeyip nitro anyon radikali oluşturmakta, oluşan radikal faydasız bir döngüye girerek oksijenli ortamda tekrar okside olurken süperoksit anyonu oluşumuna sebep olmaktadır [3], [125]. Tip I (oksijen hassasiyeti olmayan) nitroredüktazlar ise NAD(P)H'den elektron çifti alarak nitro grubunu nitroso, hidroksilamin ve amin türevleri şeklinde sıralı indirgeme reaksiyonunu katalizler [1], [42]. Bununla birlikte genellikle enzimatik reaksiyonun son ürünü hidroksilamin türevi olmaktadır. İkinci basamaktaki iki elektron transferi birinci basamaktaki transferden çok daha hızlı gerçekleştiğinden nitroso ara ürünü belirlenememektedir [99], [126]. Tip I NTR'lar kofaktör tecihine göre de bir alt gruba ayrıldı. *E. coli* NfsA majör grubu, *E. coli* NfsB ise minör grubunu temsil etmektedir. Majör nitroredüktazlar kofaktör olarak sadece NADPH'i kullanırken minör nitroredüktazlar hem NADPH hem de NADH'i kullanabilmektedir [1], [127].

Çoklu dizi analizleri BioEdit programında CLUSTRAL W metodu ile oluşturuldu. GkNtrA'nın sekonder yapısı, kristal yapısı belirlenmiş ve GkNtrA ile % 71 gibi yüksek bir benzerliğe sahip NfrA1 (PDB kodu 5HDJ) model alınarak ESPript web tabanlı program [103] kullanılarak çizildi. Bu şekilde GkNtrA'nın muhtemel sekonder yapısı belirlendi. Ayrıca GkNtrA'a en yüksek benzerlik gösteren nitroredüktazlardan NfrA1 (*B. megaterium*, PDB kodu 5HDJ) [106], NfrA1 (*B. subtilis*, PDB kodu 3N2S) [110] ve NfsA'nın (*E. coli*, PDB kodu 1F5V) [122] aminoasit dizileri karşılaştırılarak korunan bölgeler farklı renkler ile belirtildi (Şekil 4.48). GkNtrA'nın tip 1 (oksijen hassasiyeti olmayan) nitroredüktaz süper familyasındaki yerini bulmak için MEGA 6 programı kullanılıp Neighbor-Joining (NJ) metodu ile filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 4.49).



Şekil 4.48: GkNtrA ve GkNtrA'ya en yüksek benzerlik gösteren nitroredüktazların aminoasit dizi analizi ve GkNtrA'nın muhtemel sekonder yapısı. Sekonder yapı ESPript 3 programında NfrA1 (*B. megaterium*, PDB kodu 5HDJ) şablon alınarak oluşturuldu.



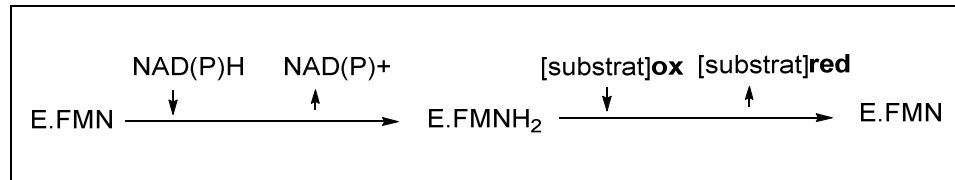
Şekil 4.49: GkNtrA ve tip 1 (oksijen hassasiyeti olmayan) nitroredüktaz süper familyasının filogenetik analizi.

Filogenetik ağaç oluşturulmasında protein dizileri kullanılan tip 1 (oksijen hassasiyeti olmayan) nitroredüktazlar; *S. saprophyticus* Ssap-NtrB [9], *E. cloacae* NR [128], *E. coli*_NfsA [129], *S. typhimurium* SnrA [130], *V. harveyi*_FRP [131], *P. putida* PnrA ve PnrB [132], *S. typhimurium* Cnr [133], *B. licheniformis* YfkO [100], [134], *E. coli*_NfsB [135], *V. fischeri* FRaseI [51], *E. coli* ydJA [136], *P. putida* PnbA [137], *M. smegmantis* NfnB [138], *B. amyloliquefacien* YwrO [71], *S. aureus* NfrA [139], *S. typhimurium* NRSal [117], *P. aeruginosa* NfsB_Pa [140], *P. aeruginosa* MsuE, *E. coli* SsuE_Ec, *P. syringae* SsuE_Ps [141], *B. subtilis* Frb [142], *B. megaterium* NfrA1, *B. megaterium* NrfA2/YcnD [107], *B. subtilis* NfrA1 [116], *B. subtilis* YcnD [143].

PDBsum ile yapılan dizi analizi sonuna göre GkNtrA 185 protein ile benzerlik göstermiş olup bunların ilk üçü % 71 aynı (identity) ile *B. megaterium* NfrA1, % 60 aynı (identity) ile *B. subtilis* NfrA 1 ve % 42 aynı (identity) ile *E. coli* NfsA'dir.

Literatürdeki mevcut NTR'lar ile dizi karşılaştırma sonucu oluşturulan filogenetik ağaca (Şekil 4.49) göre ve GkNtrA'nın biyokimyasal karakterizasyonunda elde edilen bilgiler ışığında GkNtrA'nın NfsA FRP ailesi nitro-FMN redüktaz süperfamilyasına (tip I oksijen hassasiyeti olmayan nitroredüktaz) dahil olduğu söylenebilir. Bununla birlikte daha önce yapılan majör minör NTR gruplamasının aksine GkNtrA, çok düşük afiniteyle de olsa NADH kofaktörünü de kullanabilmektedir. (kofaktör tercihi deneyinde GkNtrA, NADH'e göre NADPH'ı 890 kat daha fazla tercih ettiği belirlendi).

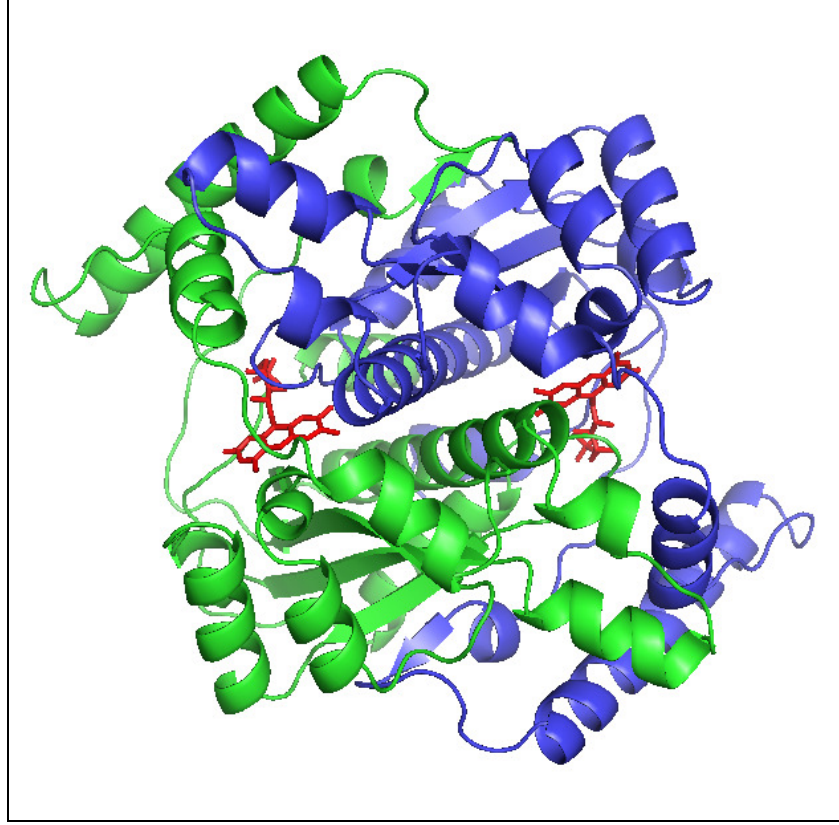
Kristal yapısı aydınlatılmış olan ve dizi karşılaştırma sonucunda GkNtrA ile benzerlik gösteren bir NTR'dan (*E. coli* NfsA [2]) elde edilen yapısal bilgiler ışığında henüz kristal yapısı çözümlenmemiş bir NTR olan GkNtrA'nın katalitik bölgesi, reaksiyon mekanizması, kofaktör bağlanma yeri ve kofaktör tercihi gibi çeşitli konular hakkında yorum yapabilmekteyiz. Buna göre NfsA'nın aktif merkezinde Arg203 ve Arg208 korunmuş rezidüler olarak görülmekte ve bu aminoasitlerin katalitik merkezde NADPH bağlanma bölgesinde önemli rol oynadığı söylenmektedir. NfsA'daki Arg203 ve Arg208 aminoasitlerine GkNtrA'da Arg212 ve Arg217 rezidüleri tekabül etmektedir. Çoklu dizi karşılaştırma sonucuna bakıldığında bu aminoasitlerin Şekil 4.48'de görülen GkNtrA, NfrA1 (5HDJ), NfrA1 (3N2S) ve NfsA (1F5V)'nin dördünde de korunmuş olduğu görülmektedir. NfsA, Ping-Pong bi-bi reaksiyon mekanizmasına göre indirgemeyi katalizlemektedir [129]. Burada indirgemenin ilk basamağında NADPH'den elektronlar alınarak enzim üzerindeki FMN'ye aktarılır. Devamında indirgenmiş FMN üzerindeki elektronlar substrata aktararak substratın indirgenmesi sağlanmaktadır (Şekil 4.50).



Şekil 4.50: NTR katalizli Ping-Pong bi-bi reaksiyon mekanizması.

NfsA ve GkNtrA arasındaki aminoasit dizi karşılaştırma sonucuna bakıldığında NfsA'nın aktif bölgesinde özellikle Arg15, Gln67, Arg133, Lys167, Arg225 aminoasitlerinin GkNtrA (Arg15, Gln67, Arg139, Lys173, Arg234) ile aynı olduğu ve

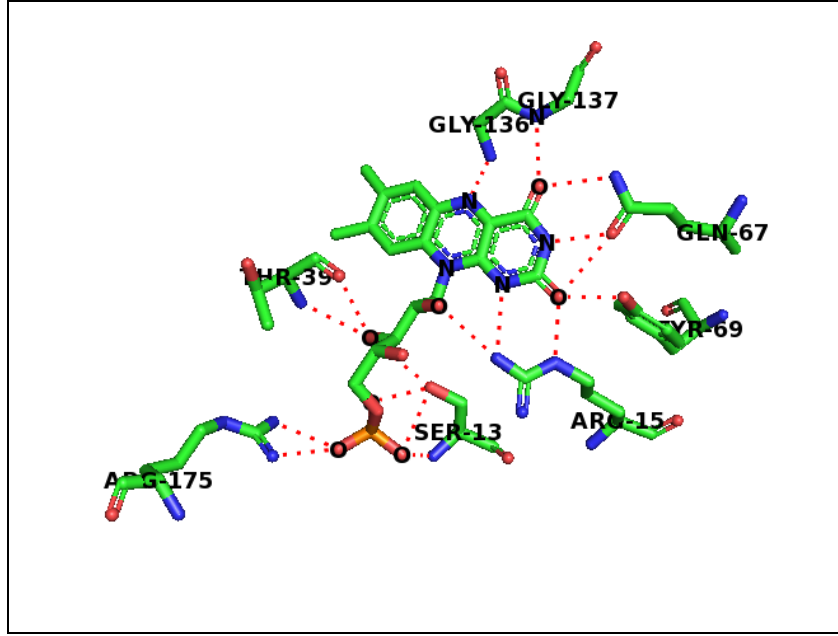
bu bölgenin korunmuş olmasından dolayı aynı reaksiyon mekanizmasına sahip oldukları söylenebilir. Söz konusu aminoasitler diğer iki NTR’de (NfrA1 (5HDJ) ve NfrA1 (3N2S)) de korunmuştur.



Şekil 4.51: Model GkNtrA’nın sekonder yapısı. SWISS-MODEL Workspace web tabanlı software kullanılarak oluşturulan protein yapı homoloji modeli PDB dosyası Pymol’de açılarak sekonder yapılar ve FMN kofaktörü görüntülendi. (Yeşil; A zinciri, mavi; B zinciri, kırmızı; FMN kofaktörleri).

SWISS-MODEL şablon kütüphanesinden Blast ile yapılan tarama sonucunda GkNtrA aminoasit dizisine (target sequence) %71 dizi benzerliği bulunan NfrA1 (PDB kodu 5HDJ) [107] ile modelleme yapıldı. Modelleme raporunda modelin kalitesini gösteren iki değer bulunmaktadır. Bunlar; GMQE (Global Model Quality Estimation) ve QMEAN4 (Quality Model Energy Analysis). GMQE’nin 0-1 arasında bir değer göstermektedir. Elde edilen değer 1’e ne kadar yakın ise modelin doğruluğu o derece yüksek anlamına gelir. GkNtrA modelinde GMQE 0,9, QMEAN4 -0,83 değerini aldı. Bu değerlere göre doğruluğu yüksek, başarılı bir model oluşturulmuştur. Yapılan modelleme sonucuna göre GkNtrA’nın aynı iki zincirden (A

ve B zincirleri) oluşmuş dimer yapılı bir protein olduğu iki FMN bağlanma bölgesi olduğu belirlendi. FMN'nin hangi aminoasitlerle etkileşimde olduğu tabloda verildi. FMN ile hidrojen bağı yapan aminoasitler Şekil 4.52'de gösterildi.



Şekil 4.52: FMN ile hidrojen bağı yaparak etkileşimde bulunan aminoasitler. PyMOL programı ile çizildi.

Buradaki T39 B zincirine ait iken diğer aminoasitler A zincirindendir. Tablo 4.4'te verilen geriye kalan aminoasitler ise hidrofobik etkileşimde bulunan aminoasitlerdir.

Tablo 4.4: SWISS MODEL homoloji modellemesine göre GkNtrA'nın FMN bağlanma bölgeleri.

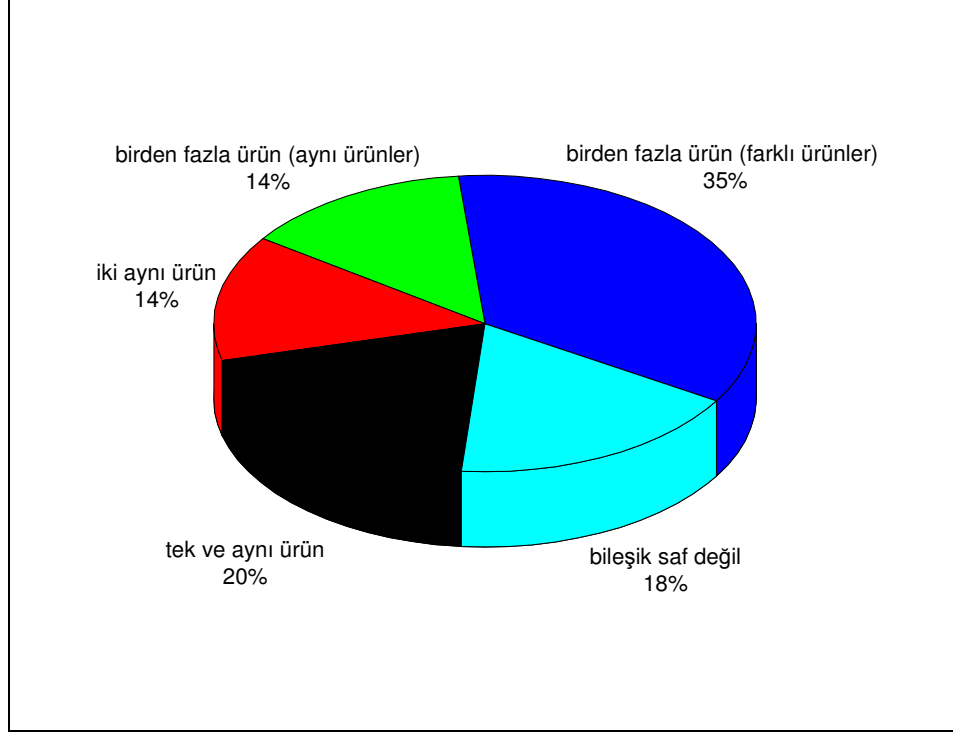
Ligand 1	
A zinciri	H11, R12, S13, R15, Q67, Y69, C133, Y134, I135, G136, G137, K173, R175
B zinciri	S38, T39, S40, I112, L116
Ligand 2	
A zinciri	S38, T39, S40, S41, I112, L116
B zinciri	H11, R12, S13, R15, Q67, Y69, C133, Y134, I135, G136, G137, K173, R175

4.2. Alternatif İlaç-Öncü Araştırması

4.2.1. Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin NTR ile İndirgenmesi

Şekil 3.1’de açık yapıları verilen toplam 51 potansiyel ilaç-öncü bileşiğin Ssap-NtrB ve GkNtrA ile indirgenme reaksiyonları HPLC analizleri ile incelendi. 254 ve 350 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda C18 HPLC kolon kullanılarak analizler gerçekleştirildi.

HPLC kromatogramlarından elde edilen sonuçlar substrat ve indirgeme ürünlerinin alıkonma zamanları aşağıda verildi. HPLC analizi sonuçlarına göre 2b', 2e, 2g, 6, 9, 13a, 15, 18 ve 19 bileşiklerinin saf olmadıkları; her iki enzim ile 2a, 2c, 2d, 8a, 8b, 8f, 14, 16, 25cm, 25i bileşiklerinin tek ve aynı ürüne indirgendiği; her iki enzim ile 2j, 7a, 11b, 24e, 25d, 26", pikrilamin bileşiklerinin iki ve aynı ürüne indirgendiği; her iki enzim ile 2f, 2k, 3k, 10, 12a, 17, 25e bileşiklerinin birden fazla ve aynı ürünlere indirgendiği; Ssap-NtrB ve GkNtrA ile 2b, 2i, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3i, 3i', 3j, 8c, 11a, 12c, 25f, 25h, 26' bileşiklerinin birden fazla ve farklı ürünlere indirgendiği görüldü (Şekil 4.53). Ancak bu reaksiyonların kofaktör sınırlamasında (yani kofaktör rejenerasyon sistemi olmadan sabit indirgenmiş kofaktörle) sadece belirli bir sürede gerçekleştirildiği göz önünde bulundurulmalıdır. Yani reaksiyon gidebileceği son basamağa kadar ilerleyememiş olabilir. Buna sebep sürenin veya kofaktörün yeterli olmadığıdır. Ancak burada bu analizleri yapmadaki amaç hızlı bir şekilde tarama gerçekleştirilerek Ssap-NtrB ve GkNtrA’nın bu potansiyel ilaç-öncüleri indirgeyip indirgemediğinin araştırılmasıdır.



Şekil 4.53: Tez çalışmasında kullanılan potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli reaksiyonlarının HPLC analizlerinden elde edilen sonuçlar.

2b' ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 11,69 dk ve 12,82 dk alıkonma sürelerinde gelen iki pik gözlemlendiğinden aynı ürünlerin oluştuğunu söyleyebiliriz. 13,60 ve 19,31 dakikada gelen pikler 2b' kodlu bileşiğe aittir ve bileşik saf değildir.

6 nolu bileşik saf olmamakla birlikte Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda tek ürün oluşurken (alıkonma zamanı 14,90 dk), GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda iki ürün (alıkonma zamanları 11,96 dk ve 14,90 dk) oluştuğu gözlemlendi. 13,58 dk ve 16,44 dakikalarda gözlenen pikler 6 nolu substrata aittir.

19 nolu bileşik saf olmamakla birlikte (safsızlığa ait pik; alıkonma zamanı 16,13 dk) Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda üç ürün oluşurken (alıkonma zamanı 13,60 dk, 14,35 dk ve 17,44 dk), GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda iki ürün (alıkonma zamanları 13,60 dk, ve 17,44 dk) oluştuğu gözlemlendi. 20,01 dakikada gözlenen pik 19 nolu substrata aittir. HPLC analizi sonucu saf olmadığı görülen 19 kodlu bileşik tekrar sentezlenip yeni bileşik ile tekrar reaksiyonlar gerçekleştirildi. Ancak bu bileşikte de safsızlık görüldü (9,28 dk ve 11,99 dk). Bileşik saf olmasada reaksiyon sonucunda alıkonma süresi 7,85 dk olan ürün gözlemlendi.

7a ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 14,13 dk ve 15,24 dk alıkonma sürelerinde gelen iki pik gözleendiğinden aynı ürünlerin oluştuğunu söyleyebiliriz. 17,69 dakikada gelen pik 7a kodlu bileşiğe aittir.

2b ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 15,29 dk ve 15,70 dk alıkonma sürelerinde gelen iki pik gözleendiğinden aynı ürünlerin oluştuğunu söyleyebiliriz. Ayrıca Ssap-NtrB katalizli reaksiyonda 3,87 dakikada gelen başka bir ürün de gözleendi. 17,94 dakikada gelen pik 2b kodlu bileşiğe aittir.

2g kodlu bileşikte (alıkonma zamanı 17,74 dk) az miktarda safsızlık mevcuttur (safsızlığa ait pik; alıkonma zamanı 16,39 dk). 2g ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile 16,28 dk alıkonma süresinde aynı ürün gözlenirken Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda 15,71 dakikada ve GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda 15,94 dakikada iki farklı ürünün oluştuğu görüldü.

2i (alıkonma süresi 20,13 dk) ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda Ssap-NtrB ile 17,72 dk, 18,52 dk ve 22,69 dk alıkonma sürelerinde gelen üç pik gözlenirken GkNtrA ile 18,52 dk ve 22,69 dk alıkonma sürelerinde gelen iki pik gözleendi.

3e (alıkonma süresi 18,51 dk) ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile substratın tamamen tükendiği görüldü. 4,81 dk alıkonma süresinde gelen pik hem Ssap-NtrB hem de GkNtrA katalizli reaksiyonda gözlenirken Ssap-NtrB reaksiyonunda 14,44 dakikada bir pik daha görülmüş ve bu enzim için iki ürün oluştuğu tespit edildi. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise ürün çeşitliliğinin daha fazla olduğu görüldü. Ürünlere ait alıkonma süreleri sırasıyla 13,78 dk, 16,40 dk, 16,86 dk ve 17,51 dakikadır.

8c'nin Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu başlıca üç ürünün (alıkonma süreleri sırasıyla 12,25 dk, 15,01 dk ve 19,81 dk) oluştuğu gözlenirken, GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucu dört ürünün (alıkonma süreleri sırasıyla 15,01 dk, 18,10 dk, 18,57 dk ve 19,81 dk) oluştuğu görüldü. 17,68 dakikada gelen pik 8c kodlu bileşiğe aittir. 8c'nin Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu daha sonra kofaktör rejenerasyon sistemi ile tekrarlanmış ve bu ürünlere ilaveten 7,15 dk gelen başka bir pik görüldü (Şekil 4.57).

10 nolu substrat ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 10,57 dk, 13,43 dk ve 14,53 dk alıkonma sürelerinde gelen üç ayrı pik gözleendiğinden aynı ürünlerin oluştuğunu söyleyebiliriz. 15,96 dakikada gelen pik 10 nolu bileşiğe aittir.

11b ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 7,12 dk ve 15,74 dk alıkonma sürelerinde gelen iki ayrı pik gözleendiğinden aynı ürünlerin oluştuğunu söyleyebiliriz. 13,88 dakikada gelen pik 11b kodlu bileşiğe aittir.

12a ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 12,28 dk, 15,54 dk ve 18,39 dk alıkonma sürelerinde gelen üç ayrı pik gözleendiğinden aynı ürünlerin oluştuğunu söyleyebiliriz. 15,18 dakikada gelen pik 12a kodlu bileşiğe aittir.

17 nolu bileşiğin Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 6,17 dk, 7,62 dk, 14,40 dk ve 16,87 dk alıkonma sürelerinde gelen dört pik gözlenirken GkNtrA katalizli reaksiyonda 7,62 dk ve 14,40 dk alıkonma sürelerinde gelen iki pik gözleendi. 14,90 dakikada gelen pik 17 kodlu bileşiğe aittir.

18 nolu bileşiğin (18,17 dk ve 18,34 dk alıkonma sürelerinde iki pik gözleendi) saf olmadığı görüldü. Bu bileşiğin Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 5,54 dk ve 6,53 dk alıkonma sürelerinde gelen iki ürün oluşturduğu görüldü. GkNtrA katalizli reaksiyonda ise diğer enzimle olan reaksiyondan farklı alıkonma sürelerinde gelen iki ürün (5,90 dk ve 7,25 dk alıkonma süreleri) görüldü.

25d ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile 15,94 dk alıkonma süresinde tek pik gözlenirken GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda 18,51 dakikada bir pik daha görülmüş ve bu enzimle olan reaksiyon sonucu iki ürün oluştuğu tespit edildi. 18,04 dakikada gelen pik 25d kodlu bileşiğe aittir.

25e ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 15,83 dk, 16,24 dk ve 16,84 dk alıkonma sürelerinde gelen üç ayrı pik gözleendiğinden aynı ürünlerin oluştuğunu söyleyebiliriz. 18,43 dakikada gelen pik 25e kodlu bileşiğe aittir.

2f'nin HPLC analizi sonucu saf olmadığı görülmüş ve tekrar sentezlendi. 2f, 3a, 3d ve 25f'nin substrat olarak kullanıldığı reaksiyonlarda (her iki enzim ile de) sonuçta tek bir ürün oluşmadığı bir metabolit karışımının oluşumu gözleendi. 2f ve 25f'nin kolonda alıkonma süresi sırasıyla 17,72 ve 18,51 dakikadır. 3b'nin Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda başlıca alıkonma zamanı 10,17 dakikada gelen pikle birlikte çok sayıda küçük pikler gözleendi. Birden fazla ürün söz konusu olduğu söylenebilir. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise metabolit karışımı gözleendi. Her iki enzim ile de substratın tamamen tükendiği gözleendi. 18,02 dakikada gelen pik 3b kodlu bileşiğe aittir. 3c'nin Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda başlıca alıkonma zamanları sırasıyla 5,65 dk, 12,71 dk, 13,70 dk, 18,27 dk ve 21,19 dakikada

gelen piklerle birlikte çok sayıda küçük pik gözlemlendi. Birden fazla ürün söz konusu olduğu söylenebilir. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda da reaksiyonda başlıca alıkonma zamanları sırasıyla 2,49 dk ve 3,51 dakikada gelen piklerle birlikte çok sayıda küçük pik gözlemlendi. 20,02 dakikada gelen pik 3c kodlu bileşiğe aittir. 3i'nin Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda başlıca alıkonma zamanı 3,79 dakikada gelen pikle birlikte çok sayıda küçük pikler gözlemlendi. Birden fazla ürün söz konusu olduğu söylenebilir. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise metabolit karışımı gözlemlendi. 18,61 dakikada gelen pik 3i kodlu bileşiğe aittir. (3i')'nün her iki enzimle de gerçekleştirilen reaksiyonda metabolit karışımı gözlemlendi. Birden fazla ürün söz konusu olduğu söylenebilir. 18,61 dakikada gelen pik (3i') kodlu bileşiğe aittir. 3f'nin Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda başlıca alıkonma zamanları sırasıyla 13,64 dk ve 13,90 dk'de gelen pikler gözlemlendi. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise metabolit karışımı gözlemlendi. Her iki enzim ile de substratın tamamen tükendiği gözlemlendi. 17,14 dakikada gelen pik 3f kodlu bileşiğe aittir. 3g'nin HPLC analizine bakıldığında substratta safsızlık olduğu görüldü. 3g'nin (tekrar sentez) ile gerçekleştirilen reaksiyonlara ait HPLC kromatogramına bakıldığında ise bileşiğin saf olduğu (17,92 dk) ve her iki enzim ile de 5,35 dk, 14,29 dk, 15,56 dk ve 17,18 dakikalarda görülen başlıca dört ürün ile birlikte çok sayıda şiddeti düşük pik görüldü.

11a'nın Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda başlıca alıkonma zamanları sırasıyla 8,15 dk ve 12,06 dk dakikada gelen pikler gözlemlendi. Birden fazla ürün söz konusu olduğu söylenebilir. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonda ise metabolit karışımı gözlemlendi. 14,40 dakikada gelen pik 11a kodlu bileşiğe aittir.

12c'nin Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 11,65 dk alıkonma süresinde gelen tek bir ürün gözlenmişken GkNtrA katalizli indirgenemsi sonucu 11,48 dk ve 11,63 dakikalarda gözlenen başlıca piklerin yanında çok sayıda küçük pik gözlemlendi. Birden fazla ürün söz konusudur. 14,55 dakikada gelen pik 12c kodlu bileşiğe aittir.

15 nolu bileşik ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda metabolit karışımı şeklinde şiddeti oldukça düşük fazlaca pik gözlemlendi. 18,68 dakikada gelen pik 15 kodlu bileşiğe aittir ve bileşikte safsızlıklar mevcuttur.

25h'nin Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 14,45 dk ve 17,61 dk alıkonma süresinde gelen iki ürün gözlenmişken GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu 14,45

dk, 17,61 dk ve 16,34 dakikalarda üç pik gözlemlendi. 18,07 dakikada gelen pik 25h kodlu bileşiğe aittir.

2j bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 16,97 dk ve 17,90 dk'de görülen iki ürün belirlendi. 18,56 dakikada gelen pik 2j kodlu bileşiğe aittir.

2k bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 13,49 dk ve 13,90 dk'de görülen iki pik ve birden fazla küçük pikler görüldü. Birden fazla ürün söz konusudur. 17,74 dakikada gelen pik 2k kodlu bileşiğe aittir.

3j bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile farklı ürünlerin oluştuğu görüldü. Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 15,55 dk alıkonma süresinde gelen tek ürün gözlenmişken GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu 13,87 dk, 14,09 ve 16,37 dakikalarda üç pik gözlemlendi. 17,78 dakikada gelen pik 3j kodlu bileşiğe aittir.

3k bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda; Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 14,16 dk, 14,31 dk ve 15,82 dk alıkonma süresinde gelen üç ürün gözlenmişken GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu 14,16 dk, 14,31 dk, 15,82 dk ve 16,44 dk'de gelen dört pik gözlemlendi. 17,30 dakikada gelen pik 3k kodlu bileşiğe aittir.

9 nolu bileşiğin HPLC analizi bileşiğin saf olmadığını gösterdi. Bileşikteki safsızlıkları gidermek amacıyla tekrar sentez çalışmaları gerçekleştirilmiş ve 9 (tekrar sentez) ile iki enzim ile de reaksiyonlar gerçekleştirildi. HPLC sonuçlarına göre bileşikte yine safsızlık mevcuttur (17,18 dk ve 20,09 dk). Buna karşın her iki enzim ile de 11,50 dk, 13,47 dk ve 15,46 dk'de ürün olabilecek üç pik gözlemlendi.

24e bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda her iki enzim ile de 15,43 dk ve 17,06 dk'de görülen iki pik görüldü. 18,97 dakikada gelen pik 24e kodlu bileşiğe aittir.

26' bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda; Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 10,98 dk, 14,32 dk ve 14,97 dk alıkonma süresinde başta olmak üzere birçok küçük pik görüldü. GkNtrA katalizli reaksiyonu sonucunda ise 13,63 dk, 14,57 dk ve 16,56 dk alıkonma süresinde başta olmak üzere birçok küçük pik görüldü. Bu substrat her iki enzimle farklı indirgenme ürünleri oluştuğu görüldü.

26'' bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda; Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 12,54 dk, 14,98 dk ve 15,71 dk alıkonma süresinde gelen üç ürün

gözlenmişken GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu 12,54 dk, 14,98 dk, 15,71 dk ve 14,43 dk'de gelen dört pik gözlemlendi. 17,29 dakikada gelen pik 26'' kodlu bileşiğe aittir.

Pikril amin bileşiği ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda; Ssap-NtrB katalizli reaksiyonu sonucu 13,25 dk alıkonma süresinde gelen tek bir ürün gözlenmişken GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu 11,70 dk ve 13,25 dk'de gelen iki ürün gözlemlendi. Bileşikte safsızlıklar mevcuttur (10,68 dk, 13,94 dk ve 15,09 dk).

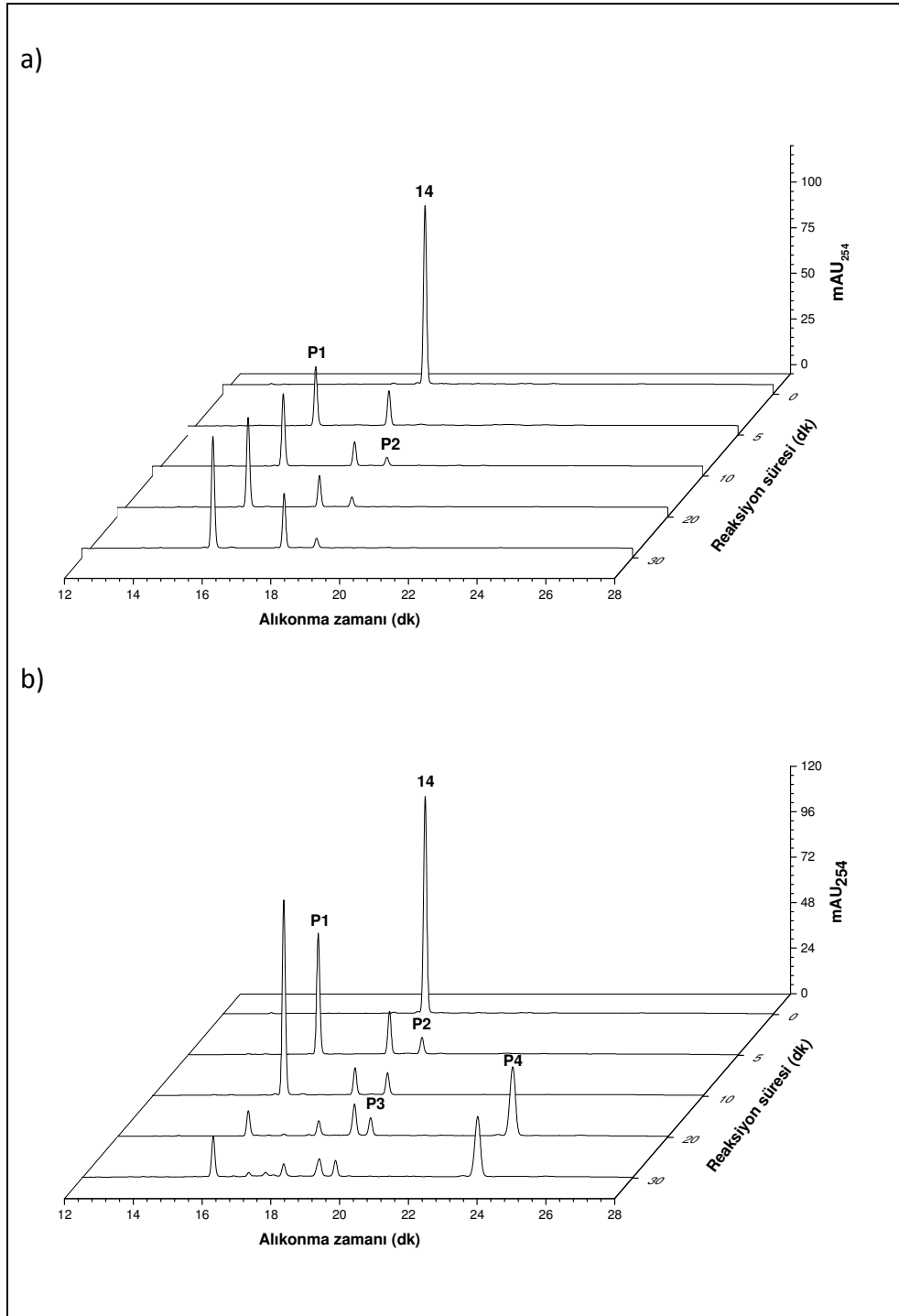
2a, 2c, 2d, 2e, 8a, 8b, 8f, 13a, 14, 16, 19 (tekrar sentez), 25 cm, 25i kodlu bileşiklerle gerçekleştirilen reaksiyonlarda ise Ssap-NtrB ve GkNtrA'nin her ikisinde de aynı tek ürünün oluştuğu gözlemlendi.

2a ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda alıkonma süresi 14,52 dk olan ürün gözlemlendi. 16,92 dakikada gözlenen pik substrata aittir. 2c ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda ürüne ait pik 17,98 dk ve substrata ait pik 20,58 dakikada gözlemlendi. 2d ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda alıkonma süresi 17,01 dk olan ürün gözlemlendi. 18,41 dakikada gözlenen pik substrata aittir. 2e'nin HLC kromatogramına bakıldığında substratın safsızlık (alıkonma süresi 14,49 dk) içerdiği görülür. 16,67 dakikada gelen pik ürüne 18,40 dakikada gelen pik ise substrata aittir. 8a ve 8b de ise her iki enzim ile de sırasıyla 14,64 dk ve 14,16 dk alıkonma sürelerinde gelen ürünlerin oluştuğu görüldü. 17,38 dakikada gelen pik 8a kodlu bileşiğe ve 17,02 dk gelen pik ise 8b kodlu bileşiğe aittir. 16 kodlu bileşik ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda alıkonma süresi 6,08 dk olan ürün gözlemlendi. 15,10 dakikada gözlenen pik substrata aittir. 13a kodlu bileşik ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda alıkonma süresi 3,32 dk olan ürün gözlemlendi. Bileşik safsızlık içermektedir. Bu sebeple birden fazla pik görüldü (3,52 dk, 4,02 dk, 5,43 dk ve 5,60 dk gelen omuzlu pik). 25cm kodlu bileşik ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda alıkonma süresi 18,50 dk olan ürün gözlemlendi. 20,58 dakikada gözlenen pik substrata aittir. 8f kodlu bileşik ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda da alıkonma süresi 4,34 dk olan ürün gözlemlendi. 12,62 dakikada gözlenen pik substrata aittir. 25i kodlu bileşik ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda da alıkonma süresi 9,76 dk olan ürün gözlemlendi. Substratta safsızlık vardır. 14,51 dk ve 17,52 dk'de gözlenen pikler substrata (25i) aittir.

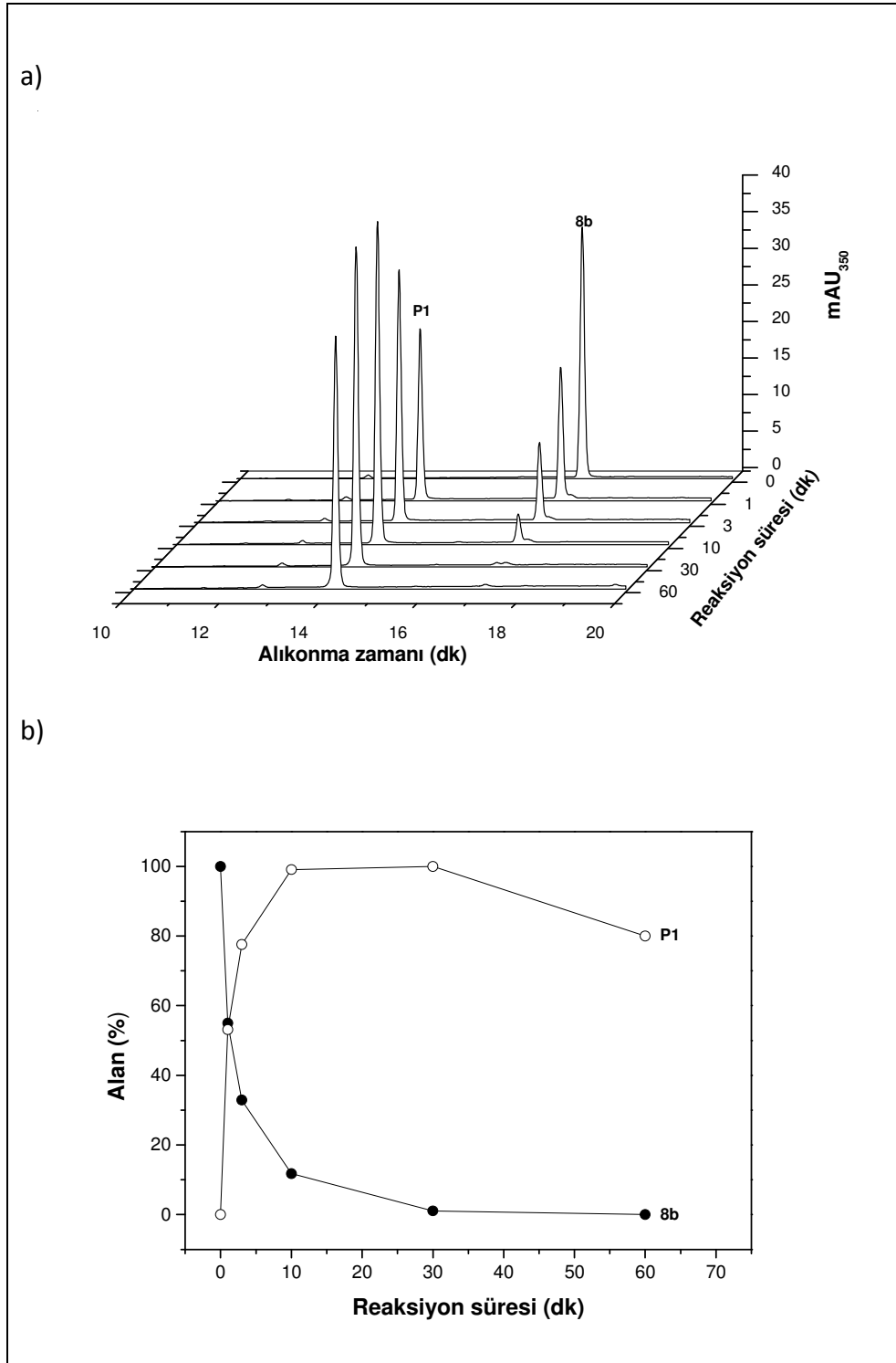
4.2.2. İndirgenme Ürünlerinin Zamanla Değişiminin İzlenmesi

14 kodlu bileşiğin Ssap-NtrB ve GkNtrA ile ayrı ayrı zamana karşı reaksiyonları HPLC ile takip edilmiş ve ürün profilinin değiştiği görüldü. Ssap-NtrB ile gerçekleştirilen reaksiyonda ilk oluşan ürüne ait pikin (P1, alıkonma zamanı 15,80 dk) zamanla arttığı ve 10. dakikadan sonra ikinci bir ürünün meydana geldiği (P2, alıkonma zamanı 18,81 dk) gözlemlendi. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonun 5. dakikasında P1 (alıkonma zamanı 15,80 dk) ve P2 (alıkonma zamanı 18,81 dk) ürün pikleri gözlemlendi. Reaksiyonun 10. dakikadan sonra P1 (15,80 dk) miktarının azaldığı ve 20. dakikadan itibaren de P3 (alıkonma zamanı 19,37 dk) ve P4 (alıkonma zamanı 23,50 dk) olmak üzere iki ayrı ürünün meydana geldiği gözlemlendi. 17,88 dk gelen pik 14 kodlu bileşiğe aittir. Bu bileşikte gözlenen durumun diğer substratlar için de geçerli olma ihtimali yüksektir (Şekil 4.54).

Bileşiklerin enzimatik indirgenmesi reaksiyonlarında, ortamdaki kofaktör sınırlamasını kaldırmak için kofaktör rejenerasyonu sistemi kullanıldı. Bu amaçla Ssap-NtrB/FDH ikili enzim sistemi kullanılarak 8b ve 8c bileşikleriyle zamana karşı reaksiyonlar gerçekleştirilip HPLC ile takip edildi. 8b ile gerçekleştirilen reaksiyonun zamana karşı HPLC analizine bakıldığında 30. dk'ye kadar ürün (alıkonma zamanı 14,13 dk) miktarındaki artışla substrat (alıkonma zamanı 16,97 dk) miktarındaki azalışın birebir oranda gerçekleştiği görüldü. Ancak 30. dakikadan sonra 14,13 dk'de gözlenen ürünün miktarında azalış dikkat çekmektedir. 30. dakikada oluştuğu ve 60 dakikada da miktarında artış gördüğümüz 4,15-4,35 dk alıkonma süresinde gözlenen çok çok düşük şiddetteki omuzlu pik muhtemelen 14,13 dk gözlenen metabolitin başka bir metabolite dönüşümüdür ve ölçtüğümüz dalga boyunda (254 ve 350 nm) düşük şiddette absorbanans vermektedir (Şekil 4.55). Keza LC-MS sonuçlarında bunu açıkça görmekteyiz (Bkz Bölüm 4.2.3).

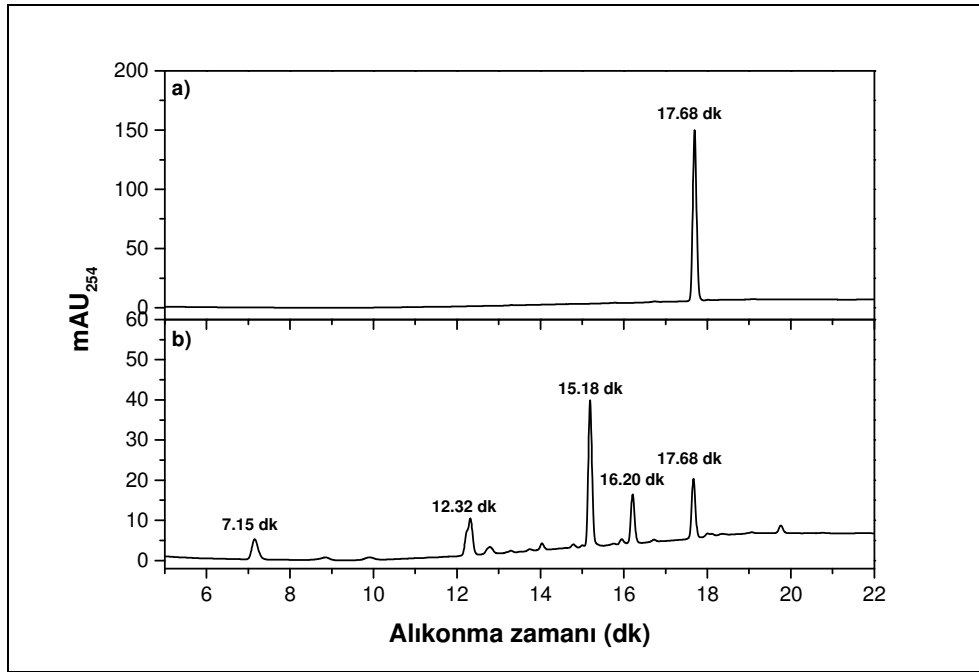


Şekil 4.54: a) Ssap-NtrB ve b) GkNtrA katalizli 14 nolu bileşiğin redüksiyonu reaksiyonunun zamana karşı HPLC kromatogramı. Reaksiyon, 9,3 µg/ml Ssap-NtrB (11,2 µg/ml GkNtrA), 300 µM 14 nolu substrat, 923 µM NADH ve ortamda % 1,6 metanol olacak şekilde 25 mM (pH 7,5 SsapNtrB için, pH 8,5 GkNtrA için) tris/Cl tamponunda gerçekleştirildi.

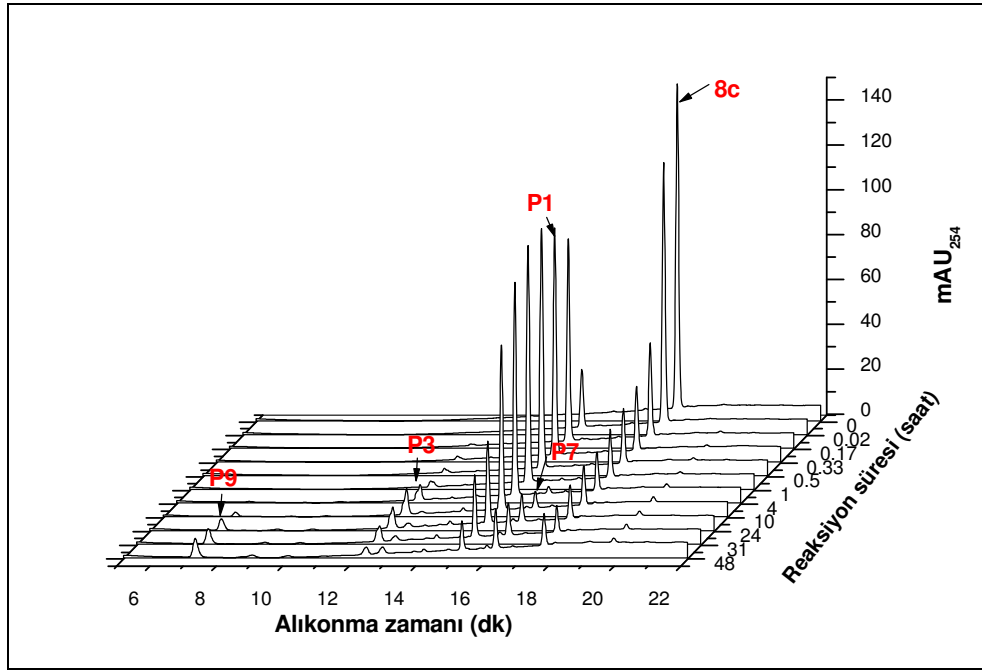


Şekil 4.55: a) Ssap-NtrB katalizli 8b'nin redüksiyonu reaksiyonunun zamana karşı HPLC kromatogramı, b) zamanla ürün ve substrat miktarındaki değişim. Reaksiyon, 25 μ M 8b, 0,1 mg/ml BSA, 0,2 M amonyum format, 24 μ g/ml FDH, 24 μ g/ml Ssap-NtrB, 500 μ M NADP⁺, 50 μ M NADPH ve %20 DMSO içeren 25 mM Tris/Cl (pH 7,4) tamponunda gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda 1:1 hacim asetonitril ilave edildi.

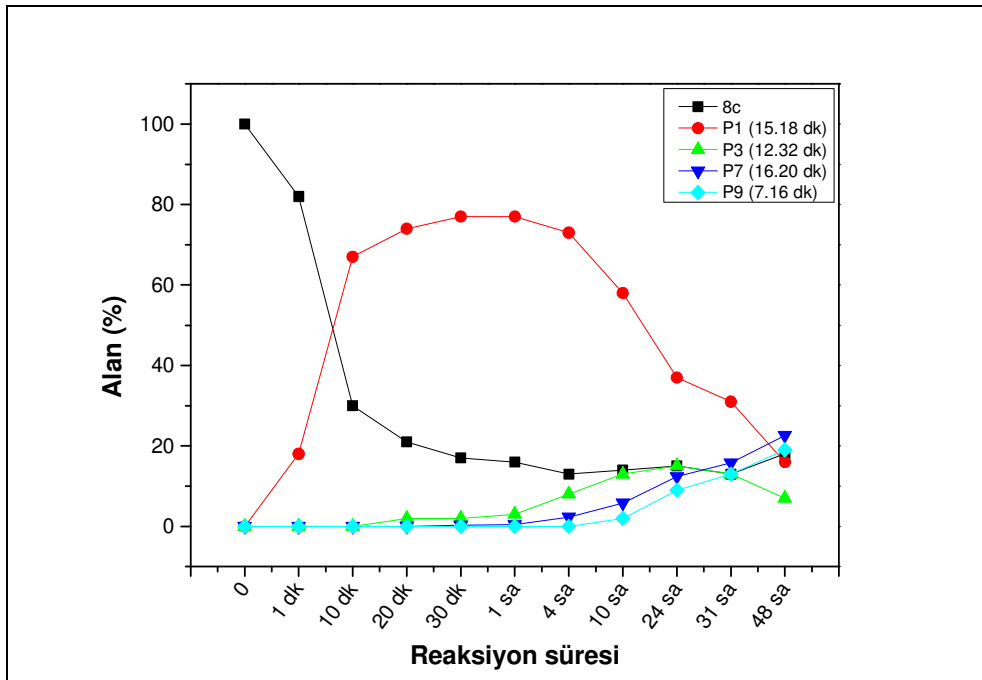
8c ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucu oluşan metabolit sayısı oldukça fazladır (Şekil 4.57). HPLC verilerine dayanılarak toplam on üç ürüne ait % alan değerleri hesaplandı. Bu ürünlerin içerisinde P1 (alınma zamanı 15.18 dk), P3 (alınma zamanı 12.32 dk), P7 (alınma zamanı 16.20 dk) ve P9 (alınma zamanı 7.15 dk) oluşan başlıca metabolitlerdir. 8c ve başlıca dört ürünün oluşum ve yıkımını gösteren grafiğe bakıldığında reaksiyonun 4. saatinden sonra P1 miktarının dramatik bir şekilde azalmaya başlayıp yine aynı saatten itibaren de P7 ve P9 miktarlarının artmaya başladığı dikkat çekmektedir. P3'ün ise 24 saatten sonra azalmaya başladığı görüldü (Şekil 4.58).



Şekil 4.56: 8c potansiyel ilaç-öncüsünün Ssap-NtrB katalizli indirgenme reaksiyonunun HPLC kromatogramı. a) Ssap-NtrB içermeyen kontrol, b) Ssap-NtrB katalizli reaksiyonun 24. saati.



Şekil 4.57: 8c potansiyel ilaç-öncüsünün Ssap-NtrB katalizli indirgenmesinde reaksiyonun süresinin ürün profilindeki değişimine ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.58: 8c potansiyel ilaç-öncüsünün Ssap-NtrB katalizli indirgenmesiyle oluşan P1, P3, P7 ve P9 ürünlerinin zamanla miktarlarındaki değişim. Grafik, HPLC kromatogramındaki pik alanları hesaplanarak elde edildi.

4.2.3. Potansiyel İlaç-Öncü Bileşiklerin Enzimatik Redüksiyonunun LC-MS/MS Analizleri

Sentezlenen potansiyel ilaç-öncü maddelerinin yeni nitroredüktazlarla (Ssap-NtrB ve GkNtrA) enzimatik reaksiyon sonucu indirgendikleri spektroskopik ve HPLC analizleri ile tespit edildi. Oluşan indirgenme ürünlerin neler olduklarını ve substratın hangi basamakları izleyerek son ürüne dönüştüğünü anlamak amacıyla LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. Reaksiyonu yapılan bileşiklerden 2b, 2b', 2c, 2d, 2e, 2i, 3a, 3c, 3d, 11a, 11b, 12a, 12c, 14, 16 ve 17 (toplam 16 bileşik) kodlu bileşiklerin reaksiyonlarına ilişkin LC-MS/MS analizlerinden sonuç alınamadı. Bu durum büyük ihtimalle uygun LC-MS/MS analiz şartlarının sağlanamamış olmasından veya söz konusu bileşiklerin uçuculuklarının diğerlerinden düşük olma ihtimalinden kaynaklanmış olabilir. 8a, 8b, 8c, 10, 2f, 2g, 3b, 3e, 3f, 3i, 3i', 7a, 25d, 25e, 25f ve 26' kodlu bileşiklerde ise olumlu sonuç alındı. Her iki enzimle de gerçekleştirilen reaksiyonlara ait LC-MS/MS spektrumlarından elde edilen kütleler Tablo 4.5 ve 4.6'da verildi.

Tablo 4.5: LC-MS/MS analiz sonuçları.

Ssap-NtrB				
Substrat/ ürün(ler)	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Alıkonma zamanı (dk)	Parent iyon (m/z)	Fragment iyonlar (m/z)
8a	287	22,37	286 [M-H] ⁻	
8a ürün1	257	6,92	256 [M-H] ⁻	Product ion scan; 292, 254, 183, 171, 151, 127
8b	287	21,74	286 [M-H] ⁻	286, 255, 240, 163, 133, 122
8b ürün1	273	16,12	272 [M-H] ⁻	254, 239, 211, 194, 163, 136, 134, 107
8b ürün2	259	15,87	256 [M-3H] ⁻	256, 239, 226, 209, 196, 180, 166, 153, 132, 121, 107
8b ürün3	257	4,61	256 [M-H] ⁻	Product ion scan; 290, 254, 183, 171, 156, 151

Tablo 4.5: Devam.

GkNtrA				
Substrat/ ürün(ler)	Molekül ağırlığı (g/mol)	Alıkonma zamanı (dk)	Parent iyon (m/z)	Fragment iyonlar (m/z)
8a	287	22,35	286 [M-H] ⁻	-
8a ürün 1	273	17,04	272 [M-H] ⁻	Product ion scan; 308, 272, 270, 151, 113
8b	287	21,74	286 [M-H] ⁻	240, 163, 138, 133, 122, 117
8b ürün 1	273	16,13	272 [M-H] ⁻	240, 211, 194, 163, 133, 117, 105, 76
8b ürün 2	259	15,89	256 [M-3H] ⁻	239, 225, 208, 195, 180, 166, 148, 121,91
8b ürün 3	-	-	-	-

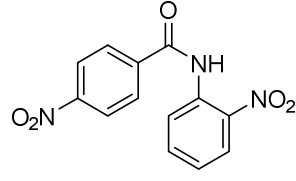
Tablo 4.6: Hızlı tarama yöntemi (quick scan mod) ile elde edilen kütle verileri.

Substrat	Kontrol (tampon- substrat-kofaktör) m/z	Ssap-NtrB reaksiyonu m/z	GkNtrA reaksiyonu m/z
8c	120, 127, 156, 181, 212, 241, 255, 283, 331	120, 127, 156, 212, 241, 257, 277, 293, 317, 331	120, 127, 156, 212, 241, 257, 293, 299, 315, 331
10	156, 346	127, 156, 302, 316, 332, 338, 346	127, 156, 300, 316, 332, 346
2f	-	127, 156, 183, 212, 273, 287, 303	120, 127, 156, 183, 212, 241, 257, 273, 287, 293, 303
2g	-	-	101, 127, 156, 183, 212, 299, 317
3b	-	127, 156, 183, 212, 241, 267	127, 156, 183, 212, 251, 267, 269
3f	-	120, 127, 156, 212, 241, 261, 293, 302, 318, 334, 340, 348	120, 127, 156, 212, 241, 261, 302, 318, 332, 348
3e	-	120, 156, 212, 220, 253, 289, 317	-
3i	-	120, 127, 156, 183, 212, 241, 353	120, 127, 156, 183, 212, 241, 353
3i'	-	120, 127, 156, 183, 212, 241, 353	120, 127, 156, 183, 212, 241, 305, 353
7a	-	101, 120, 127, 156, 183, 212, 241, 291	101, 120, 127, 156, 183, 212, 241, 291
25d	-	127, 156, 183, 212, 331, 345	127, 156, 183, 212, 241, 331, 345
25e	-	127, 156, 181, 212, 246, 255, 302, 326, 344, 360, 365, 374	120, 127, 156, 183, 212, 241, 365, 374
25f	-	127, 156, 183, 212, 362, 389, 393, 405, 419	127, 156, 183, 212, 254, 329, 344, 389, 393, 419
26'	-	120, 127, 156, 183, 212, 241, 363	120, 127, 156, 183, 212, 241, 349, 363

8a ve 8b substratları için reaksiyon ve reaksiyon öncesi (ortamda enzim olmadığı durum), deneysel kısımda ayrıntılı anlatılan örnek hazırlama işlemleri sonrası sıvı kromatografi ile kolonda reaksiyon bileşenlerinin ayrılması sağlandı. Sonrasında 100-500 (m/z) aralığında Q3 scan ile negatif ve pozitif modda kütle taraması yapıldı. Diğer substratlar için ise işlem süresini kısaltmak amacıyla reaksiyon karışımlarının LC kolona verilmeksizin hızlı tarama (quick scan) ile negatif ve pozitif modda 100-800 m/z aralığında kütle taraması gerçekleştirildi.

Seçilen substratlarda iyonlaşma verimi negatif iyonlaşma modu kullanıldığında pozitif moda göre oldukça yüksek görüldü. Bu durum nitro grubunun elektronegatif özelliğine dayandırılmaktadır. Kütle spektrumunda pozitif yüklü iyonlar ya oluşmamaktadır ya da çok düşük yoğunlukta görülmektedir. Bu da yine nitroaromatik bileşiklerin düşük proton ilgilerine bağlanmaktadır [144]. 8a substratı ile yapılan araştırmada, reaksiyon öncesi ve sonrasında LC kromatogramında 22,35 dakikada gelen ve kütle spektrumunda 286 m/z $[M-H]^-$ iyonun 8a'ya ait olduğu görüldü (Şekil 4.59). Ssap-NtrB katalizli indirgeme reaksiyonunda reaksiyon öncesinden farklı olarak 6,92 dakikada pik görüldü. Bu pikin kütle spektrumuna bakıldığında 256 m/z $[M-H]^-$ iyonunu görüldü (Şekil 4.60). 256 kütlesi kolondaki alıkonma zamanı da göz önüne alındığında büyük ihtimalle 8a substratındaki iki nitro grubundan birinin seçimli bir şekilde amine kadar indirgenmesi sonucu oluşan ürüne aittir. GkNtrA katalizli indirgeme reaksiyonunda ise yine reaksiyon öncesinden farklı olarak 17,04 dakikada pik görüldü. Bu pikin kütle spektrumuna bakıldığında 272 m/z $[M-H]^-$ iyonunu görüldü (Şekil 4.62). Bu da 8a substratındaki iki nitro grubundan birinin seçimli bir şekilde sadece hidroksilamine kadar indirgenmiş olabileceğini göstermektedir. 8a'nın enzimatik indirgeme sonucu oluşması muhtemel metabolitlerin açık yapıları Şekil 4.5'te verildi. Kırmızı halka içindeki bileşiklere ait kütleler MS spektrumlarında görüldü. MS sonuçları incelendiğinde her iki enzim için de bileşikteki iki nitro grubundan sadece birinin indirgendiği görüldü. Ssap-NtrB katalizli reaksiyonun amin basamağına kadar, GkNtrA katalizli reaksiyonun ise hidroksilamin basamağına ilerleyebildiği görüldü. Her iki enzimin de daha ileriki indirgeme basamaklarına geçememiş olmaları daha fazla kofaktör gereksiniminden kaynaklanmış olabileceği gibi oluşturabilecekleri son ürünler bunlar da olabilir.

a)

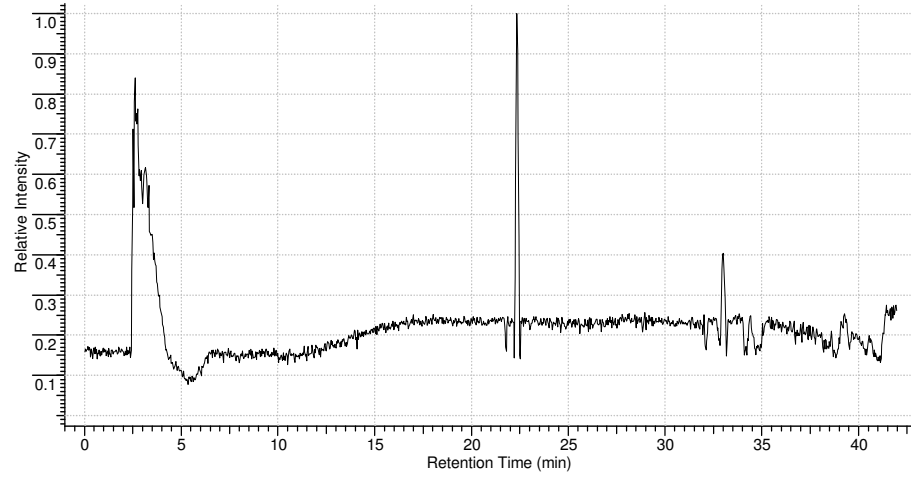


8a

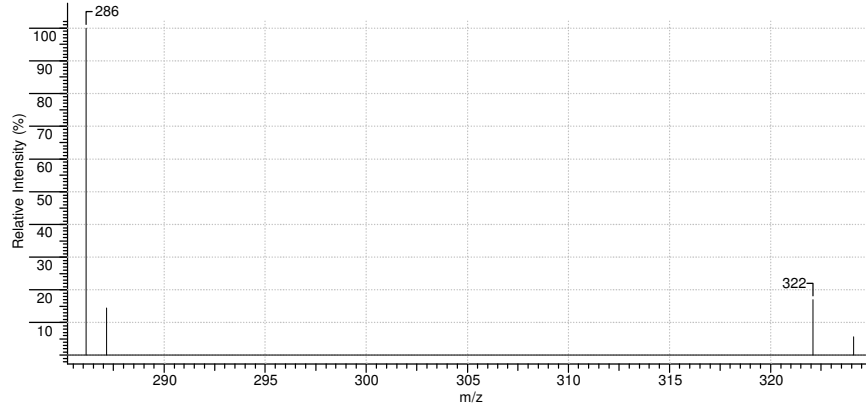
Mw: 287

m/z: 286 [M-H]⁻

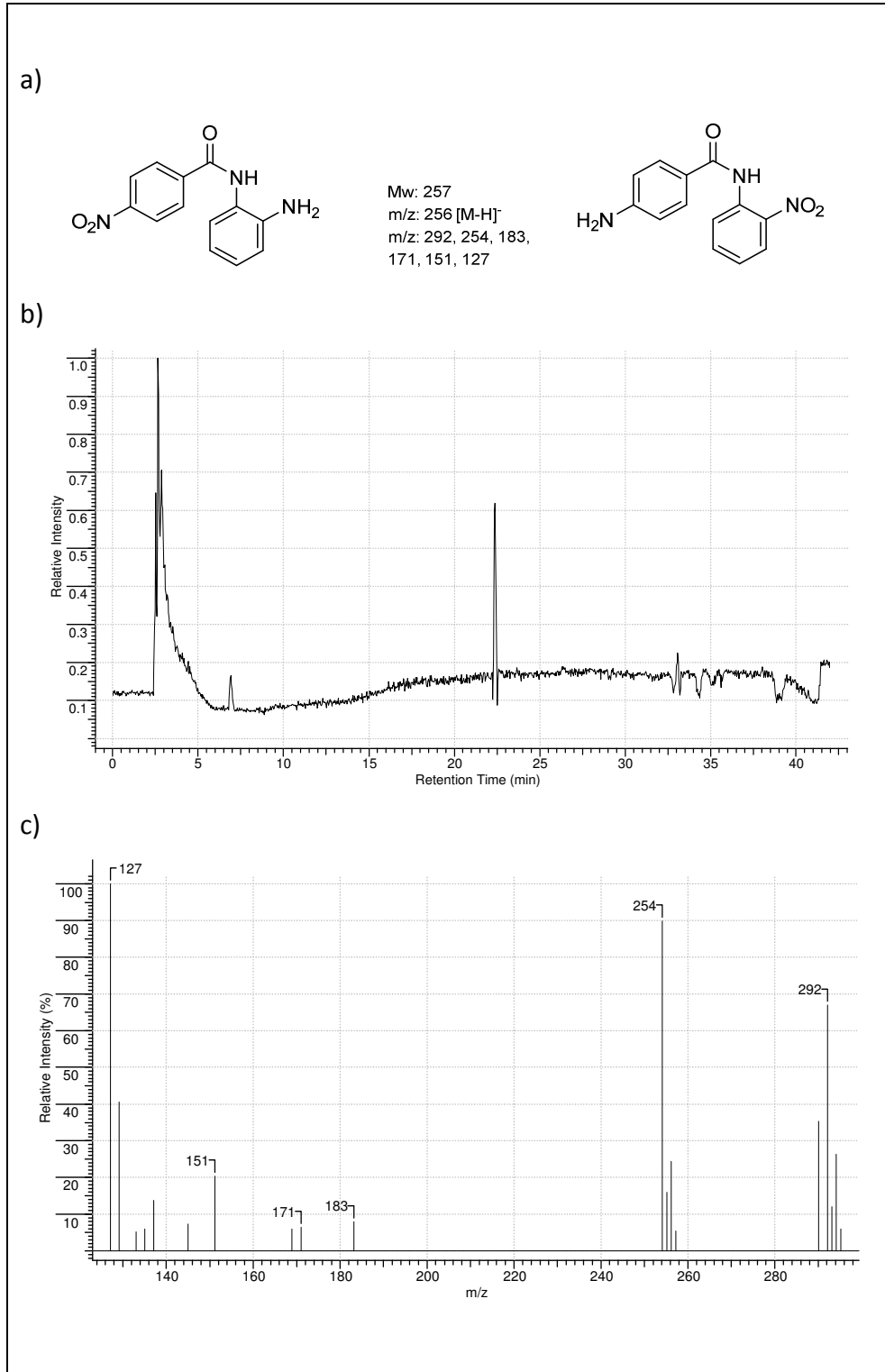
b)



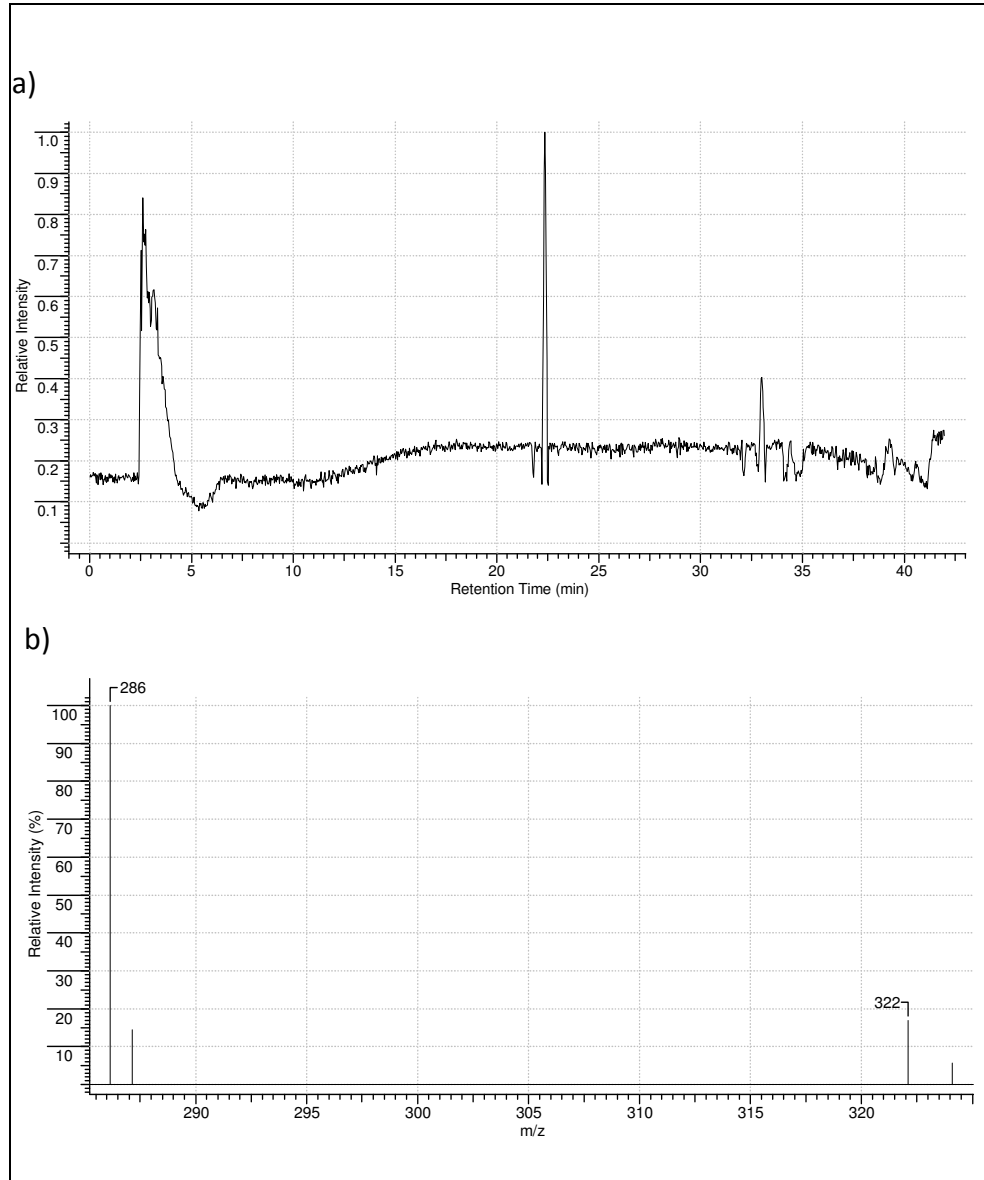
c)



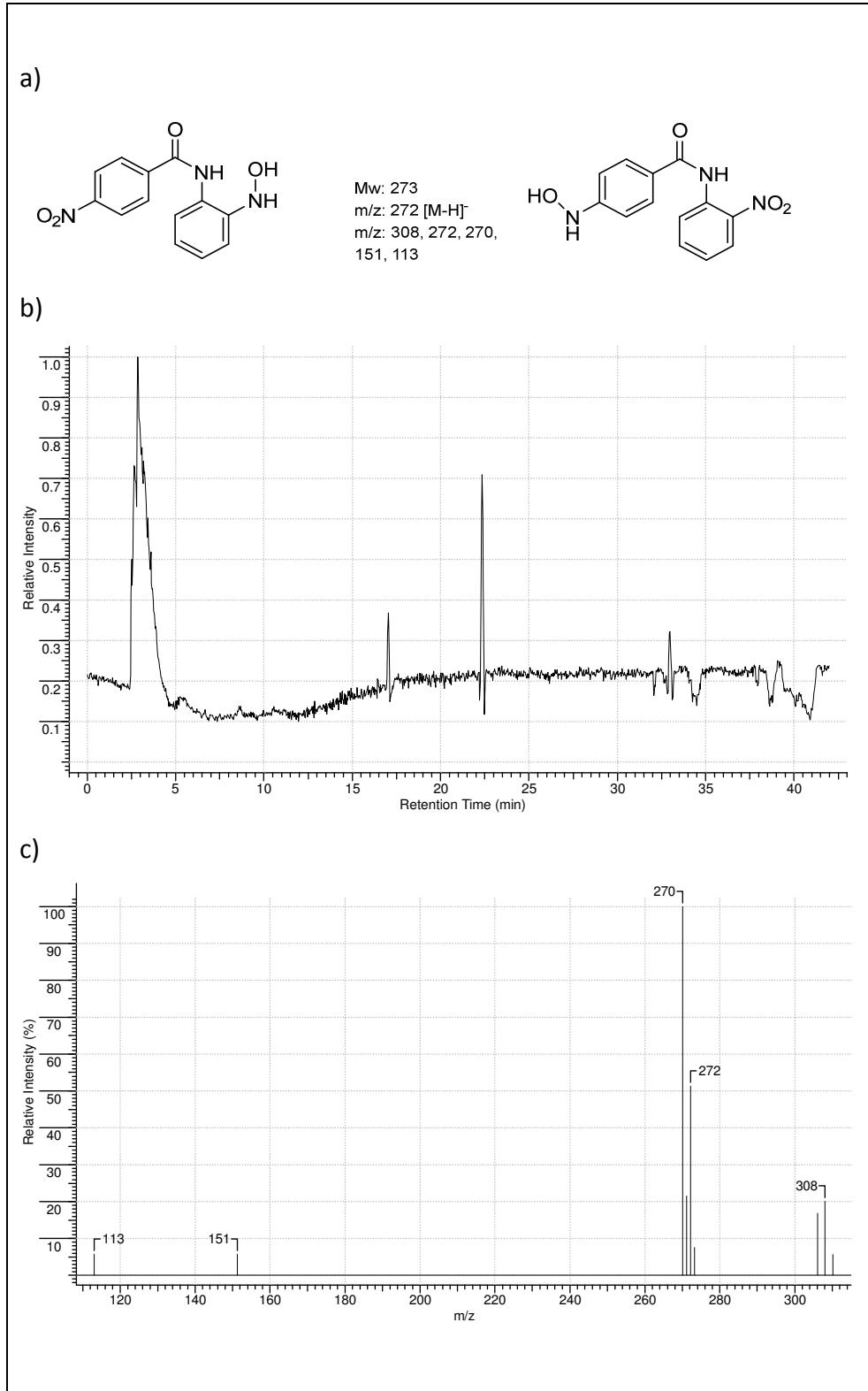
Şekil 4.59: 8a'nın a) açık yapısı, b) Ssap-NtrB ile reaksiyon öncesine ait LC kromatogramı ve c) 22,35 dk'da gelen pikin MS spektrumu.



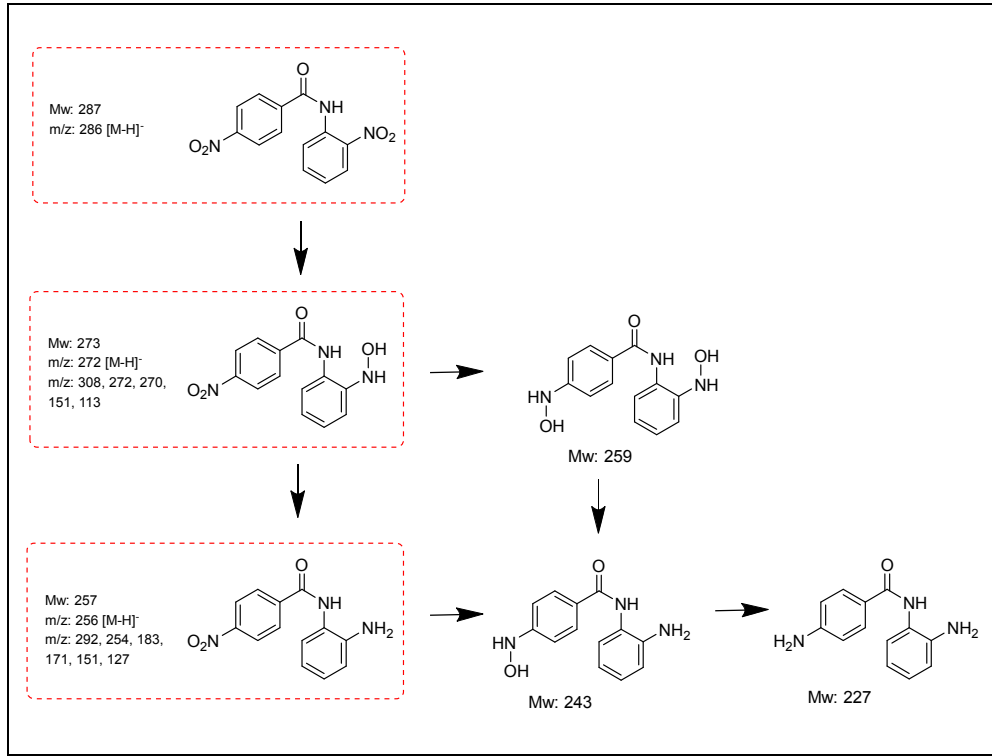
Şekil 4.60: 8a'nın a) indirgenme ürünlerinin açık yapısı, b) Ssap-NtrB ile reaksiyonuna ait LC kromatogramı ve c) 6,92 dk'de gelen pikin MS spektrumu.



Şekil 4.61: 8a'nın GkNtrA ile reaksiyon öncesine ait a) LC kromatogramı b) 22,35 dk'de gelen pikin LC-MS spektrumu.



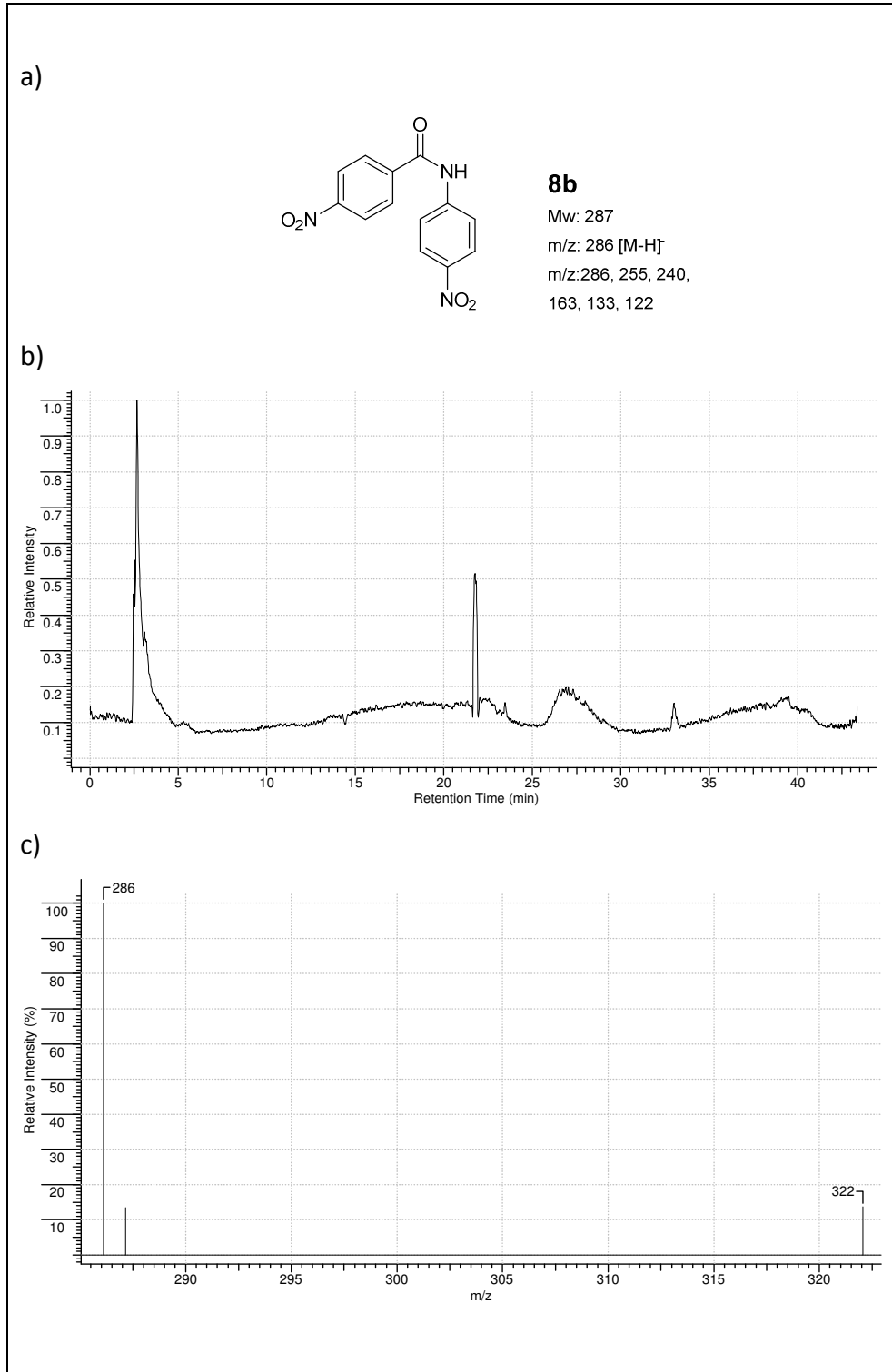
Şekil 4.62: 8a'nın a) indirgenme ürünlerinin açık yapısı, b) GkNtrA ile reaksiyonuna ait LC kromatogramı ve c) 17,04 dk'de gelen pikin MS spektrumu.



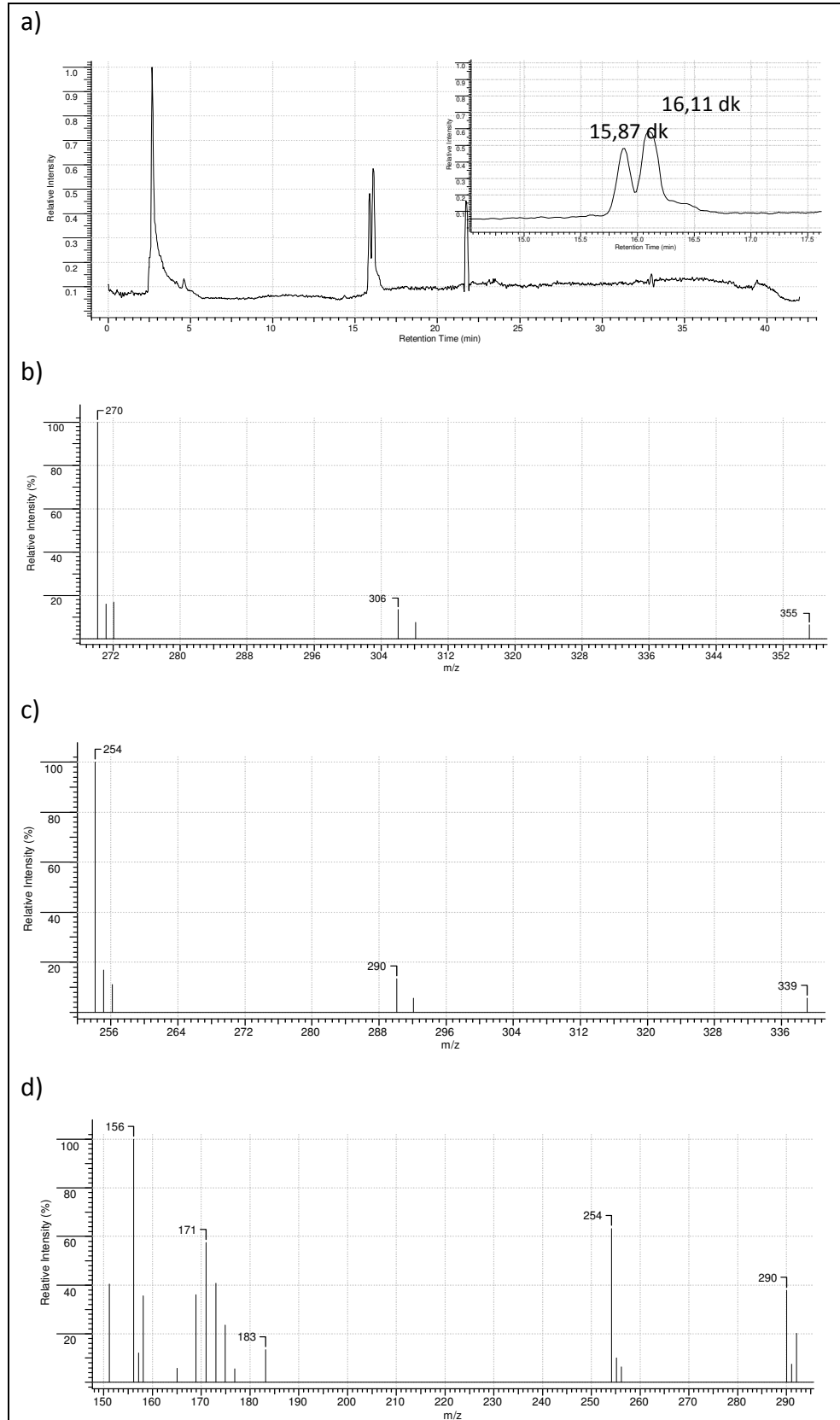
Şekil 4.63: 8a'nın nitroredüktaz aracılı indirgenmesi sonucu oluşması muhtemel metabolitler. İndirgenme tek bir nitro grubu üzerinde şematik olarak gösterildi.

8b ile gerçekleştirilen araştırmada ise reaksiyon önce ve sonrasında 21,8 dakikada gelen pikin 286 m/z [M-H]⁻ iyonu olarak substrata ait olduğu görüldü (Şekil 4.64 ve 4.66). Her iki enzimle de (Ssap-NtrB ve GkNtrA) ayrı ayrı gerçekleştirilmiş reaksiyonların LC kromatogramına bakıldığında reaksiyon öncesinden farklı olarak 4,6 dk (sadece Ssap-NtrB için), 15,9 dk ve 16,1 dk'de pikler görüldü (Şekil 4.65 ve 4.67). Bu piklerin kütleleri sırasıyla 256, 256 ve 272 m/z olarak belirlendi. 8a ve 8b bileşiklerinin molekül kütleleri eşit ve bu iki substrat birbirinin izomeridir. Kolondaki alıkonma zamanına ve belirlenen m/z değerlerine göre 4,6 dk gelen (256 m/z, [M-H]⁻) pikin 8b'deki iki nitro grubundan birinin tamamen amine kadar indirgenmiş formuna, 15,9 dk gelen (256 m/z, [M-3H]⁻) pikin bileşikteki her iki nitro grubunun hidroksilamine indirgenmiş formuna ve 16,1 dk gelen (272 m/z, [M-H]⁻) pikin de bir nitro grubunun hidroksilamine indirgenmiş formuna ait olduğu söylenebilir (Şekil 4.69) 256, 272 ve 286 m/z kütleleri öncü (prekürsör) iyon olarak seçilip ürün iyon (product ion) modu ile parçalanmaları sağlanıp oluşan iyonlara da bakıldı (Tablo 4.5). Bu iyonlarının parçalanma dağılımına bakıldığında indirgemenin hangi nitro grubu üzerinden gerçekleştiği belirlenememektedir. Şekil 4.68'de de görüldüğü gibi

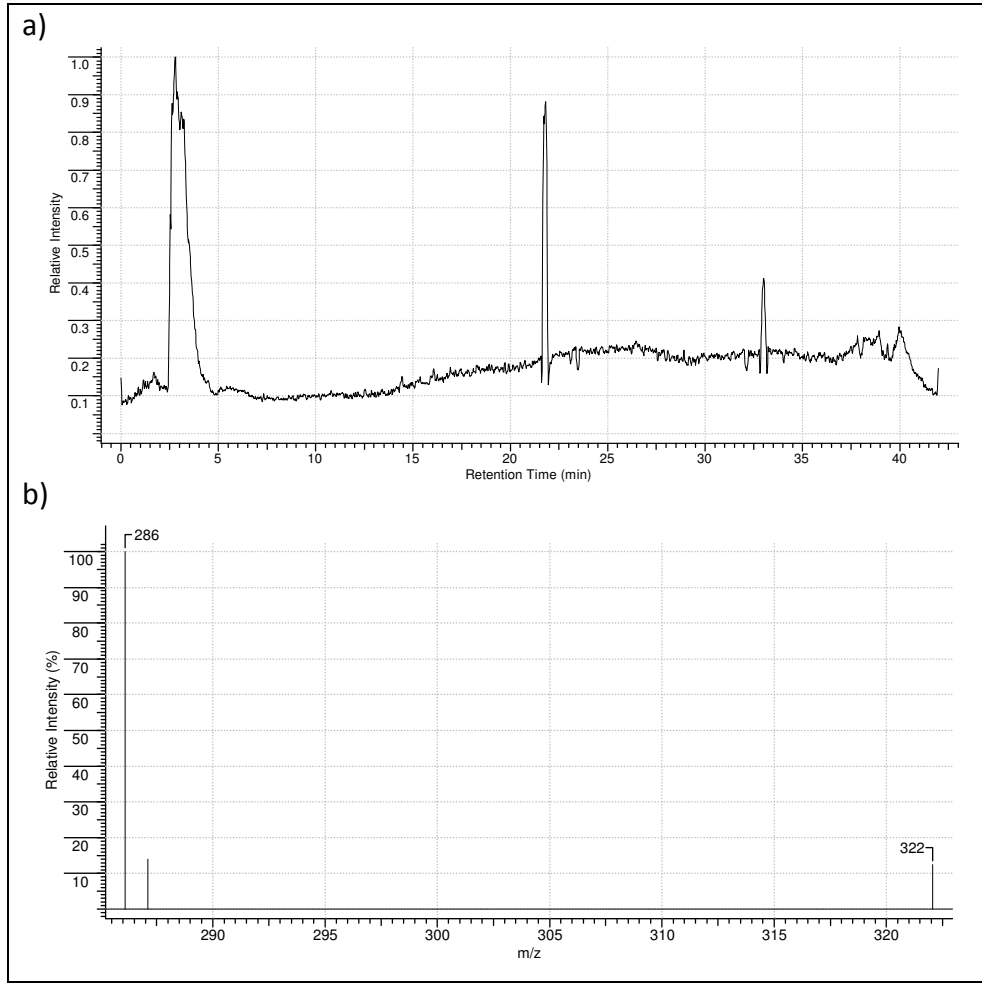
indirgemenin karbonil tarafındaki veya diğer taraftaki nitro grubundan olması durumundaki her iki durumda da aynı kütlelere sahip parçalanma ürünleri oluşmaktadır.



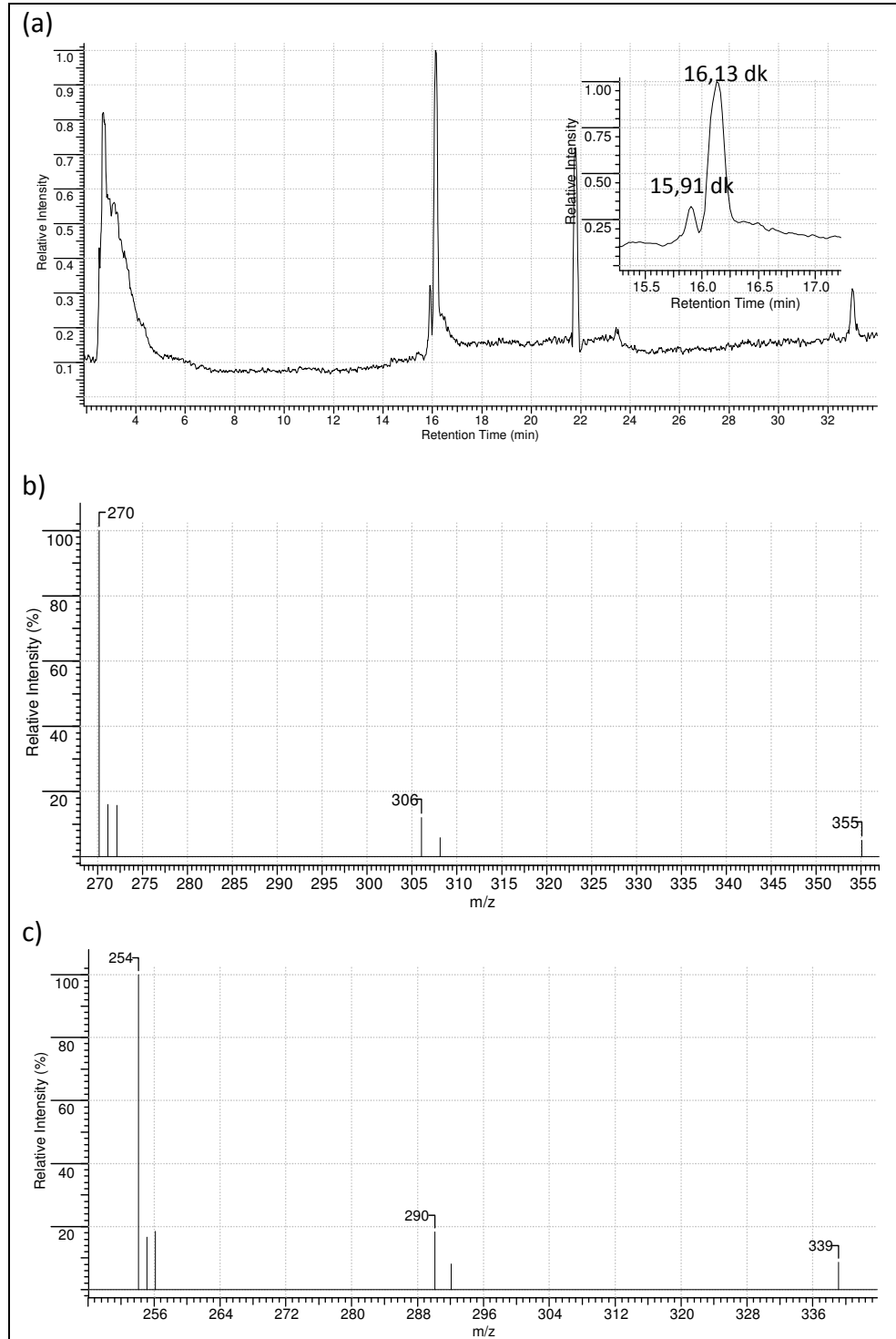
Şekil 4.64: 8b'nin a) açık yapısı, b) Ssap-NtrB ile reaksiyon öncesine ait LC kromatogramı ve c) 21,78 dk'de gelen pikin MS spektrumu.



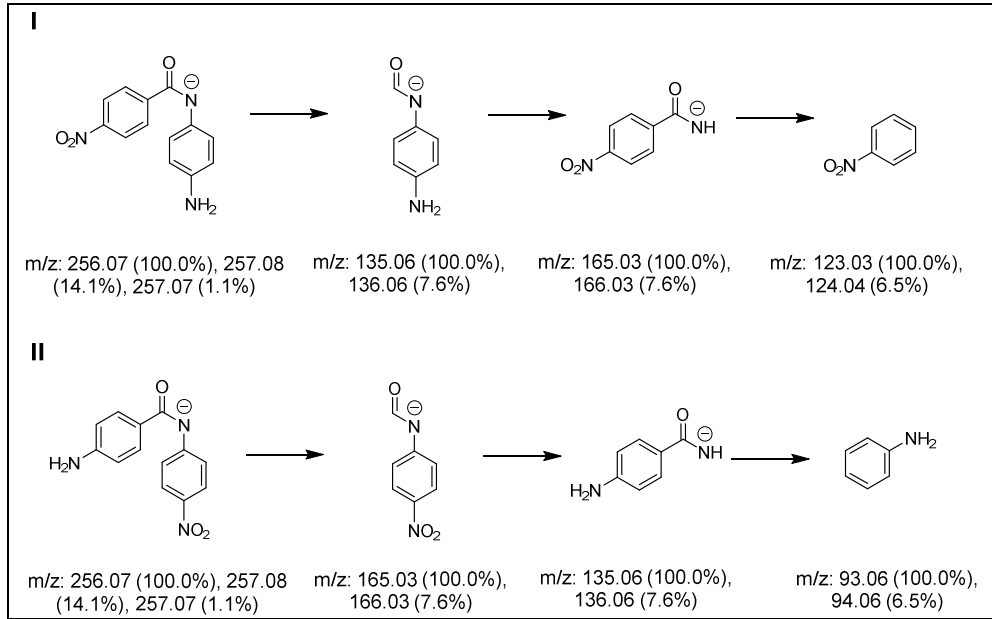
Şekil 4.65: 8b'nin Ssap-NtrB ile reaksiyonuna ait a) LC kromatogramı, b) 16,1 dk'de gelen pikin MS spektrumu, c) 15,9 dk'de gelen pikin MS spektrumu ve d) 4,6 dk'de gelen pikin MS spektrumu.



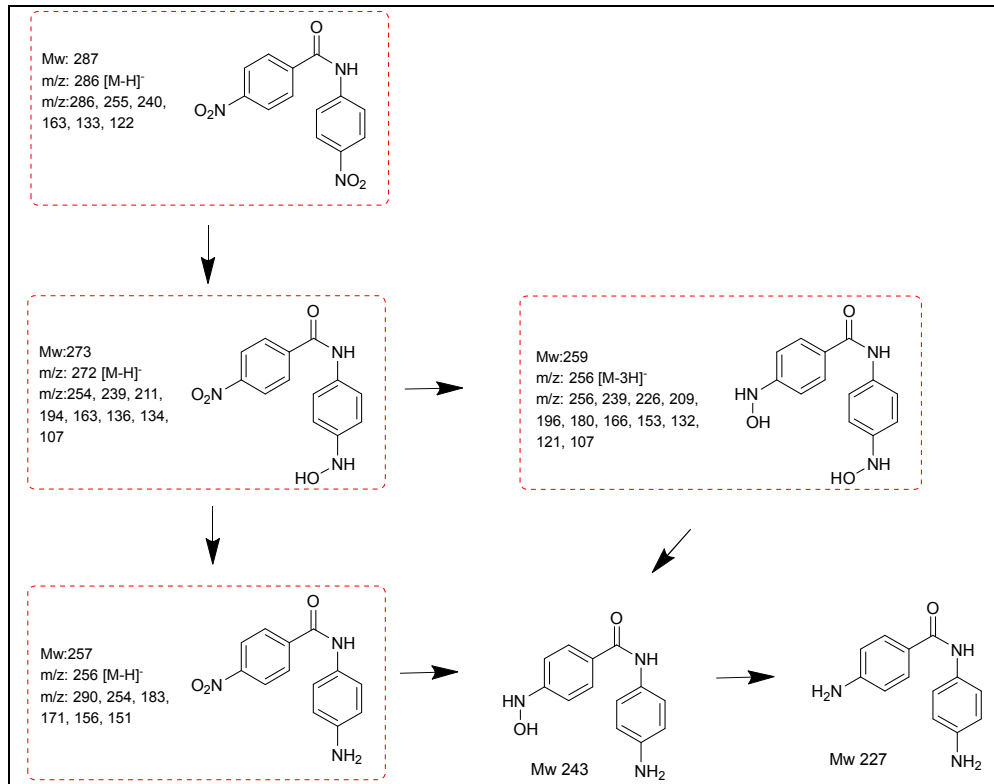
Şekil 4.66: 8b'nin GkNtrA ile reaksiyon öncesine ait a) LC kromatogramı b) 21,78 dk'de gelen pikin MS spektrumu.



Şekil 4.67: 8b'nin GkNtrA ile reaksiyonuna ait a) LC kromatogramı b) 16,13 dk'de gelen pikin MS spektrumu, c) 15,91 dk'de gelen pikin MS spektrumu.



Şekil 4.68: 256 m/z kütleli molekülün olası parçalanma ürünleri.



Şekil 4.69: 8b substratının nitroredüktaz aracılı indirgenmesi sonucu oluşması muhtemel metabolitler. İndirgenme tek bir nitro grubu üzerinde şematik olarak gösterildi.

8a ve 8b'nin hem Ssap-NtrB hem de GkNtrA katalizli reaksiyonlarının LC kolonunda ayırma işlemi ve akabinde kütle spektrumu alındı. Hatta belirli kütlelerin

seçimi ile o kütlelerin parçalanma dağılımına ait spektrumlar da kaydedildi. Diğer bileşiklerde ise hızlı tarama modu (quick scan mode) ile reaksiyon ve kontrollerin (TSK ve TSE) analizleri gerçekleştirildi. Ancak bu şekilde sınırlı bilgi elde edildi. Çünkü hem substratın kendisi hem de reaksiyon ürün(ler)i ve moleküllerden kopan parçalardan geriye kalan fragmentler tek bir spektrumda görülmekte ve bu da çözümlemeyi zorlaştırmaktadır. Kontrollerde görülen iyonların haricinde reaksiyon spektrumlarında farklı iyon var ise bu ürün olarak değerlendirildi. Bununla birlikte bazı iyonların oluşması muhtemel ürünlere denk gelmeme durumu da görüldü. Bu tarz iyonlar için de bilinmeyen iyon terimi kullanıldı. Kontrol ve reaksiyonların kütle spektrumunda gözlenen kütleler Tablo 4.6'da verildi.

8c'nin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu kontrollerden farklı olarak gözlenen 257 m/z $[M-H]^-$ iyonu bileşikteki üç nitro grubunun ikisinin amine birinin hidroksilamine kadar indirgenmesi sonucu oluşan metabolite (Mw 258) ve 317 m/z $[M-H]^-$ iyonu da bir nitro grubunun hidroksilamine kadar indirgenmesi sonucu oluşan metabolite (Mw 318) ait olabilir. Reaksiyonlara ait MS spektrumunda görülen 277 ve 293 m/z kütlelerinin hangi bileşiğe ait olduğu belirlenemedi. Substratın kendisi de 331 m/z $[M-H]^-$ iyonu olarak gözlendi (Mw 332). Parçalanma ürünlerine bakılarak hangi nitro grubunun indirgendiği konusunda yorum yapmak güçtür.

10 numaralı substratın Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucunda elde edilen kütle spektrumları incelendiğinde 346, 332, 316 ve 302 m/z $[M-H]^-$ iyonları görüldü. Bunlar sırasıyla substrat (Mw 347), bileşikteki bir nitro grubunun hidroksilamine indirgenmesi ile oluşan ürün (Mw 333), bileşikteki bir nitro grubunun amine indirgenmesi ile oluşan ürün (Mw 317) ve bileşikteki üç nitro grubundan birinin hidroksilamin birinin amine indirgendiği ürün (Mw 303) olduğu düşünülmektedir. 158 m/z iyonu ise molekülden NO^- grubunun ayrılmasıyla (M-30) oluşan -2 değerlikli iyonu ifade ederken 300 m/z'de molekülden NO_2 grubunun ayrılmasıyla (M-46) oluşan iyonu ifade etmektedir. Bileşikteki hangi nitro grubunun indirgendiğini belirlenemedi. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyon tek nitro grubunun amine kadar indirgenmesini sağlamış ancak daha ileri gidemedi. SsapNtrB ile gerçekleştirilen reaksiyon ise ikinci bir nitro grubunun indirgenmesi başlamış ancak hidroksilamin basamağında takıldı. Burada reaksiyonun kofaktör

sınırlamasında olduğu açıktır ve muhtemelen ileriki basamaklara gidilememenin sebebi ortamda indirgenmiş kofaktörün tükenmesidir.

2f'nin indirgenmesinin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli reaksiyonlarına ait MS spektrumlarına bakıldığında 303 m/z, substrata (2f) ait $[M-H]^-$ iyonu olarak belirlendi. 273 m/z $[M-H]^-$ iyonu bir nitro grubunun amine kadar indirgenmesi sonucu olabilecek ürünü (Mw 274) göstermektedir. 287 m/z ise 2f'den bir oksijen kopması sonucu (M-16) oluşmuş olabilir.

2g (Mw 318) substratının Ssap-NtrB ile indirgenmesi reaksiyonunun MS analizinden sonuç alınamadı. GkNtrA katalizli reaksiyona ait kütle spektrumuna bakıldığında 317 m/z kütlelerinin substrata (2g) ait $[M-H]^-$ iyonu olduğu görülmektedir. Muhtemel indirgenme ürünlerinin kütlelerine ait olabilecek kütle tespit edilemedi. HPLC analizlerinde her iki enzimin de bu substratı indirgeyip ürün oluşturduğu görülmüştü. Kütle analizinden sonuç alınamamasının doğru MS şartlarının sağlanmadığından kaynaklandığı söylenebilir. Kütle spektrumlarına bakıldığında 3b'de (Mw 270) de 2g'de olduğu gibi sadece substrata ait olduğu düşünülen 269 m/z $[M-H]^-$ iyonu görüldü.

3f'nin indirgenmesinin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli reaksiyonlara ait MS spektrumlarına bakıldığında 348 m/z, substrata (3f) ait $[M-H]^-$ iyonu olarak belirlendi. Sadece SsapNtrB katalizli reaksiyonda gözlenmiş 334 m/z $[M-H]^-$ iyonu bileşikteki dört nitro grubundan birinin hidroksilamine kadar indirgenmesi sonucu olabilecek ürünü (Mw 335) göstermektedir. 318 m/z $[M-H]^-$ iyonu da yalnızca bir nitro grubunun amine kadar indirgenmesi sonucu olabilecek ürünü (Mw 319) göstermektedir. 302 m/z ise 3f'den NO₂ grubunun kopması sonucu (M-46) oluşmuş olabilir.

3e'nin Ssap-NtrB katalizli reaksiyon sonucu oluşan ve MS spektrumunda 289 m/z $[M-H]^-$ iyonu bileşikteki üç nitro grubundan ikisinin hidroksilamine kadar indirgenmesi sonucu olabilecek ürünü (Mw 290) göstermektedir. 317 m/z kütlesi ise substrata (3e) ait $[M-H]^-$ iyonudur. GkNtrA katalizli reaksiyona ait kütle spektrumunda ne substrat ne de oluşabilecek muhtemel metabolitlerin kütleleri gözlenebildi.

7a, 3i ve (3i') bileşiklerinin indirgenmesinin her iki enzim ile de gerçekleştirilen reaksiyonlarına ait kütle spektrumlarında muhtemel ürünlere ait kütleler

görülememi. 291 m/z kütlesi 7a substratına ait $[M-H]^-$ iyonudur. 353 m/z kütlesi ise molekül kütleleri aynı olan 3i ve (3i') substratlarına ait $[M-H]^-$ iyonudur. Kütle spektrumunda substrata ait kütlenin görülürken ürünlere ait kütlelerin görülmemesi reaksiyonun gerçekleşmemiş olabileceğinden ya da oluşan metabolitlerin iyonlaşmalarının yeterli olmadığından kaynaklanmış olabilir.

25d'nin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli indirgenmesi sonucu MS spektrumunda görülen 345 m/z kütlesi 25d substratına ait $[M-H]^-$ iyonudur. Ssap-NtrB katalizli reaksiyona ait MS spektrumunda ürüne (Mw 332) ait kütle 331 m/z olarak görülürken GkNtrA katalizli reaksiyona ait kütle spektrumunda 329 m/z görüldü. Bu kütle bileşikteki üç nitro grubundan birinin hidroksilamine indirgenmesi sonucu oluşan metabolite ait olabilir.

25e'nin Ssap-NtrB katalizli reaksiyon sonucu MS spektrumunda görülen 360 m/z $[M-H]^-$ iyonu bileşikteki üç nitro grubundan birinin hidroksilamine indirgenmesi sonucu oluşan metabolite (Mw 361) ait olabilir. 344 m/z $[M-H]^-$ iyonu ise bileşikteki üç nitro grubundan birinin amine indirgenmesi sonucu oluşan metabolite (Mw 345) ait olabilir. MS spektrumunda görülen 374 m/z kütlesi 25e substratına ait $[M-H]^-$ iyonudur. GkNtrA ile gerçekleştirilen reaksiyonun MS soektrumunda substrata ait kütle görülürken ürünlere ait kütleler görülmedi.

25f'nin indirgenmesinin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli reaksiyonlarına ait MS spektrumlarına bakıldığında 419 m/z, substrata (25f) ait $[M-H]^-$ iyonu olarak belirlendi. Sadece Ssap-NtrB katalizli reaksiyonda gözlenmiş 405 m/z $[M-H]^-$ iyonu bir nitro grubunun hidroksilamine kadar indirgenmesi sonucu olabilecek ürüne (Mw 406) ait olabilir. Her iki enzimle de gerçekleştirilen reaksiyona ait MS spektrumunda 389 m/z $[M-H]^-$ iyonu bir nitro grubunun amine kadar indirgenmesi sonucu olabilecek ürüne (Mw 390) ait olabilir.

(26') substratının Ssap-NtrB ile indirgenmesi reaksiyonunun MS analizinden sonucuna baktığımızda sadece substrata ait kütle görülmekte onun haricinde ürünlere ait olabilecek kütleler görülmedi. Spektrumda görülen 363 m/z kütlesi substrata (26') ait $[M-H]^-$ iyonudur. GkNtrA katalizli reaksiyona ait kütle spektrumunda 349 m/z $[M-H]^-$ iyonu bir nitro grubunun hidroksilamine kadar indirgenmesi sonucu olabilecek ürüne (Mw 350) ait olabilir.

MS sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde her iki enzimin de bir çok bileşik için amin basamağına kadar indirgeme yapabilme gücünde olduğu görüldü. Bu sadece çalıştığımız potansiyel ilaç-öncü bileşikler için önemli bir gelişme olmakla kalmayıp bu enzimlerin substrat çeşitliliğinde yer alan diğer birçok bileşik için de oluşması mümkün ürünler için fikir oluşturmaktadır.

4.2.4. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

HPLC sonuçlarına göre aktifliği yüksek görülen potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli indirgenmesi reaksiyonlarına ait kinetik veriler Tablo 4.7’de verildi. Ayrıca literatürde yer alan bazı nitroredüktazların, ki bunların içerisinde NfsB kanser terapilerinde üzerinde en çok çalışılan nitroredüktazdır, CB1954 ve SN23862’nin indirgenmesi reaksiyonlarına ait kinetik sonuçları karşılaştırma yapabilme açısından söz konusu tabloda yer verildi. NfsB/CB1954 kombinasyonu, kanser terapilerinde en çok kullanılan kombinasyon olduğundan kinetik veriler (k_{cat} , K_M ve k_{cat}/K_M) bu ikiliye göre karşılaştırıldı. Ssap-NtrB’nin CB1954 için elde edilen katalitik etkinliği (k_{cat}/K_M) $2120 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [9] iken GkNtrA için hesaplanan $231745 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ dir ve bu değer Ssap-NtrB için hesaplanandan yaklaşık 100 kat fazla olduğu görüldü. Ayrıca GkNtrA’nin katalitik etkinliği, CB1954 için NfsB’ninkinden yaklaşık 33 kat daha yüksek ve tablodaki diğer nitroredüktazlardan da yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda GkNtrA’nin bu substrat için oldukça iyi bir enzim olduğunu söyleyebiliriz. Kanser terapilerinde üzerinde çalışılan bir diğer ilaç-öncü bileşik SN23862’ye karşı her iki enzimimizin de (Ssap-NtrB ve GkNtrA) aktif olduğu ve katalitik etkinlikleri karşılaştırıldığında Ssap-NtrB’nin NfsB ile yaklaşık aynı seviyede buna karşın GkNtrA’nin bu substratta da NfsB’den daha yüksek etkinliğe (yaklaşık 19 kat daha yüksek) sahip olduğu görülmektedir. Tez kapsamında çalışılan ilaç-öncü bileşiklerin Ssap-NtrB ve GkNtrA katalizli indirgenmesi ile gerçekleştirilen reaksiyonların kinetik verileri incelendiğinde CB1954’dan daha iyi substrat özelliği gösteren bileşikler olduğu görüldü. Örneğin 3d, 3f, 3c, 3a, 3b, 8c, 11a ve 12b bileşiklerinin Ssap-NtrB ile indirgenmesi sonucu elde edilen k_{cat}/K_M değeri CB1954 ile kıyaslandığında bu değer sırasıyla 580, 195, 161, 84, 76, 137, 46 ve 55 kat daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun anlamı Ssap-NtrB aracılı indirgeme

reaksiyonunda bu bileşiklerin CB1954'den daha iyi bir substrat olarak indirgenebildiği söyleyebiliriz. Ancak sözü edilen substratlar ile gerçekleştirilen reaksiyonlar kofaktör üzerinden takip edilirken CB1954 ile gerçekleştirilen reaksiyonlar ürün üzerinden takip edildiğini unutmamak gerekir. Enzimin tek bir nitro grubunu indirgerken (nitroso-hidroksilamin-amin sırasıyla) her bir basamakta kofaktör harcadığı düşünüldüğünde aktivitenin kofaktör üzerinden takibi ile elde edilen kinetik etkinliğin daha yüksek olacağı muhtemeldir. Ancak yine de Tablo 4.7'deki diğer bileşiklerin de sitotoksosite sonuçlarına göre kanser terapilerinde kullanıma potansiyelleri olduğunu düşünmekteyiz (Bkz Bölüm 4.2.5).

8b substratının çözünürlük probleminden dolayı Michealis-Menten kinetiği yapılamadı. Ssap-NtrB'nin bu substrata karşı spesifik aktivitesi $0,10 \pm 0,01$ U/mg ($68 \mu\text{M}$ 8b ve $198 \mu\text{M}$ NADPH) olarak hesaplandı. Ssap-NtrB'nin (2b')'ne karşı spesifik aktivitesi de $0,42 \pm 0,01$ U/mg ($15 \mu\text{M}$ 2b' ve $215 \mu\text{M}$ NADPH) olarak hesaplandı. Ssap-NtrB ve GkNtrA ile 8a'nın indirgenmesi reaksiyonunun kinetik parametrelerini belirlemek için artan substrat konsantrasyonuna karşı reaksiyon hızı grafiğe geçirildi. GkNtrA için $15 \mu\text{M}$ (NADH ile reaksiyon) ve $35 \mu\text{M}$ (NADPH ile reaksiyon) 8a konsantrasyonundan sonra inhibisyon etkisi görülürken, Ssap-NtrB'de aktivitenin düşmesi $420 \mu\text{M}$ 'dan sonra görüldü.

Tablo 4.7: CB1954, SN23862 ve tez kapsamında çalışılan potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin literatürdeki bazı NTR'ler, Ssap-NtrB ve GkNtrA ile indirgenmesine ait kinetik veriler.

Enzim	Substrat	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)	Kofaktör	Dalga Boyu (nm)	Kaynak
Ssap-NtrB	CB1954	$2,3 \pm 0,1$	$1065,2 \pm 53,1$	2120	NADPH	420	[9]
GkNtrA	CB1954	$12,1 \pm 0,2$	$52,0 \pm 4,3$	231745	NADH	420	Tez
GkNtrA	CB1954	$29,6 \pm 0,8$	$249,0 \pm 21,4$	118734	NADPH	420	Tez
NfsB	CB1954	$26,0 \pm 2,6$	3600 ± 660	7300	NADPH	420	[75]
NfsB	CB1954	62 ± 11	11000 ± 2600	5600	NADH	420	[75]
NfsA	CB1954	$16 \pm 0,5$	220 ± 18	73000	NADPH	420	[75]
ywrO	CB1954	$8,2 \pm 1,1$	618 ± 169	13268	NADPH	-	[71]
AzoR	CB1954	$0,2 \pm 0,0$	1400 ± 160	110	NADPH	420	[75]
AzoR	CB1954	$0,2 \pm 0,0$	6600 ± 1000	23	NADH	420	[75]
NfsB	SN23862	$26,4 \pm 7,2$	2500 ± 100	10560	NADH	-	[89]
ywrO	SN23862	ND	Aktif değil	-	NAD(P)H	-	[71]

Tablo 4.7: Devam.

Enzim	Substrat	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)	Kofaktör	Dalga Boy (nm)	Kaynak
Ssap-NtrB	SN23862	0,8±0,1	82,4±16,9	9350	NADPH	340	[9]
GkNtrA	SN23862	8,5±0,4	43,0±5,3	197788	NADPH	340	
Ssap-NtrB	3d	20,5±0,8	16,7±2,9	1224169	NADPH	340	
Ssap-NtrB	3f	13,6±0,9	32,9±5,2	412610	NADPH	340	
Ssap-NtrB	3c	4,9±0,4	14,3±4,7	342245	NADPH	340	
Ssap-NtrB	3a	10,5±1,2	59,0±14,1	177984	NADPH	340	
Ssap-NtrB	3b	10,2±1,2	63,4±22,7	160316	NADPH	340	
Ssap-NtrB	2i	0,1±0,0	15,7±5,8	8267	NADPH	340	
Ssap-NtrB	3i	0,1±0,0	16,7±4,5	7821	NADPH	420	
Ssap-NtrB	3i'	0,2±0,0	10,2±2,1	16502	NADPH	420	
Ssap-NtrB	7a	3,1±0,4	602,1±152,9	5102	NADPH	340	
Ssap-NtrB	11a	9,9±0,7	100,6±17,2	98284	NADPH	340	
Ssap-NtrB	12c	11,4±1,1	96,9±21,4	117278	NADPH	340	
Ssap-NtrB	2b	0,3±0,0	67,5±2,5	4136	NADPH	340	
Ssap-NtrB	2e	2,5±0,6	123,6±41,2	19940	NADPH	340	
Ssap-NtrB	14	6,5±0,6	128,4±29,3	50552	NADPH	340	
Ssap-NtrB	10	0,2±0,0	26,6±2,7	7100	NADPH	450	
Ssap-NtrB	8c	19,2±2,0	66,1±13,5	290975	NADPH	340	
GkNtrA	10	0,2±0,0	125,8±37,2	1367	NADPH	450	
GkNtrA	3i	0,3±0,0	10,7±1,2	25233	NADPH	420	
GkNtrA	3i'	0,4±0,0	59,0±10,5	6399	NADPH	420	
GkNtrA	3d	0,5±0,0	37,5±4,1	12815	NADPH	410	
GkNtrA	3a	3,5±0,1	31,6±2,3	111978	NADPH	340	
GkNtrA	3b	4,6±0,5	42,1±11,6	110387	NADPH	340	
GkNtrA	3f	2,5±0,1	44,2±4,5	56671	NADPH	450	

Tablo 4.7'de CB1954, SN23862 ve tez kapsamında çalışılan bazı potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin literatürdeki bazı NTR'ler, Ssap-NtrB ve GkNtrA ile indirgenmesine ait kinetik veriler karşılaştırılmıştır.

4.2.5. Sitotoksosite Çalışmaları

Sitotoksosite çalışmaları Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve Dr. Esra TOKAY tarafından gerçekleştirildi. Potansiyel ilaç-öncülerin tek başına toksisiteyi beş ayrı konsantrasyonda (150 μM , 75 μM , 37,5 μM , 18,8 μM , 9,4 μM ve 0 μM (sadece DMSO)) 24 ve 48 saat hücrelerle muamele edilerek MTT deneyleri ile gerçekleştirildi. İlaç-öncü bileşiklerin Hep3B ve

HT-29 kanser hücre hatları ile HUVEC sağlıklı hücre hatlarının büyümesi üzerine etkisi etkileri incelendi. Ssap-NtrB kataliziyle potansiyel ilaç-öncülerin indirgenmesi sonucu metabolitler *in vitro* olarak oluşturulmuş olup reaksiyon karışımı hücrelere (Hep3B ve PC3 kanser hücre hatları ile HUVEC sağlıklı hücre hattı) verildi. Reaksiyon deneylerinde reaksiyonun gerçekleştirilmesi için gerekli kofaktörün (NADH) MTT deneylerinde sonuca girişimde bulunması sebebiyle alternatif bir yöntem olan SRB kullanıldı. Reaksiyon deneylerinde; negatif kontrol olarak herhangi bir şey ile muamele edilmemiş hücre, kontrol 1 olarak sadece ilaç-öncü bileşik, kontrol 2 olarak ilaç-öncü + Ssap-NtrB kullanıldı.

Hep3B ve HT-29 kanser hücre hatları ile HUVEC sağlıklı hücre hatlarının potansiyel ilaç-öncülere karşı verdikleri cevaplar aşağıda daha ayrıntılı anlatılmakla birlikte Şekil 4.70'te özetlenmiştir. Yeşil ile gösterilen bileşiklerin ilaç-öncü olma potansiyeli vardır. Ancak kırmızı ile gösterilenler ilgili kanser hücrelerine kendileri toksik etki gösterdikleri için ilaç-öncü konseptine uygun değildir.

	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3i	3i'	3j	3k
Hep3B	☠	☠	☠	☠	☠	☠	☠	☠	☠	☠	☠
HUVEC						☠	★	★	★		★
HT-29						☠	★	★	★		
	2a	2b	2c	2d	2f	2i	2j	2k			
Hep3B	★	★	★	★	★	★	★	★			
HUVEC											
HT-29											
	24e	25d	25e	25f	25h	25i	26'	26''			
Hep3B	★	★	★	☠	☠	☠	☠	☠			
HUVEC		★	★	★	★	★	☠	★			
HT-29		★	★	★	★	★	☠				
	8a	8b	8c	8f	10	14	16	17	11a	11b	
Hep3B	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	
HUVEC	★	★	★	★	★						
HT-29	★	★	★	★	★						
Toksik ☠ Toksik değil ★											

Şekil 4.70: MTT yöntemi ile potansiyel ilaç-öncü bileşiklerin Hep3B, HT-29 kanser hücre hattı ve HUVEC sağlıklı hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.

3 serisi bileşiklerinin hepsinin Hep3B karaciğer kanser hücre hattı üzerine toksik etkisi gözlemlendi. İlaç-öncü olarak bu kanserde kullanılma potansiyeli olmayan

söz konusu bileşiklerden 3i, 3i' ve 3g'nin sağlıklı hücelere (HUVEC) ve kolon kanseri hücrelerine (HT-29) toksik etki göstermemeleri kolon kanserinde kullanılma potansiyeli olduğuna işaret etmektedir. 3f'nin toksik etki gösterirken 3g'nin toksik etki göstermemesi 3g'nin 3f'den sadece bir $-CH_2$ grubu fazlalığından kaynaklandığı söylenebilir. Aynı şekilde 3i ve 3i' bileşikleri de 3f'den yapıcı büyüktür ve toksik etki göstermemiştir.

3f maddesinin Hep3B, HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine toksik etkisi gözlemlendi. Hep3B hücreleri üzerine IC_{50} değeri 48 saatte 56,8 μM iken, HUVEC'lerde bu değer 78,9 μM olarak belirlendi. HT-29 hücrelerinde ise 150 μM konsantrasyonda toksik etki gösterdi. Ancak hücreleri % 50 olacak şekilde inhibe etmedi. Hücre dışı reaksiyon sonucunda oluşan metabolitler maddenin tek başına gösterdiği toksisiteyi arttırmadı. CB1954 ile kıyaslandığında metabolitleri toksik etkilidir ancak kendisi de tek başına toksik olduğundan GDEPT için uygun bir ilaç-öncü olmadığı düşünülmektedir.

3g maddesine ait sitotoksik aktivite sonuçlarına göre 3g'nin 48 saat sonunda Hep3B hücreleri üzerine toksik etkili olduğu gözlemlendi. Ancak HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine toksisite göstermediği tespit edildi. Hücre dışı reaksiyon deneyleri sonuçlarına göre ise reaksiyon sonucu oluşan metabolitler HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine toksik etki göstermezken, prostat kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etmişlerdir. Özellikle prostat kanseri hücrelerinde 48 saatte, CB1954 kadar toksik etki gösterdi.

3i maddesine ait sitotoksik aktivite sonuçlarına göre 3i Hep3B hücreleri üzerine toksik etkilidir. 48 saat sonunda 9,4 μM 'lık dozun hücrelerin yaklaşık % 50'sini öldürdüğü gözlemlendi. HT-29 ve HUVEC hücreleri üzerine toksik etki göstermedi. Reaksiyon deney sonuçları göstermektedir ki oluşan metabolitler Hep3B ve HUVEC hücreleri için önemli bir toksisite göstermezken, PC3 hücreleri üzerine CB1954 ile yarışacak şekilde toksik etki oluşturmuştur.

3i' maddesinin Hep3B hücreleri üzerine 24 saat için kayda değer bir toksisite görülmezken 48 saatte toksik etki görülmüş ve IC_{50} değeri 17,54 μM olarak hesaplandı. HT-29 hücreleri üzerine toksik etki göstermedi. Reaksiyon deneyleri sonuçlarına göre ise oluşan metabolitler Hep3B (24 saatte) ve PC3 (48 saatte) için CB1954 ile yarışacak şekilde toksik etki oluşturduğu görüldü. HUVEC yani sağlıklı

hücrelerde ne reaksiyonda ne de kontrollerde toksik etki gözlenmedi. Bu sonuçlar (3i')n n GDEPT için potansiyel bir bileşik olabileceğine işaret etmektedir ve bu bileşik için daha çok çalışma yapılabilir.

3k'nın Hep3B hücreleri üzerine toksik etkisi görülmüş (24 sa: IC₅₀= 67  M ve 48 sa: IC₅₀=16  M) buna karşın HUVEC hücreleri üzerine 24 saatte sitotoksik etkisi gözlenmedi. Reaksiyon deneyleri sonuçlarına göre ise oluşan metabolitler Hep3B (24 saatte) ve PC3 (48 saatte) için CB1954 ile yarı acak şekilde toksik etki oluşturduğu görüldü. HUVEC yani sağlıklı hücrelerde 24 saat için reaksiyonda ve kontrollerde yaklaşık % 80 hücre canlılığı gözlendi. Bu sonuçlar 3k'nın GDEPT için potansiyel bir bileşik olabileceğine işaret etmektedir ve bu bileşik için daha çok çalışma yapılabilir.

8a, 8b, 8c ve 8f maddeleri, Hep3B, HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine toksik etki göstermedi. Yapılan hücre dışı reaksiyon deneyleri sonucunda oluşan metabolitler ise Hep3B hücreleri üzerine kontrollere göre çok az toksik etki gösterirken, metabolitlerin PC3 kanser hücreleri üzerine büyümeyi inhibe edici etki gösterdiği görüldü. PC3 kanser hattı hücreleri üzerine yapılan deneylerde bu potansiyel ilaç- onc lerin en az CB1954 kadar etkili olduğu görüldü. Ssap-NtrB'siz kontrollerde toksisite daha az iken reaksiyon sonucu oluşan metabolitlerin toksisitesi daha fazladır.

25f, 25h ve 25i maddeleri toksik karakter olarak birbirine benzemektedirler. Bu bileşiklerin hepatoma hücreleri üzerine toksik etkili olduğu (IC₅₀ sırasıyla 43  M, 150  M ve 51  M) HT-29 ve HUVEC hücre hatları üzerine ise sitotoksik etkilerinin olmadığı görüldü. Reaksiyon deneylerine bakıldığında ise bu bileşiklerin Ssap-NtrB enzimi ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu metabolitler özellikle prostat kanser hücreleri üzerine etkili olmuştur. 25h bile i inin metabolitleri 48 saat sonucunda prostat kanseri hücreleri  zerine CB1954'den daha fazla toksik etkili olmuştur. 25f'nin Hep-3B ve PC3 kanser hücrelerine reaksiyon kontrollerinde de sitotoksik etki görülürken metabolitlerin bu etkiyi artırdığı gözlendi. 25i bile i inin metabolitleri ise ne Hep3B ne de PC3 hücrelerine sitotoksik etki gösterdi. 25d ve 25e bileşiklerinin Hep3B, HT-29 ve HUVEC hücre hatlarına toksik etkili olmadığı görüldü. Bu bileşiklerin enzimatik denemeleri çalışılabilir.

26' bileşiği özellikle 48 saat sonucunda Hep3B, HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine toksik etki gösterdi. Hepatoma hücreleri üzerine denenmiş reaksiyon deneyleri ise metabolitlerin toksik etkisi görülmedi.

26'' bileşiği, Hep3B hücreleri üzerine toksik etkilidir. Ancak HUVEC'lerde toksik etki göstermedi. Reaksiyon bulguları analiz edildiğinde ise bileşiğin ve oluşan metabolitlerin toksisitelerinde fark gözlenmedi.

10 bileşiği, hem tek başına hem de reaksiyonu sonucu oluşan metabolitler Hep3B, HUVEC ve HT-29 hücreleri üzerine etki göstermedi.

3a, 3b ve 3j bileşikleri hem 24 hem de 48 saat süreleri sonunda Hep3B hücreleri üzerine toksik etki gösterirken 3e'nin daha az toksik etki gösterdiği gözlemlendi. 3c ve 3d maddeleri ise özellikle 48 saat süresince Hep3B hücrelerinin büyümesini negatif yönde etkiledi. 2a, 2b, 2c, 2d, 2f, 2k, 2j, 2i, 11a, 11b, 14, 16, 17, 24e, bileşikleri Hep3B hücrelerine sitotoksik aktivite göstermemişlerdir.

12a maddesi Hep3B hücreleri için sitotoksik özellik göstermezken, 12c maddesi Hep3B hücreleri üzerine çok az toksik etkilidir.

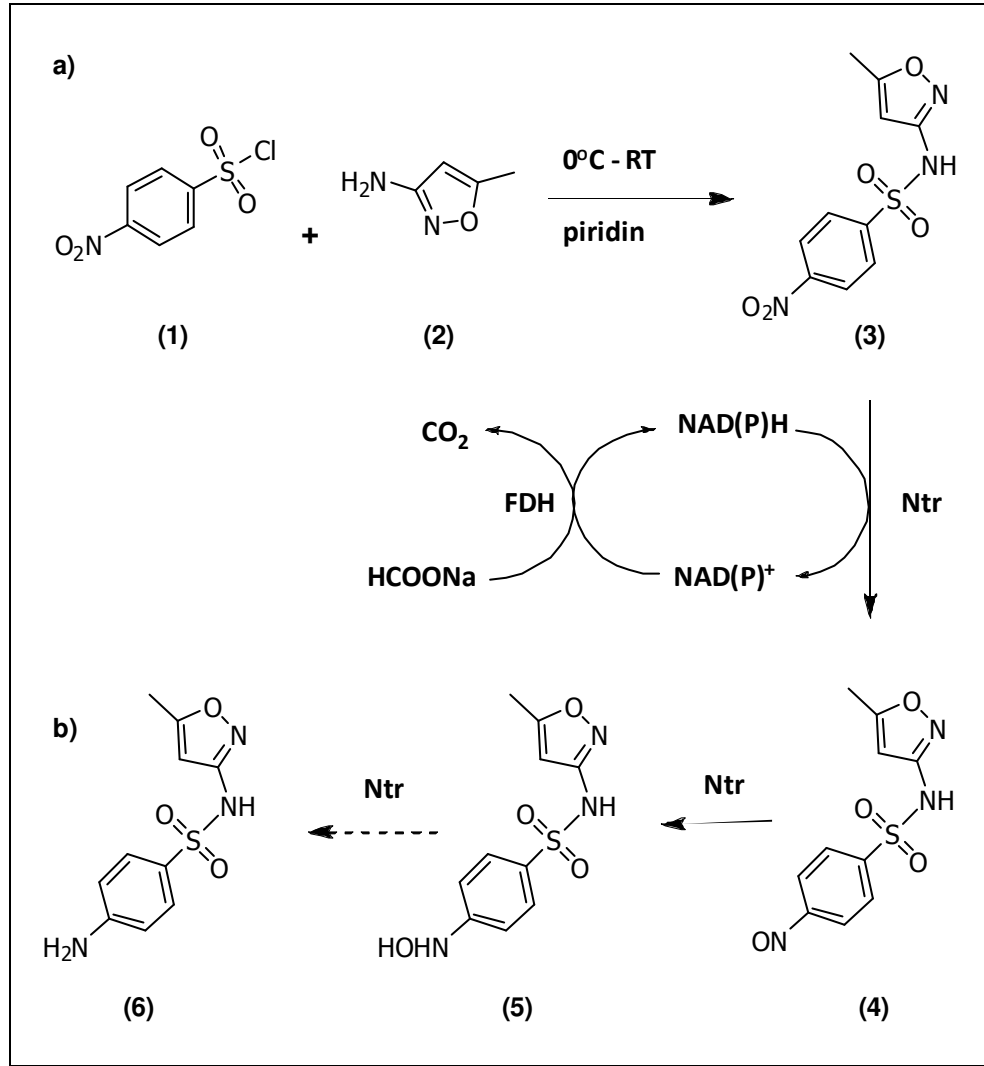
4.3. Nitroredüktaz Kullanılarak Pro-Antibiyotik Aktivasyonu

İlaçların fizikokimyasal ve farmokinetik özelliklerini geliştirmek ve ayrıca olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla tasarlanan ilaç-öncü (prodrug) bileşikleri ile ilgili çalışmalar 1958 yılından beri devam etmektedir. Şu bir gerçek ki şuan mevcut ilaçların neredeyse üçte biri iyileştirilmiş ADMET özelliklerine sahip ilaç-öncüler olarak satışa sunulmaktadır [145]. Bu strateji özellikle son 20 yılda giderek artan bir ilgi ile önem kazanmış ve kanser terapilerinde klinik denemelere girmeyi başarmıştır [44]. İlaç-öncü konsepti, aktif olmayan veya az aktif ilacın vücutta istenilen etkiyi gösterecek aktif formuna dönüşümünü temel alır. Bu dönüşüm kimyasal veya enzimatik olabilir. Bu formatta aktivasyonda kullanılan geleneksel enzimler spesifik olmayan esterazlar [146], alkalın fosfatazlar [147], peptidazlar [148] ve spesifik P450 enzimleridir [149], [150]. Bunların yanında nitroredüktazlar bu sınıfa dahil olabilecek yeni bir enzim ailesidir [46], [75]. NTR'ler ilaç-öncü maddesini indirgeyerek aktif formuna dönüşümünü sağlarlar [151]. Bilinen en iyi örneği *E. coli* nitroredüktazı

NfsB ile CB1954 kombinasyonudur. Bu kombinasyonun klinik denemeleri (faz I/II) ileri tümör hastalarında devam etmektedir [22], [152]. Nitroredüktazlar çok yönlü enzimlerdir ve geniş bir substrat aralığında birçok nitroaromatik bileşiğin nitroso, hidroksilamin ve amin türevlerine indirgenmesi reaksiyonunu katalizlerler [3]. Tezin bu bölümünde nitroredüktazların antibiyotik aktivasyonunda kullanılabilirliği yönüne araştırmalar yapılarak bu çok yönlü enzimlerin yeni bir biyoteknolojik uygulaması hedeflendi. Bu çalışmadaki yaklaşım mevcut antibiyotiklerin pro-antibiyotik olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Burada patojen özellikteki hedef bakterinin kendi enzimi ile pro-antibiyotiğin aktif antibiyotiğe dönüşmesini sağlamak ve bakteriyi kendi silahı ile vurmak üzerinden yola çıkıldı.

Staphylococcus saprophyticus, üropatojen gram pozitif bir bakteridir ve genç-orta yaş bayanlarda ürolojik hastalığa yol açmaktadır [153]. Kuroda ve arkadaşları tarafından 2005 yılında genom dizisi aydınlatılan [154] bu bakterinin genomunda yer alan putatif nitroredüktaz geni klonlanmış ve rekombinant enzim, Ssap-NtrB, saf olarak elde edilip biyokimyasal karakterizasyonu yapıldı [9]. SMX, sulfonamid grubu bir antibiyotik olup idrar yolu ve solunum yolu enfeksiyonuna yol açan bakterilere karşı tek başına bakteristatik etki sağlamaktadır. Bununla birlikte SMX, genellikle trimetoprim ile kombine edilerek (5:1 oranında) kullanılmakta ve bu şekilde birçok gram pozitif ve gram negatif bakteriye (*Streptokoklar*, *Stafilokoklar*, *E. coli*, *Haemophilus influenza*) öldürücü etki yapmaktadır [155]. Dünya Sağlık Örgütü'nce SMX'in, 2015 yılı esansiyel ilaçlar listesinde yer aldığı ve en temel sağlık koruma ilaçlarından biri olduğu belirtilmiştir [156].

Bu çalışmada çeşitli enfeksiyonlara sebep olan bir bakteri olan *Staphylococcus saprophyticus*'un kendi enzimi Ssap-NtrB kullanılarak yine bu enfeksiyonların tedavisinde mevcut olarak kullanılan antibiyotiğin (SMX) de öncü formu kullanılarak hedef mikroorganizmanın üzerine antibakteriyel etkisi araştırıldı. Böylece en çok kullanılan ilaçlardan olan antibiyotiklere farklı bir bakış ile yaklaşıldı. Özetle, *S.saprophyticus* üropatojen bakterilerine karşı kullanılan bir antibiyotikten yola çıkılarak; pro-antibiyotik sentezi, sentezlenen pro-antibiyotiğin Ssap-NtrB katalizli indirgenmesi ve oluşan ürün(ler) karakterizasyonu ardından disk difüzyon yöntemi ve sıvı kültür yöntemleri ile antimikrobiyal etkisinin incelenmesi çalışmaları gerçekleştirildi.



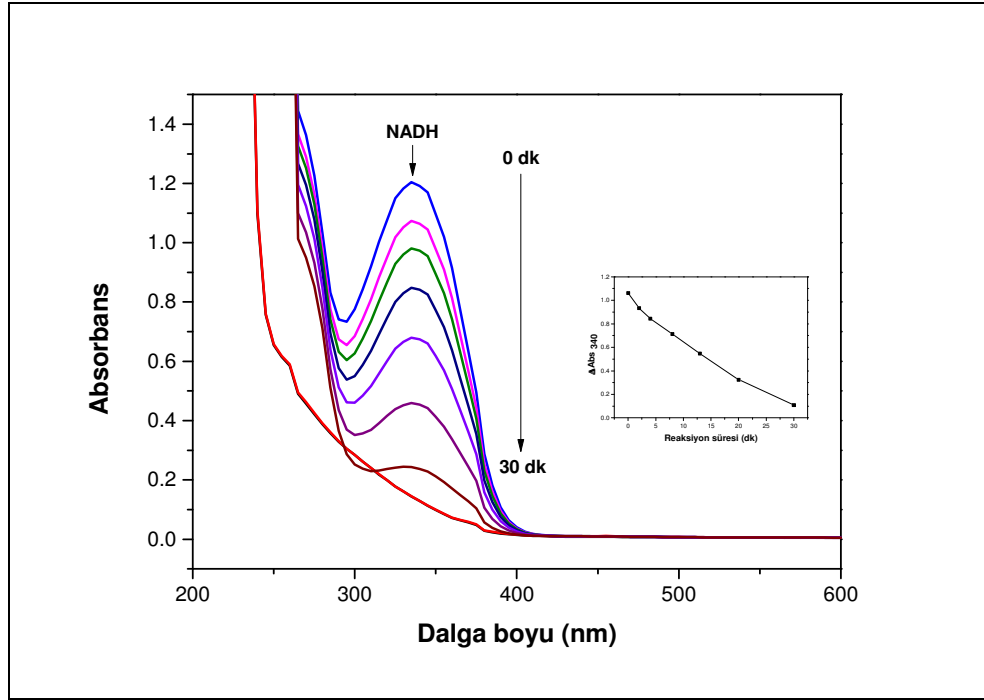
Şekil 4.71: a) Pro-antibiyotik sentezi (NO₂-SMX, 3) ve b) nitroredüktaz katalizli indirgeme sonucu oluşması muhtemel ürünler (NO-SMX, 4; N⁴-OH-SMX, 5 ve SMX, 6). Ortada kofaktör rejenerasyon sistemi gösterildi.

Pro-antibiyotik sentezine yönelik çalışmalar Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Kimya Bölümünde Prof. Dr. Mehmet Ay ve Dr. Tuğba Güngör tarafından gerçekleştirildi (Şekil 4.71 a)).

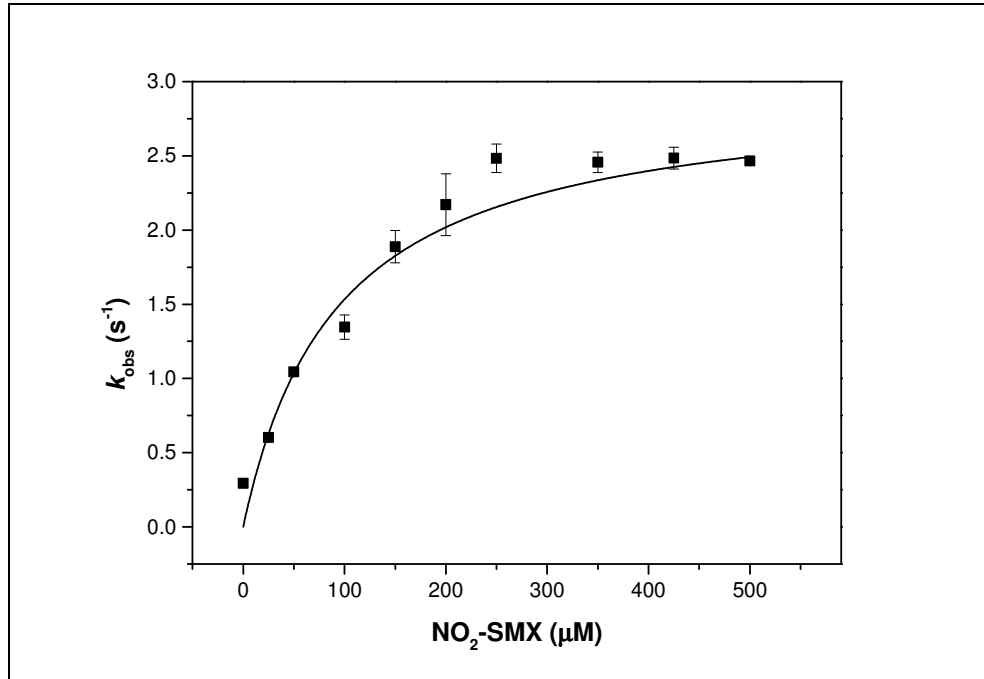
4.3.1. Kinetik Ölçümler

Ssap-NtrB'nin NO₂-SMX pro-antibiyotiğini indirgemesini incelemek için öncelikle tampon, substrat, enzim ve en son da kofaktörden oluşan tüm bileşenler sırayla ilave edilip spektrum taraması yapıldı. Kofaktör ilave edilmeden substratın

spektrumunda herhangi bir değişiklik yokken kofaktör ilavesiyle zamanla kofaktör pikiinde belirgin bir azalış gözlandı (Şekil 4.72).



Şekil 4.72: NO_2 -SMX'ün SsapNtrB katalizli indirgenme reaksiyonunun farklı zaman aralıklarıyla alınmış spektrumu. Küçültülmüş grafik; reaksiyon süresine karşı 340 nm'deki absorbans değişimini (ΔAbs_{340}) göstermektedir.



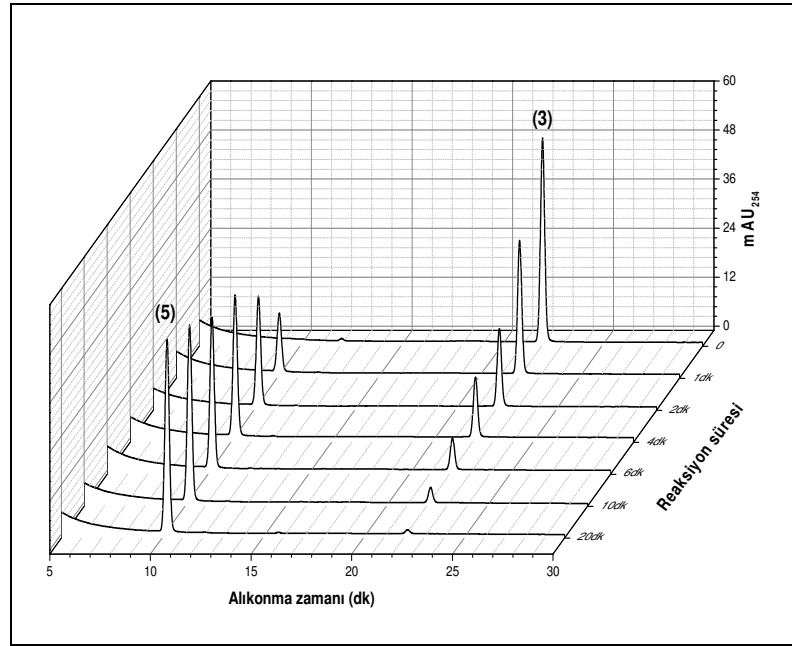
Şekil 4.73: NO_2 -SMX'ün Ssap-NtrB katalizi reaksiyonunun durgun hal kinetiği.

Substrat ve ürünün herhangi bir dalga boyunda absorbands vermemesinden dolayı kinetik ölçümler 340 nm’de kofaktör azalışı takip edilerek yapıldı. Substrat konsantrasyonuna karşı reaksiyonun başlangıç hızı grafiğe geçirilmiş ve OriginPro 9.0 programı ile Michaelis-Menten denkleminde uyduğu görülmüş ve non-lineer fit yapılarak grafik çizildi. Elde edilen kinetik veriler K_M $92.62 \pm 7.25 \mu M$ ve k_{cat}/K_M ise $31851 s^{-1}M^{-1}$ olarak hesaplandı (Şekil 4.73).

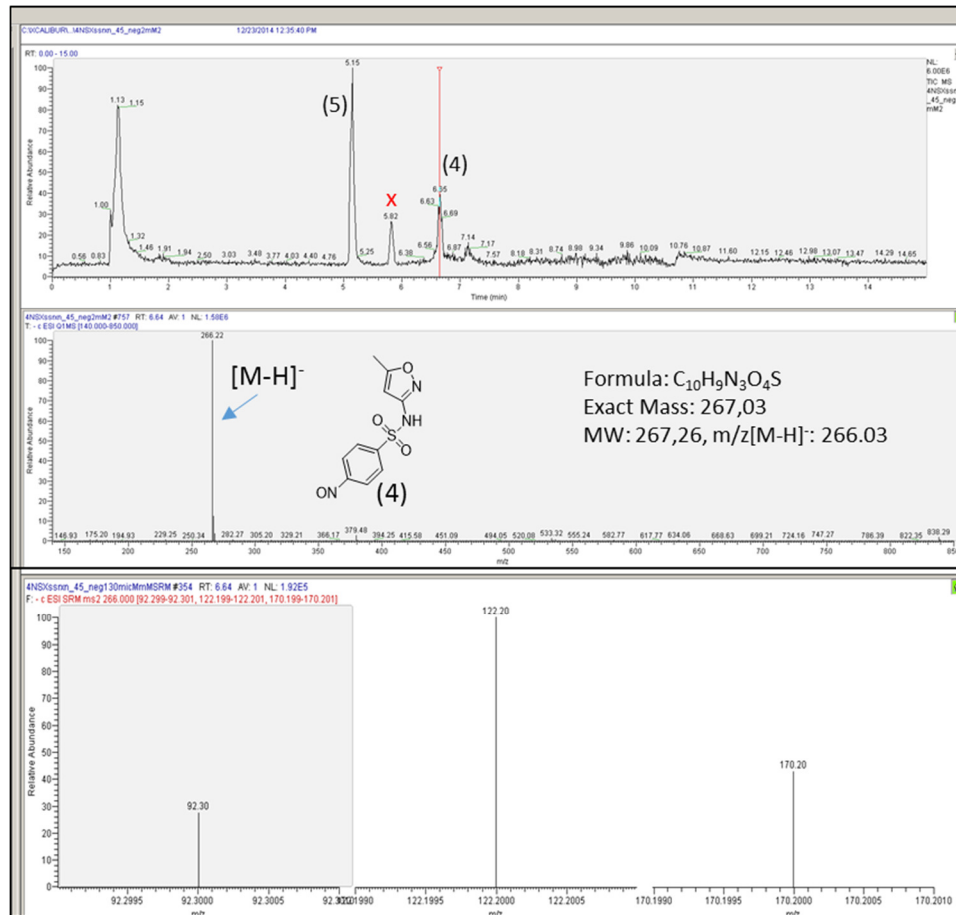
NO_2 -SMX’ün enzimatik indirgenmesi reaksiyonunda, ortamdaki kofaktör sınırlamasını kaldırmak için kofaktör rejenerasyonu sistemi kullanıldı. Bu şekilde fazla miktarda substrat kullanılarak büyük hacimde metabolit üretimi sağlandı. Daha sonra reaksiyon hacmini azaltmak için liyofilizasyon işlemi yapılmış ve konsantre metabolit (20 mM) elde edildi.

4.3.2. Metabolit Karakterizasyonu

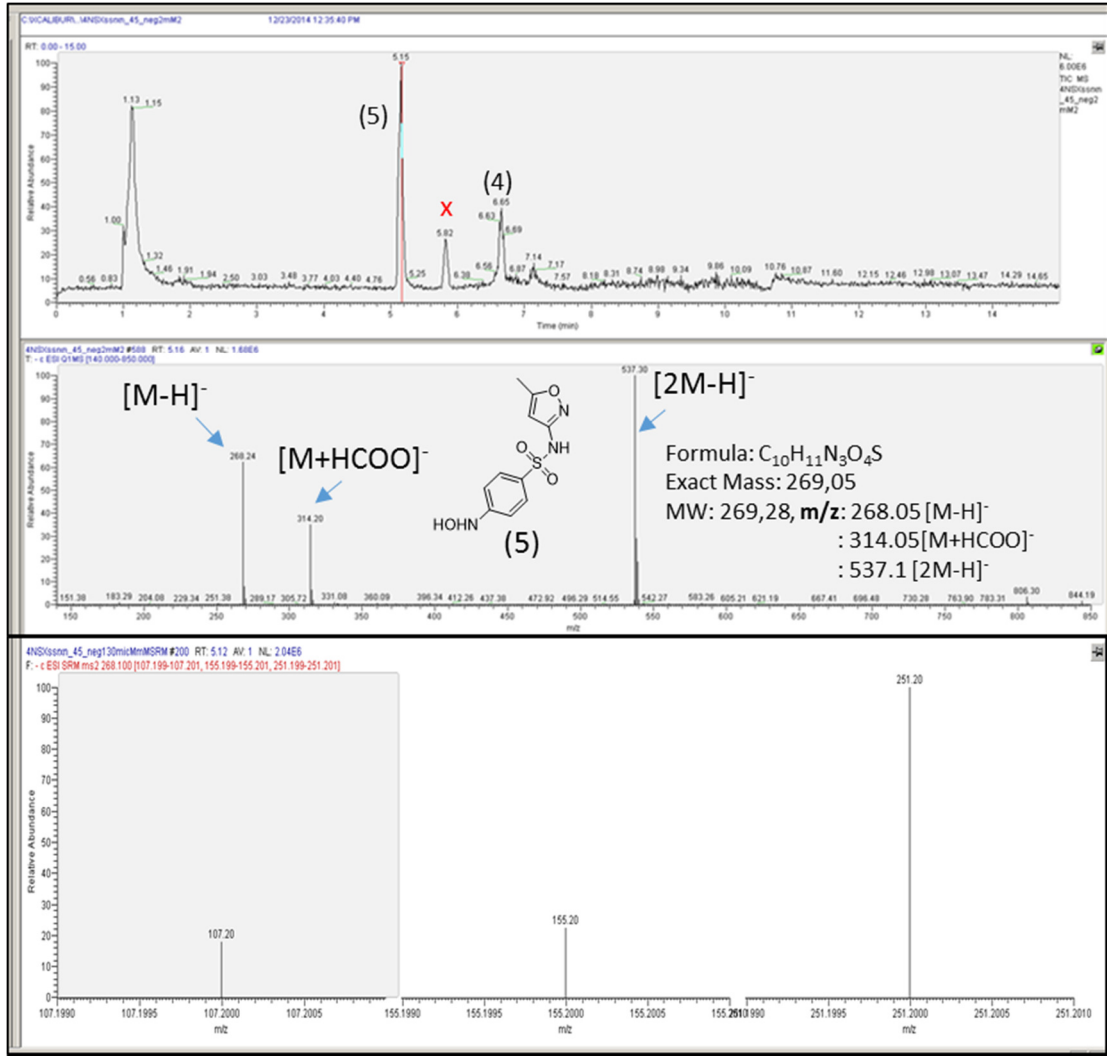
Spektrofotometrede kofaktörün azalışını görmekle birlikte bu azalışın NO_2 -SMX’ün indirgenmesinden dolayı olduğunu yani ürüne dönüşümü HPLC analizi ile incelendi. HPLC kromatogramında alıkonma zamanı 10,2 dk olan tek ürün gözlenmiş ve substrata ait pik 22,1 dk’da görüldü. Reaksiyon belirli aralıklarla 20 dakika boyunca takip edildi. Belirtilen reaksiyon şartlarında 20 dakika sonunda substratın tamamen tükendiği ve tek bir ürünün oluştuğu görüldü (Şekil 4.74). HPLC analizlerinde temel olarak tek ürün gözlenmekle birlikte LC-MS/MS analizinde negatif modda iki metabolit tespit edildi. Bunlardan biri oldukça kararsız bir ürün olan $[M-H]^-$ moleküler iyonu $m/z=266$ (parçalanma ürünleri $m/z=170$, 122 ve 92) olarak tespit edilmiş ve 267 molekül kütlesine sahip nitrosoyu (**4**) (alıkonma zamanı 6,35 dk) işaret etmektedir. Diğeri ise $[M-H]^-$ moleküler iyonu $m/z=268$ (parçalanma ürünleri $m/z=251$, 155 ve 107) olarak tespit edilen 269 molekül kütlesine sahip hidroksilamini (**5**) (alıkonma zamanı 5,15 dk) işaret etmektedir. Amin metaboliti (**6**) bahsedilen deney koşullarında tespit edilemedi.



Şekil 4.74: NO₂-SMX'ün Ssap-NtrB katalizli indirgenme reaksiyonuna ait zamana karşı substrat azalışı ve ürün oluşumuna ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.75: NO₂-SMX'in Ssap-NtrB katalizli indirgeme reaksiyonunun LC kromatogramı ve 6,35 dk'de gelen pikin (4) MS/MS analizi.



Şekil 4.76: NO₂-SMX'in Ssap-NtrB katalizli indirgeme reaksiyonunun LC kromatogramı ve 5,15 dk'de gelen pikin (5) MS/MS analizi.

Şekil 4.75 ve 4.76'da SMX'in pro-antibiyotik formu olan NO₂-SMX'in Ssap-NtrB katalizli indirgeme reaksiyonu sonucunda gözlenen kütleler ve oluşturdukları parçalanma kütleleri verilmiştir.

4.3.3. Antimikrobiyal Analizler

Pro-antibiyotik, enzimatik reaksiyon ürünü ve antibiyotiğin kendisi karşılaştırılarak disk difüzyon ve sıvı kültür yöntemleri ile antibakteriyal etki incelemeleri yapıldı. Disk difüzyon yönteminde 0,5 McFarland standardına denk gelecek şekilde kültürden Mueller Hinton Agar II petrisine ekimi yapıp bileşikler steril disklere emdirilip petri üzerine konmuş ve 16-24 saat sonra bakteri büyümesi

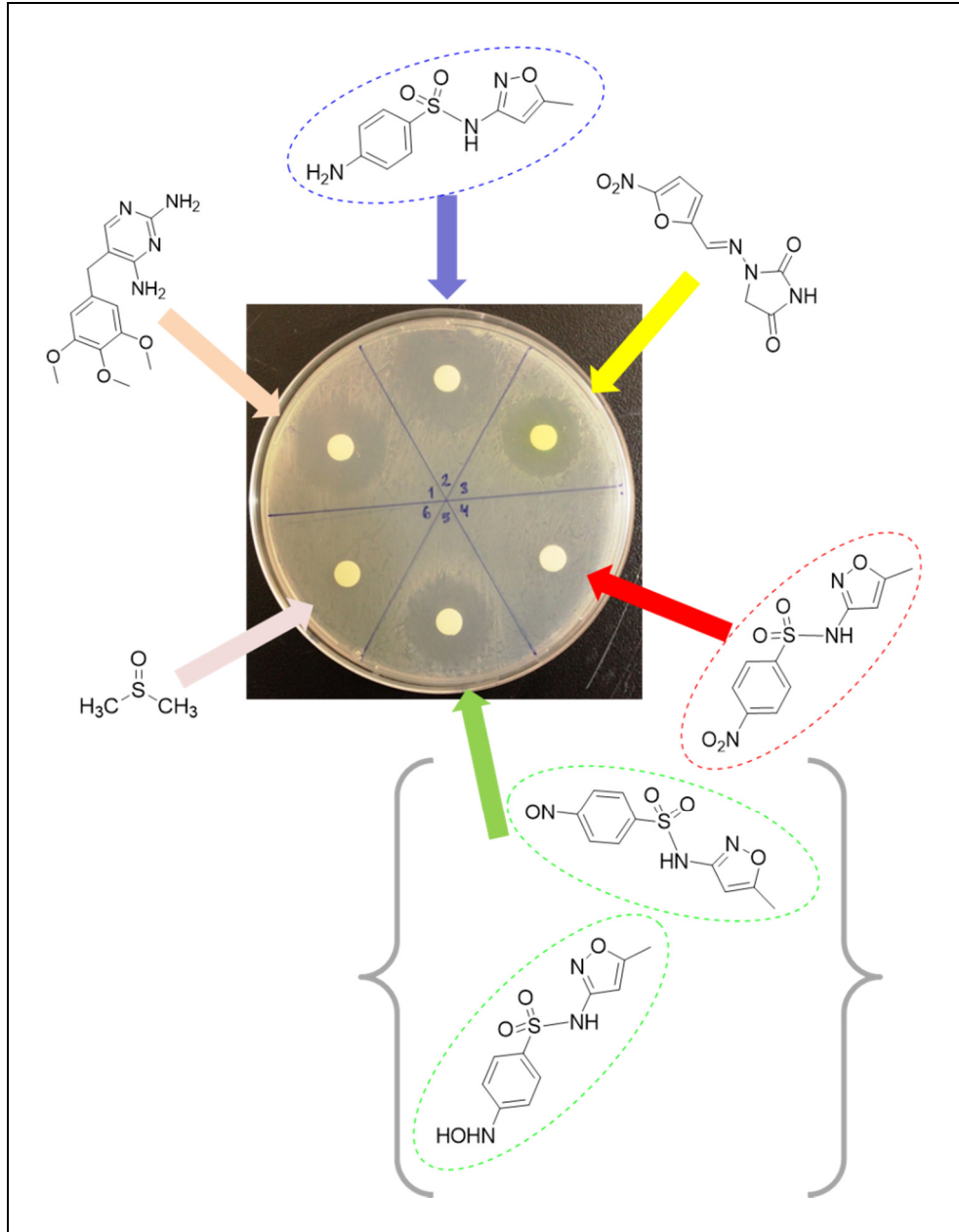
ve zon oluşumuna bakıldı. Tablo 4.8’de *S. saprophyticus* ATCC 15305 ve *E. coli* BL21 DE3 bakterilerine karşı çeşitli antibiyotikler ve oluşturdıkları zon çapları verilmiştir. Katı besiyerinde çözücünün (DMSO) bakteri büyümesine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (zon oluşumu gözlenmedi). Trimetoprim, sulfometoksazol ve nitrofurantoin kontrol antibiyotik olarak kullanıldı ve *S. saprophyticus*’a karşı antimikrobiyal etkileri bilinmektedir [157]. Bu sebeple katı besiyerinde yapılan çalışmalarda beklenildiği gibi trimetoprim, sulfometoksazol ve nitrofurantoinin bakteri büyümesini engellediği zon oluşumundan gözlenirken sulfometoksazolün pro-antibiyotik formu olan NO₂-SMX’ün herhangi bir zon oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 4.77). p-SsapNtrB plasmidini taşıyan *E. coli* BL21 DE3’ün IPTG ile indüksiyonu deneyinde ise SsapNtrB’den dolayı NO₂-SMX’ün indirgenmiş olması sebebiyle zon oluşumunun gözlemlendiği kuvvetle ihtimaldir (Şekil 4.78). Agar difüzyon deneyinde N⁴-OH-SMX ve SMX bileşiklerinin *S. saprophyticus* üzerine oluşturduğu inhibisyon zon çapı sırasıyla 10–12 mm ve 16–18 mm olarak gözlemlendi.

Tablo 4.8: *S. saprophyticus* ATCC 15305 ve *E. coli* BL21 DE3 bakterilerine karşı çeşitli antibiyotikler ve oluşturdıkları zon çapları.

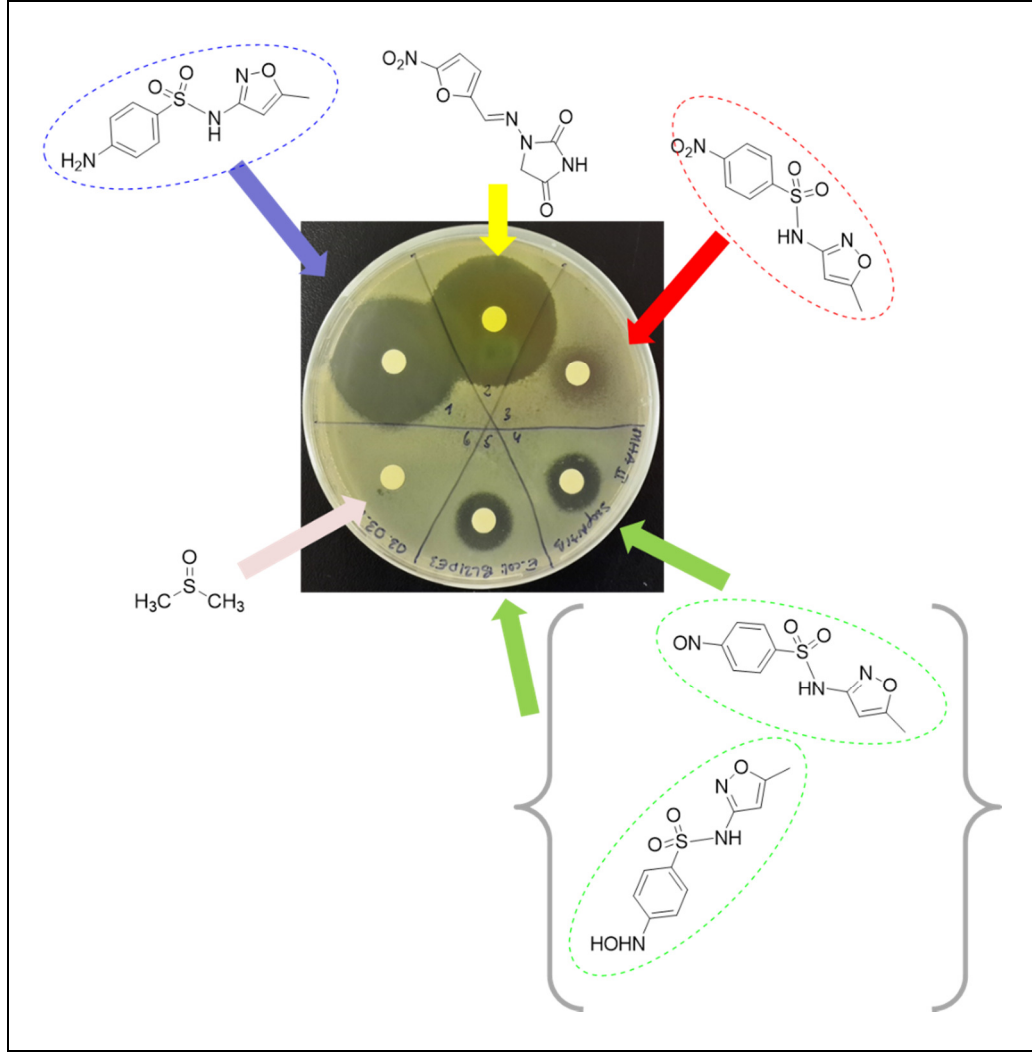
Bileşik	<i>S. saprophyticus</i>		<i>E. coli</i> BL21 DE3 (IPTG indüksiyonu ile)	
	Disk İçeriği	Zon çapı (mm)	Disk İçeriği	Zon çapı (mm)
Trimetoprim	5 µg	16-18 mm	-	-
Nitrofurantoin	300 µg	10-12 mm	300 µg	32 mm
NO ₂ -SMX (3)	250 µg	inhibisyon yok	250 µg	13 mm
SMX (6)	250 µg	16-18 mm	250 µg	30 mm
N ⁴ -OH-SMX (5)	50 µg	10-12 mm	50 µg	14 mm

DMSO ve pro-antibiyotik (NO₂-SMX) de ise inhibisyon gözlenmedi. Bu durum sürpriz olmakla birlikte hiç beklenmedik bir durum da değildir. Çünkü agar difüzyon denemeleri antibiyotiğin katı besiyerinde kolayca difüze olduğu varsayımını temel alır. Oysa her zaman durum bu varsayıma uymayabilir ve özellikle hidrofobik ve amfipatik karakterli bazı antibiyotiklerde beklenilenin aksine önemli sapmalar gözlenebilir. (3), (5) ve (6) numaralı bileşiklerin pH 6,8’deki log D değerleri sırasıyla 0,81, 0,53 ve 0,24’dir [158]. Buradan da açıkça görüldüğü üzere pro-antibiyotik (NO₂-SMX, 3) düşük difüzyon hızına sahiptir. Molekülün fizikokimyasal

özelliklerinden dolayı bazı antibiyotikler için disk difüzyon yöntemi problem yaratabilir [159]. Bu durum daha öncede bahsedildiği üzere özellikle hidrofobik ve amfipatik özellikteki antibiyotikler için geçerlidir (örn subtilin). Bununla birlikte sıvı besiyeri denemelerinde pro-antibiyotiğin membran geçirgenliğinin artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.80). Elde edilen sıvı besiyeri sonuçları pro-antibiyotiğin (3), SMX'den daha etkili bir inhibisyon etkisi olduğunu açıkça gösterdi.

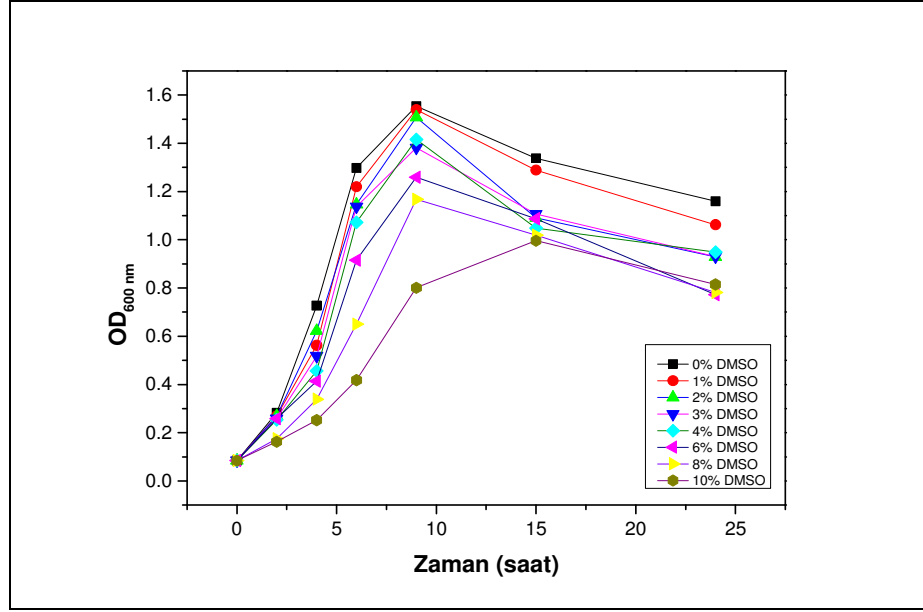


Şekil 4.77: *S. saprophyticus* büyümesine çeşitli antibiyotik türevi maddelerin etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. (1) Trimetoprim (5 µg), (2) Sulfametoksazol (250 µg), (3) Nitrofurantoin (300 µg), (4) NO₂-SMX (250 µg), (5) Enzimatik indirgeme ürünleri (50 µg), (6) DMSO.



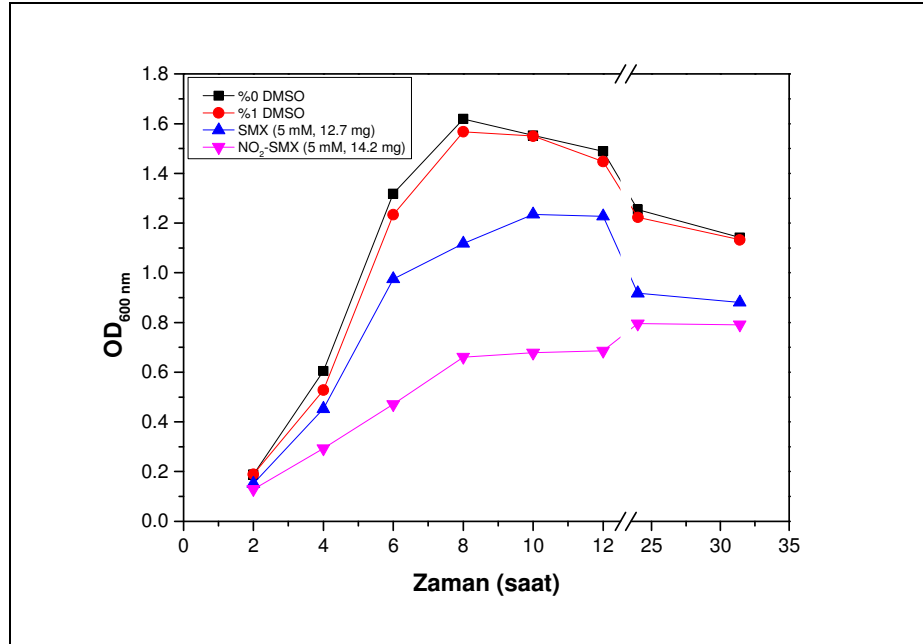
Şekil 4.78: p-SsapNtrB plasmidini taşıyan *E. coli* BL21 DE3'ün IPTG indüklemesi ile büyümesine çeşitli antibiyotik türevi maddelerin etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırılması. (1) Sulfametoksazol (250 µg), (2) Nitrofurantoin (300 µg), (3) NO₂-SMX (250 µg), (4) Enzimatik indirgeme ürünleri (50 µg), (5) Enzimatik indirgeme ürünleri (105 µg), (6) DMSO.

Sıvı besiyerinde gerçekleştirilen deneylerde katı besiyerindeki sonucun aksine DMSO'nun toksik etkisi görülmüş ve minimum DMSO konsantrasyonu araştırıldı. Bu amaçla % 0-10 arasında değişen DMSO konsantrasyonunda *S. saprophyticus* büyüme eğrisi çıkarıldı (Şekil 4.79). Yaklaşık 10. saate kadar konsantrasyon artışına bağlı olarak belirgin bir inhibisyon etkisi söz konusu iken bu saatten sonra % 0-1 DMSO içeren bir grup, % 2 ve üzeri DMSO içeren örnekler de bir grup olarak gözlenmektedir. Sonraki çalışmalarda DMSO kaynaklı inhibisyon etkisini en aza indirmek için % 1 DMSO ile çalışıldı.



Şekil 4.79: *S. saprophyticus* büyümesine DMSO etkisinin incelenmesi.

Sıvı besiyerinde 5 mM SMX ve NO₂-SMX'in bakteri büyümesini yavaşlattığı (NO₂-SMX daha etkili) gözlenmiştir (Şekil 4.80). Katı besiyerinde NO₂-SMX'in toksik etkisi gözlenmezken sıvı besiyerlerinde toksik etkisinin gözlenmesi bu ortamlardaki çözünürlük ve difüzyonunun farklı olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.80: DMSO, SMX ve NO₂-SMX'in *S. saprophyticus* büyümesine etkisinin incelenmesi. SMX ve NO₂-SMX DMSO'da hazırlandı. DMSO final konsantrasyonu % 1 dir.

Sonuç olarak bu çalışma ile bakteriyel kaynaklı hastalıklarda, patojen mikroorganizmayı öldürmek için kullanılan bir antibiyotik yerine bu antibiyotiğin pro-antibiyotik formunun kullanılmasının yararlı bir strateji olacağı gösterilmiştir. SMX, FDA onaylı bir antibiyotik olup bu çalışmada pro-antibiyotik formunun patojen *S. saprophyticus* kaynaklı Ssap-NtrB ile aktivasyonu sağlanıp indirgeme ürünlerinden en fazla N⁴-OH-SMX (5) gözlendi. Agar difüzyon deneyinde metabolit, SMX ile yarışacak düzeyde antimikrobiyal etki gösterdi. Bununla birlikte pro-antibiyotik hiç zon oluşturmadi. Bu durum çözünürlüğünün düşük olmasından kaynaklı olabilir. Sıvı besiyeri deneyinde ise pro-antibiyotik, SMX'dan daha iyi antimikrobiyal etki yaratmıştır. Bu durum *S. saprophyticus* genomunda yer alan nitroredüktaz kaynaklı indirgenmeden bileşiğin absorpsiyonun daha iyileşmiş olmasından kaynaklı olabilir.

Patojen mikroorganizmalara karşı kendi enzimlerini silah olarak kullanarak öldürülmelerinin sağlanması fikri sadece seçicilik ve düşük dozda ilaç alımını sağlamayıp ayrıca antibiyotik direncinin gelişmesine de sınırlayıcı etki yapabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu yaklaşım ile öldürülmesi istenen hedef patojene spesifik antibiyotik geliştirilmiş olmaktadır.

5. SONUÇ

Nitroredüktazlar oldukça geniş bir spektrumda yer alan birçok substratın indirgenme reaksiyonunu katalizleyen özel enzimlerdir [3]. Kanser gen terapisi, biyodegradasyon, biyoremediyasyon, biyosensör gibi uygulama alanlarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu sebeple de NTR'lerle yapılan çalışmalar son yıllarda daha da artış göstermiştir. *E. coli* nitroredüktazının CB1954'e olan katalitik etkisini artırmaya yönelik protein mühendisliği aracılığıyla gerçekleştirilen mutasyon çalışmaları [73], [160], *E. coli* nitroredüktazına alternatif olabilecek nitroredüktaz arama çalışmaları [9], [71], [100] ve CB1954'ten daha üstün nitelikte ilaç-öncü madde arama çalışmalarının [161]-[163] ortak amacı kanser gen terapisinde kullanılan NTR/ilac-öncü sistemini geliştirmeye, daha etkili bir sistem haline getirmeye yöneliktir.

Doktora tez çalışmasında biri mezofilik diğeri termofilik kaynaklı iki rekombinant nitroredüktaz (sırasıyla Ssap-NtrB ve GkNtrA) ile çeşitli biyoteknolojik çalışmalar gerçekleştirildi. İlk bölümde özellikle kanser terapilerinde kullanılma potansiyelini araştırmak amacıyla GkNtrA'nın biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. GkNtrA'nın yapısal analizi için SWISS-MODEL homoloji modelleme aracı kullanılarak model oluşturuldu. Modelleme raporundan GkNtrA'nın iki benzer zircirden oluşan dimer yapılı bir enzim olduğu ve iki ayrı FMN bağlanma bölgesinin bulunduğu ve bağlanmada yer alan aminoasitlerin neler olduğu öğrenildi. Blast tarama sonucunda GkNtrA'ya yapısal olarak en yakın enzimin *B. megaterium* kaynaklı NfrA1 [107] olduğu (% 71 aynı (identity) ve % 83 benzerlik (similarity)) belirlendi. Filogenetik analiz sonucunun da desteklediği gibi GkNtrA, NfsA FRP ailesi nitro-FMN redüktaz süperfamilyasına (tip I oksijen hassasiyeti olmayan nitroredüktaz) dahil olduğu söylenebilir. Termofilik bakteri kaynaklı bir enzim olması sebebiyle beklenildiği gibi optimum sıcaklığı 45-65°C'dir. Ayrıca ısı kararlılığı yüksek (50°C'de 6,5 saat sonunda aktivitesi % 88) bir enzim olduğu görüldü. pH 8,0-9,0 aralığında optimum verimle çalıştığı belirlendi. Substratlarının çok büyük çoğunluğu suda çözünmeyen bileşikler olması sebebiyle reaksiyonlarda kullanılacak en uygun ko-solventin DMSO olduğu ve % 5 DMSO'da aktivitesinin % 92 olduğu gözlemlendi.

Kofaktör tercihinde ise NADPH'ı NADH'a göre çok daha yüksek oranla tercih ettiği görüldü. Kanser terapilerinde nitroredüktazlar ile en çok kullanılan ilaç-öncü olan CB1954'in indirgenmesinde *E. coli* NfsB'den yaklaşık 33 kat daha aktif olduğu görüldü. *E. coli* NfsB 2HX ve 4HX indirgenme ürünleri oluştururken GkNtrA'nın sadece 2HX indirgenme ürününü oluşturduğu görüldü. CB1954'ün 4HX indirgenmiş formu daha toksik [113] olmakla birlikte 2HX'in bystander etkisi 4HX'den daha yüksek olduğu bilinmektedir [74]. Bu sonuçlara göre GkNtrA'nın kanser gen terapide kullanılma potansiyeli olduğunu düşünülmektedir. Ayrıca GkNtrA'nın nitrofenolik ve nitrotoluenli bileşiklere karşı aktivite göstermesi biyodegradasyon, fitoremediyasyon gibi çevre temizliğinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu alanlara yönelik çalışmalarda GkNtrA'nın kararlı bir enzim olması sebebiyle kullanılma potansiyeli yüksektir.

İkinci bölümde ise yeni ve/veya bilinen bir seri potansiyel ilaç-öncüyle hem mezofilik hem de termofilik kaynaklı nitroredüktazın (sırasıyla Ssap-NtrB ve GkNtrA) indirgenme reaksiyonları gerçekleştirilip reaksiyonlar HPLC analizleri ile takip edildi. Burada taraması yapılan potansiyel ilaç-öncülerin neredeyse tamamına yakınının her iki enzim ile de indirgenebildiği görüldü. Tarama reaksiyonlarında sabit miktarda indirgenmiş kofaktör kullanılmış olması ve reaksiyonun tek bir sürede gerçekleştirilmesi anlık görüntü yakalanmasını sağladı. Anlık görüntü olmasına rağmen Ssap-NtrB ve GkNtrA aracılı indirgemede yaklaşık aynı ürünlerin olduğu söylenebilir. Daha sonraki çalışmalarda kofaktör sınırlamasını ortadan kaldırmak amacıyla kofaktör rejenerasyon sistemi kullanılmış olup reaksiyon belirli bir süre takip edildi ve oluşan metabolitlerin bir kısmının zamanla artarken bir kısmının azaldığı sabit kalmadığı görüldü. Bu durum reaksiyon süresinin ve kofaktör miktarının ürün profilini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Oluşan metabolitlerin karakterizasyonu amacıyla yapılan LC-MS/MS analizlerinde genel olarak hızlı tarama (quick scan mode) ile kolon kullanılmadan analizler gerçekleştirildi. Elde edilen kütle spektrumlarında büyük çoğunlukla amin türevi indirgenme ürünlerine ait kütleler görülmekle birlikte bileşikteki birden fazla nitro grubundan hangisinin indirgendiği belirlenemedi. Kinetik parametreler ve sitotoksite çalışma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde 3 serisi bileşiklerinden 3i, 3i' ve 3k'nin; 8 serisinden 8a, 8b, 8c ve 8f'nin; 25 serisinden 25f, 25h ve 25i'nin

kendisi toksik etki göstermezken Ssap-NtrB aracılı reaksiyon sonunda oluşan metabolitlerin prostat kanser hücrelerine toksik etkisi gözlemlendi. GDEPT için CB1954'e alternatif ilaç-öncü olabileceklerinin emareleri görüldü.

Tezin son bölümünde ise *S. saprophyticus* üropatojen bakterilerine karşı kullanılan bir antibiyotikten yola çıkılarak; pro-antibiyotik sentezi, sentezlenen pro-antibiyotiğin Ssap-NtrB katalizli indirgenmesi ve oluşan ürün(ler) karakterizasyonu ardından disk difüzyon yöntemi ve sıvı kültür yöntemleri ile antimikrobiyal etkisinin incelenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. *S. saprophyticus* üropatojen bakterisine karşı antibiyotik olarak kullanılan sulfonamid türevi bileşiğin pro-antibiyotik formunun Ssap-NtrB katalizli indirgenmesi incelenerek oluşan metabolit(ler) HPLC analizleri ile takip edildi ve LC-MS/MS ile de nitroso ve hidroksilamin türevi bileşiklerin oluştuğu gözlemlendi. Elde edilen metabolitlerin *S. saprophyticus*'a karşı antibakteriyel etkisi disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. Agar difüzyon deneyinde enzimatik indirgenme ürününün, SMX ile yarışacak düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiği bununla birlikte pro-antibiyotiğin antibakteriyel etkisi gözlenmedi. Sıvı kültür denemelerinde enzimatik reaksiyon ürünü yeterli konsantrasyonda elde edilemediğinden dolayı yer almadı sadece antibiyotik ve pro-antibiyotik karşılaştırması yapıldı. Burada ise pro-antibiyotiğin SMX'den daha iyi antibakteriyel etki gösterdiği görüldü. Katı ve sıvı ortamdaki bu farklılığın çözünürlükten kaynaklı olma ihtimali olabilir. Sıvı ve katı besiyerde pro-antibiyotik ve antibiyotiğin farklı özellikler gösterdiği görüldü. Bu sebeple sadece disk difüzyon deneyleri ile bir bileşiğin antimikrobiyal etkisi hakkında söz söylemenin çok doğru olmadığını söylenebilir. Bu çalışmadaki amacın patojen bakterilerin kendi enzimlerini kendilerine karşı bir silah olarak kullanarak onlarla daha spesifik ve etkili bir şekilde savaşabileceğimizi göstermek olduğu düşünüldüğünde elde edilen sonuçların tatmin edici olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Bryant D. W., McCalla D. R., Leeksa M., Laneuville P., (1981), "Type I nitroreductases of *Escherichia coli*", Canadian Journal of Microbiology, 27 (1), 81-86.
- [2] Kobori T., Sasaki H., Lee W. C., Zenno S., Saigo K., Murphy M. E., Tanokura M., (2001), "Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution", The Journal of Biological Chemistry, 276 (4), 2816–2823.
- [3] Roldán M. D., Reinado E. P., Castillo F., Vivian C. M., (2008), "Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases", FEMS Microbiology Reviews, 32 (3), 474-500.
- [4] Nadeau L. J., He Z., Spain J. C., (2000), "Production of 2-amino-5-phenoxyphenol from 4-nitrobiphenyl ether using nitrobenzene nitroreductase and hydroxylaminobenzene mutase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 24 (4), 301-305.
- [5] Nguyen T. H. H., Zheng G. W., Qian X. H., Xu J. H., (2014), "Highly selective and controllable synthesis of arylhydroxylamines by the reduction of nitroarenes with an electron-withdrawing group using a new nitroreductase BaNTR1", Chemical Communications, 50 (22), 2861-2864.
- [6] Hannink N., Rosser S. J., French C. E., Basran A., Murray J. A., Nicklin S., Bruce N. C., (2001), "Phytodetoxification Of TNT by Transgenic Plants Expressing A Bacterial Nitroreductase", Nature Publishing Group, 19 (12), 1168-1172.
- [7] Knox R. J., Friedlos, F., Boland M. P., (1993), "The bioactivation of CB1954 and its use in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)", Cancer And Metastasis Review, 12 (2), 195–212.
- [8] Anlezark G. M., Melton R. G., Sherwood R. F., Coles B., Friedlos F., Knox R. J., (1992), "The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--I: Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*--A potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)", Biochemical Pharmacology, 44 (12), 2289-2295.
- [9] Çelik A., Yetiş G., (2012), "An unusually cold active nitroreductase for prodrug activations", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 20 (11), 3540-3550.

- [10] Aşçı G., (2011), 'Kanser Terapisinde Kullanılan Nitroredüktaz/İlaç-Öncü (Prodrug) Sistemlerinin Geliştirilmesi', Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- [11] Mahato R., Tai W., Cheng K., (2011), "Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (8), 659-670.
- [12] Palmer D. H., Mautner V., Mirza D., Oliff S., Gerritsen W., Joost R. M., Hubscher S., Reynolds G., Bonney S., Rajaratnam R., Hull D., Horne M., Ellis J., Mountain A., Hill S., Harris P. A., Searle P. F., Young L. S., James N. D., Kerr D. J., (2004), "Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy: Intratumoral Administration of a Replication-Deficient Adenovirus Encoding Nitroreductase to Patients With Resectable Liver Cancer", *Journal Of Clinical Oncology*, 22 (9), 1546-1552.
- [13] McNeish I. A., Green N. K., Gilligan M. G., Ford M. J., Mautner V., Young L. S., Kerr D. J., Searle P. F., (1998), "Virus directed enzyme prodrug therapy for ovarian and pancreatic cancer using retrovirally delivered *E. coli* nitroreductase and CB1954", *Gene Therapy*, 5 (8), 1061-1069.
- [14] Grove J. I., Searle P. F., Weedon S. J., Green N. K., McNeish I. A., Kerr D. J., (1999), "Virus-directed enzyme prodrug therapy using CB1954", *Anti-Cancer Drug Design*, 14 (6), 461-472.
- [15] Weedon S. J., Green N. K., McNeish I. A., Gilligan M. G., Mautner V., Wrighton C. J., Mountain A., Young L. S., Kerr D. J., Searle P. F., (2000), "Sensitisation of human carcinoma cells to the prodrug CB1954 by adenovirus vector-mediated expression of *E. coli* nitroreductase", *International Journal of Cancer*, 86 (6), 848-854.
- [16] Djeha A. H., Thomson T. A., Leung H., Searle P. F., Young L. S., Kerr D. J., Harris P. A., Mountain A., Wrighton C. J., (2001), "Combined adenovirus-mediated nitroreductase gene delivery and CB1954 treatment: A well-tolerated therapy for established solid tumors", *Molecular Therapy*, 3 (2), 233-240.
- [17] Braybrooke J. P., Slade A., Deplanque G., Harrop R., Madhusudan S., Forster M. D., Gibson R., Makris A., Talbot D. C., Steiner J., White L., Kan O., Naylor S., Carroll M. W., Kingsman S. M., Harris A. L., (2005), "Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma", *Clinical Cancer Research*, 11 (4), 1512-1520.
- [18] Young L. S., Searle P. F., Onion D., Mautner V., (2006), "Viral gene therapy strategies: From basic science to clinical application", *Journal of Pathology*, 208 (2), 299-318.

- [19] Ram Z., Culver K. W., Oshiro E. M., Viola J. J., Devroom H. L., Otto E., Long Z., Chiang Y., McGarrity G. J., Muul L. M., Katz D., Blaese R. M., Oldfield E. H., (1997), "Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells", *Nature Medicine*, 3 (12), 1354-1361.
- [20] Herman J. R., Adler H. L., Aguilar C. E., Rojas M. A., Woo S., Timme T. L., Wheeler T. M., Thompson T. C., Scardino P. T., (1999), "In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: A phase I clinical trial", *Human Gene Therapy*, 10 (7), 1239-1249.
- [21] Freytag S. O., Khil M., Stricker H., Peabody J., Menon M., DePeralta V. M., Nafziger D., Pegg J., Paielli D., Brown S., Barton K., Lu M., Aguilar C. E., Kim, J. H., (2002), "Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer", *Cancer Research*, 62 (17), 4968-4976.
- [22] Patel P., Young J. G., Mautner V., Ashdown D., Bonney S., Pineda R. G., Collins S. I., Searle P. F., Hull D., Peers E., Chester J., Wallace D. M., Doherty A., Leung H., Young L. S., James N. D., (2009), "A phase I/II clinical trial in localized prostate cancer of an adenovirus expressing nitroreductase with CB1984", *Molecular Therapy*, 17 (7), 1292-1299.
- [23] Hartter D. R., (1985), "In Chemical Institute of Toxicology Series: Toxicity of Nitroaromatic Compounds", 9780891163046, CRC Press, Washington.
- [24] Spain J. C., (1995), "Biodegradation of nitroaromatic compounds", *Annual Review of Microbiology*, 49, 523-555.
- [25] Ahmed Z. U., Vining L. C., (1983), "Evidence for a chromosomal location of the genes coding for chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*", *Journal of Bacteriology*, 154 (1), 239-244.
- [26] Anderson R. C., Rasmussen M. A., Allison M. J., (1993), "Metabolism of the plant toxins nitropropionic acid and nitropropanol by ruminal microorganisms", *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (9), 3056-3061.
- [27] Kovacic P., Somanathan R., (2014), "Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism", *Journal of Applied Toxicology*, 34 (8), 810-824.
- [28] Lachance B., Robidoux P. Y., Hawari J., Ampleman G., Thiboutot S., Sunahara G. I., (1999), "Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro¹", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 444 (1), 25-39.

- [29] Honeycutt M. E., Jarvis A. S., McFarland V. A., (1996), "Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35 (3), 282-287.
- [30] Corbett M. D. and Corbett B. R., (1995), "Biodegradation of Nitroaromatic Compounds", 978-1-4757-9447-2, Springer US, Boston.
- [31] Blumer J. L., Friedman A., Meyer L. W., Fairchild E., Webster L. T., Speck W. T., (1980), "Relative importance of bacterial and mammalian nitroreductases for niridazole mutagenesis", *Cancer Research*, 40 (12), 4599-4605.
- [32] Fu P. P., (1990), "Metabolism of Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", *Drug Metabolism Reviews*, 22 (2-3), 209-268.
- [33] Spanggord R. J., Spain, J. C., Nishino S. F., Mortelmans K. E., (1991), "Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp", *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (11), 3200-3205.
- [34] Suen W. C., Haigler B. E., Spain J. C., (1996), "2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase", *Journal of Bacteriology*, 178 (16), 4926-4934.
- [35] Roldan M. D., Blasco R., Caballero F. J., Castillo F., (1998), "Degradation of p-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*", *Archives of Microbiology*, 169 (1), 36-42.
- [36] Spiess T., Desiere F., Fischer P., Spain J. C., Knackmuss, H. J., Lenke H., (1998), "A New 4-Nitrotoluene Degradation Pathway in a *Mycobacterium* Strain", *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2), 446-452.
- [37] Nishino S. F., Paoli G. C., Spain J. C., (2000), "Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene", *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5), 2139-2147.
- [38] McCormick N. G., Feeherry F. E., Levinson H. S., (1976), "Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds", *Applied and Environmental Microbiology*, 31 (6), 949-958.
- [39] Lewis T. A., Goszczynski S., Crawford R. L., Korus R. A., Admassu W., (1996), "Products of Anaerobic 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) Transformation by *Clostridium bifermentans*", *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (12), 4669-4674.
- [40] Hawari J., Beaudet S., Halasz A., Thiboutot S., Ampleman G., (2000), "Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54 (5), 605-618.

- [41] Rieger P. G., Meier H. M., Gerle M., Vogt U., Groth T., Knackmuss H. J., (2002), "Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence", *Journal of Biotechnology*, 94 (1), 101-123.
- [42] Peterson F.J., Mason R.P., Hovsepian J., Holtzman J.L., (1979), "Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes", *Journal of Biological Chemistry*, 254 (10), 4009-4014.
- [43] Bryant C., DeLuca M., (1991), "Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*", *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (7), 4119–4125.
- [44] Williams E. M., Little R. F., Mowday A. M., Rich M. H., Chan-Hyams J. V. E., Copp J. N., Smaill J. B., Patterson A. V., Ackerley D. F., (2015), "Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility", *Biochemical Journal*, 471 (2), 131-153.
- [45] Siim B. G., Denny W. A., Wilson W. R., (1997), "Nitro reduction as an electronic switch for bio-reductive drug activation", *Oncology Research*, 9 (6-7), 357-369.
- [46] Denny W. A., (2002), "Nitroreductase-based GDEPT", *Current Pharmaceutical Design*, 8 (15), 1349-1361.
- [47] Parkinson G. N., Skelly J. V., Neidle S., (2000), "Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B: A prodrug-activating enzyme", *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (20), 3624-3631.
- [48] AbuKhader M. M., Heap J., De Matteis C. I., Doughty S. W., Minton N., Paoli M., (2007), "Crystallization and preliminary X-ray characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* YwrO enzyme", *Acta Crystallographica Section F*, 63 (9), 746-750.
- [49] Haynes C. A., Koder R. L., Miller A. F., Rodgers D. W., (2002), "Structures of nitroreductase in three states: effects of inhibitor binding and reduction", *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (13), 11513-11520.
- [50] Koder R. L., Haynes C. A., Rodgers M. E., Rodgers D. W., Miller A. F., (2002), "Flavin Thermodynamics Explain the Oxygen Insensitivity of Enteric Nitroreductases", *Biochemistry*, 41 (48), 14197-14205.
- [51] Zenno S., Saigo K., Kanoh H., Inouye S., (1994), "Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744", *Journal of Bacteriology*, 176 (12), 3536-3543.

- [52] Ackerley D. F., Gonzalez C. F., Keyhan M., Blake R., Matin A., (2004), "Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction", *Environmental Microbiology*, 6 (8), 851-860.
- [53] Robins K. J., Hooks D. O., Rehm B. H. A., Ackerley D. F., (2013), "*Escherichia coli* NemA Is an Efficient Chromate Reductase That Can Be Biologically Immobilized to Provide a Cell Free System for Remediation of Hexavalent Chromium", *PLoS ONE*, 8 (3), e59200.
- [54] Takeda K., Sato J., Goto K., Fujita T., Watanabe T., Abo M., Yoshimura E., Nakagawa J., Abe A., Kawasaki S., Niimura Y., (2010), "*Escherichia coli* ferredoxin-NADP⁺ reductase and oxygen-insensitive nitroreductase are capable of functioning as ferric reductase and of driving the Fenton reaction", *Biometals*, 23 (4), 727-737.
- [55] Rafii F., Cerniglia C. E., (1995), "Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract", *Environmental Health Perspectives*, 103 (5), 17-19.
- [56] Khan A. H. and Ross W. C., (1969), "Tumour-growth inhibitory nitrophenylaziridines and related compounds: structure-activity relationships", *Chemico-Biological Interactions*, 1 (1), 27-47.
- [57] Cobb L. M., Connors T. A., Elson L. A., Khan A. H., Mitchley B. C., Ross W. C., Whisson M. E., (1969), "2,4-dinitro-5-ethyleneiminobenzamide (CB 1954): a potent and selective inhibitor of the growth of the Walker carcinoma 256", *Biochemical Pharmacology*, 18 (6), 1519-1527.
- [58] Knox R. J., Burke P. J., Chen S., Kerr D. J., (2003), "CB 1954: From the Walker Tumor to NQO2 and VDEPT ", *Current Pharmaceutical Design*, 9 (26), 2091-2104.
- [59] Knox R. J., Boland M. P., Friedlos F., Coles B., Southan C., Roberts J. J., (1988), "The nitroreductase enzyme in walker cells that activates 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) to 5-(aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide is a form of NAD(P)H dehydrogenase (quinone) (EC 1.6.99.2)", *Biochemical Pharmacology*, 37 (24), 4671-4677.
- [60] Knox R. J., Friedlos F., Marchbank T., Roberts J. J., (1991), "Bioactivation of CB 1954: reaction of the active 4-hydroxylamino derivative with thioesters to form the ultimate DNA-DNA interstrand crosslinking species", *Biochemical Pharmacology*, 42 (9), 1691-1697.
- [61] Siegel D. and Ross D., (2000), "Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues", *Free Radical Biology Medicine*, 29 (3-4), 246-253.

- [62] Knox R. J., Lydall D. A., Friedlos F., Basham C., Rawlings C. J., Roberts J. J., (1991), "The Walker 256 carcinoma: a cell type inherently sensitive only to those difunctional agents that can form DNA interstrand crosslinks", *Mutation Research*, 255 (3), 227-240.
- [63] Boland M. P., Knox R. J., Roberts J. J., (1991), "The differences in kinetics of rat and human DT diaphorase result in a differential sensitivity of derived cell lines to CB 1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide)", *Biochemical Pharmacology*, 41 (6), 867-875.
- [64] Chen S., Knox R., Lewis A. D., Friedlos F., Workman P., Deng P. S., Fung M., Ebenstein D., Wu K., Tsai T. M., (1995), "Catalytic properties of NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase: study involving mouse, rat, human, and mouse-rat chimeric enzymes", *Molecular Pharmacology*, 47 (5), 934-939.
- [65] Chen S., Knox R., Wu K., Deng P. S. K., Zhou D., Bianchet M. A., Amzel L. M., (1997), "Molecular Basis of the Catalytic Differences among DT-diaphorase of Human, Rat, and Mouse", *Journal of Biological Chemistry*, 272 (3), 1437-1439.
- [66] Knox R. J., Friedlos F., Sherwood R. F., Melton R. G., Anlezark G. M., (1992), "The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)—II: A comparison of an *Escherichia coli* nitroreductase and Walker DT diaphorase", *Biochemical Pharmacology*, 44 (12), 2297-2301.
- [67] Knox R. J., Friedlos F., Jarman M., Roberts J. J., (1988), "A new cytotoxic, DNA interstrand crosslinking agent, 5-(aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide, is formed from 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by a nitroreductase enzyme in walker carcinoma cells", *Biochemical Pharmacology*, 37 (24), 4661-4669.
- [68] Helsby N. A., Ferry D. M., Patterson A. V., Pullen S. M., Wilson W. R., (2004), "2-Amino metabolites are key mediators of CB 1954 and SN 23862 bystander effects in nitroreductase GDEPT", *British Journal of Cancer*, 90 (5), 1084 – 1092.
- [69] Mitchell D. J. and Minchin, R. F., (2008), "*E. coli* nitroreductase/CB1954 gene-directed enzyme prodrug therapy: role of arylamine N-acetyltransferase 2", *Cancer Gene Therapy*, 15 (11), 758-764.
- [70] Kestell P., Pruijn F. B., Siim B. G., Palmer B. D., Wilson W. R., (2000), "Pharmacokinetics and metabolism of the nitrogen mustard bio-reductive drug 5", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46 (5), 365-374.

- [71] Anlezark G. M., Vaughan T., Fashola-Stone E., Paul M. N., Murdoch H., Sims M. A., Stubbs S., Wigley S., Minton N. P., (2002), "*Bacillus amyloliquefaciens* orthologue of *Bacillus subtilis* ywrO encodes a nitroreductase enzyme which activates the prodrug CB 1954", *Microbiology*, 148 (1), 297-306.
- [72] Theys J., Pennington O., Dubois L., Anlezark G., Vaughan T., Mengesha A., Landuyt W., Anné J., Burke P. J., Dûrre P., Wouters B. G., Minton N. P., Lambin P., (2006), "Repeated cycles of Clostridium-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo", *British Journal of Cancer*, 95 (9), 1212-1219.
- [73] Race P. R., Lovering A. L., White S. A., Grove J. I., Searle P. F., Wrighton C. W., Hyde E., (2007), "Kinetic and structural characterisation of *Escherichia coli* nitroreductase mutants showing improved efficacy for the prodrug substrate CB1954", *Journal of Molecular Biology*, 368 (2), 481-492.
- [74] Barak Y., Thorne S. H., Ackerley D. F., Lynch S. V., Contag C. H., Matin A., (2006), "New enzyme for reductive cancer chemotherapy, YieF, and its improvement by directed evolution", *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (1), 97-103.
- [75] Prosser G. A., Copp J. N., Syddall S. P., Williams E. M., Smaill J. B., Wilson W. R., Patterson A. V., Ackerley D. F., (2010), "Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954", *Biochemical Pharmacology*, 79 (5), 678-687.
- [76] Vass S. O., Jarrom D., Wilson W. R., Hyde E. I., Searle P. F., (2009), "*E. coli* NfsA: an alternative nitroreductase for prodrug activation gene therapy in combination with CB1954", *British Journal of Cancer*, 100 (12), 1903-1911.
- [77] Klaidman L. K., Leung A. C., Adams J. D., (1995), "High-performance liquid chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain regions", *Analytical Biochemistry*, 228 (2), 312-317.
- [78] London J., and Knight M., (1966), "Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in micro-organisms", *Microbiology*, 44 (2), 241-254.
- [79] Ying W., (2008), "NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences", *Antioxidants and Redox Signaling*, 10 (2), 179-206.
- [80] Denny W. A., (2004), "Tumor-activated prodrugs-a new approach to cancer therapy", *Cancer Investigation*, 22 (4), 604-619.
- [81] Dachs G. U. and Tozer G. M., (2000), "Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation", *European Journal of Cancer*, 36 (13), 1649-1660.

- [82] Brown J. M. and Wilson W. R., (2004), "Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment", *Nature Reviews Cancer*, 4 (6), 437-447.
- [83] Guise C. P., Mowday A. M., Ashoorzadeh A., Yuan R., Lin W. H., Wu D. H., Smaill J. B., Patterson A. V., Ding K., (2014), "Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia", *Chinese Journal of Cancer*, 33 (2), 80-86.
- [84] Patterson A. V., Ferry D. M., Edmunds S. J., Gu Y., Singleton R. S., Patel K., Pullen S. M., Hicks K. O., Syddall S. P., Atwell G. J., Yang S., Denny W. A., Wilson W. R., (2007), "Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104", *Clinical Cancer Research*, 13 (13), 3922-3932.
- [85] Mattes W. B., Hartley J. A., Kohn K. W., (1986), "DNA sequence selectivity of guanine-N7 alkylation by nitrogen mustards", *Nucleic Acids Research*, 14 (7), 2971-2987.
- [86] Wilson W. R., Hicks K. O., Pullen S. M., Ferry D. M., Helsby N. A., Patterson A. V., (2007), "Bystander effects of bioreductive drugs: potential for exploiting pathological tumor hypoxia with dinitrobenzamide mustards", *Radiation Research*, 167 (6), 625-636.
- [87] Atwell G. J., Yang S., Pruijn F. B., Pullen S. M., Hogg A., Patterson A. V., Wilson W. R., Denny W. A., (2007), "Synthesis and structure-activity relationships for 2,4-dinitrobenzamide-5-mustards as prodrugs for the *Escherichia coli* nfsB nitroreductase in gene therapy", *Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (6), 1197-1212.
- [88] Palmer B. D., Wilson, W. R., Cliffe S., Denny W. A., (1992), "Hypoxia-selective antitumor agents. 5. Synthesis of water-soluble nitroaniline mustards with selective cytotoxicity for hypoxic mammalian cells", *Journal of Medicinal Chemistry*, 35 (17), 3214-3222.
- [89] Anlezark G. M., Melton R. G., Sherwood R. F., Wilson W. R., Denny W. A., Palmer B. D., Knox R. J., Friedlos F., Williams A., (1995), "Bioactivation of dinitrobenzamide mustards by an *E. coli* B nitroreductase", *Biochemical Pharmacology*, 50 (5), 609-618.
- [90] Wilson W. R., Pullen S. M., Hogg A., Helsby N. A., Hicks K. O., Denny W. A. (2002), "Quantitation of Bystander Effects in Nitroreductase Suicide Gene Therapy Using Three-Dimensional Cell Cultures", *Cancer Research*, 62 (5), 1425-1432.
- [91] Lewis T. A., Newcombe D. A., Crawford R. L., (2004), "Bioremediation of soils contaminated with explosives", *Journal of Environmental Management*, 70 (4), 291-307.

- [92] Ramos J. L., González-Pérez M. M., Caballero A., Dillewijn P., (2005), "Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight", *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (3), 275-281.
- [93] French C. E., Rosser S. J., Davies G. J., Nicklin S., Bruce N. C., (1999), "Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase", *Nature Biotechnology*, 17 (5), 491-494.
- [94] Hannink N. K., Rosser S. J., Bruce N. C., (2002), "Phytoremediation of Explosives", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (5), 511-538.
- [95] Kurumata M., Takahashi M., Sakamoto A., Ramos J. L., Nepovim A., Vanek T., Hirata T., Morikawa H., (2005), "Tolerance to, and uptake and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) are enhanced by the expression of a bacterial nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60 (3-4), 272-278.
- [96] Davis B. G., Celik A., Davies G. J., Ruane K. M., (2010), "Novel enzyme", U.S. Patent, US20100086958 A1.
- [97] Studier F. W., (2005), "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", *Protein Expression and Purification*, 41 (1), 207-234.
- [98] Bradford M. M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- [99] Race P. R., Lovering A. L., Green R. M., Ossor A., White S. A., Searle P. F., Wrighton C. J., Hyde E., (2005), "Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone", *Journal of Biological Chemistry*, 280 (14), 13256-13264.
- [100] Emptage C. D., Knox R. J., Danson M. J., Hough D. W., (2009), "Nitroreductase from *Bacillus licheniformis*: A stable enzyme for prodrug activation", *Biochemical Pharmacology*, 77 (1), 21-29.
- [101] Galante Y. M., Hatefi Y., (1978), "Methods in Enzymology", 0076-6879, Academic Press.
- [102] Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., (1994), "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Research*, 22 (22), 4673-4680.

- [103] Robert X., Gouet P., (2014), "Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server", *Nucleic Acids Research*, 42 (W1), W320-W324.
- [104] Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., (2013), "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725-2729.
- [105] Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J., (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research*, 25 (17), 3389-3402.
- [106] Remmert M., Biegert A., Hauser A., Soding J., (2012), "HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment", *Nature Methods*, 9 (2), 173-175.
- [107] Carles L., Besse-Hoggan P., Joly M., Vigouroux A., Moréra S., Batisson I., (2016), "Functional and structural characterization of two *Bacillus megaterium* nitroreductases biotransforming the herbicide mesotrione", *Biochemical Journal*, 473 (10), 1443-1453.
- [108] Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S., (2005), "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction", *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- [109] Houghton P., Fang R., Techatanawat I., Steventon G., Hylands P. J., Lee C. C., (2007), "The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity", *Methods*, 42 (4), 377-387.
- [110] Sakinc T., Michalski N., Kleine B., Gatermann S. G., (2009), "The uropathogenic species *Staphylococcus saprophyticus* tolerates a high concentration of D-serine", *FEMS Microbiology Letters*, 299 (1), 60-64.
- [111] Searle P. F., Chen M. J., Hu L., Race P. R., Lovering A. L., Grove J. I., Guise C., Jaberipour M., James N. D., Mautner V., Young L. S., Kerr D. J., Mountain A., White S. A., Hyde E. I., (2004), "Nitroreductase: a prodrug-activating enzyme for cancer gene therapy", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31 (11), 811-816.
- [112] Jarrom D., Jaberipour M., Guise C. P., Daff S., White S. A., Searle P. F., Hyde E. I., (2009), "Steady-State and Stopped-Flow Kinetic Studies of Three *Escherichia coli* NfsB Mutants with Enhanced Activity for the Prodrug CB1954", *Biochemistry*, 48 (32), 7665-7672.

- [113] Olekhovich I. N., Goodwin A., Hoffman P. S., (2009), "Characterization of the NAD(P)H oxidase and metronidazole reductase activities of the RdxA nitroreductase of *Helicobacter pylori*", FEBS Journal, 276 (12), 3354-3364.
- [114] Swe P. M., Copp J. N., Green L. K., Guise C. P., Mowday A. M., Smaill J. B., Patterson A. V., Ackerley D. F., (2012), "Targeted mutagenesis of the *Vibrio fischeri* flavin reductase FRase I to improve activation of the anticancer prodrug CB1954", Biochemical Pharmacology, 84 (6), 775-783.
- [115] Prosser G. A., Copp J. N., Mowday A. M., Guise C. P., Syddall S. P., Williams E. M., Horvat C. N., Swe P. M., Ashoorzadeh A., Denny W. A., Smaill J. B., Patterson A. V., Ackerley D. F., (2013), "Creation and screening of a multi-family bacterial oxidoreductase library to discover novel nitroreductases that efficiently activate the bioreductive prodrugs CB1954 and PR-104A", Biochemical Pharmacology, 85 (8), 1091-1103.
- [116] Cortial S., Chaignon P., Iorga B. I., Aymerich S., Truan G., Gueguen-Chaignon V., Meyer P., Moréra S., Ouazzani J., (2010), "NADH oxidase activity of *Bacillus subtilis* nitroreductase NfrA1: Insight into its biological role", FEBS Letters, 584 (18), 3916-3922.
- [117] Yanto Y., Hall M., Bommarius A. S., (2010), "Nitroreductase from *Salmonella typhimurium*: characterization and catalytic activity", Organic & Biomolecular Chemistry, 8 (8), 1826-1832.
- [118] Maki T. And Takeda K., (2000), "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", 9783527306732, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [119] Park J. T., (2014), "Enzymatic reduction of nitro compounds to amines with nitroreductases", Doctor of Philosophy, Georgia Institute of Technology.
- [120] Helsby N. A., Wheeler S. J., Pruijn F. B., Palmer B. D., Yang S. J., (2003), "Effect of nitroreduction on the alkylating reactivity and cytotoxicity of the 2,4-dinitrobenzamide-5-aziridine CB 1954 and the corresponding nitrogen mustard SN 23862: Distinct mechanisms of bioreductive activation", Chemical Research in Toxicology, 16 (4), 469-478.
- [121] Kim H. Y. and Song H. G., (2005), "Purification and characterization of NAD(P)H-dependent nitroreductase I from *Klebsiella* sp. C1 and enzymatic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene", Applied microbiology and biotechnology, 68 (6), 766-773.
- [122] Kundu D., Hazra C., Chaudhari A., (2015), "Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene with *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: characteristics, kinetic modeling, physiological responses and metabolic pathway", RSC Advances, 5 (49), 38818-38829.

- [123] Bai J., Zhou Y., Chen Q., Yang Q., Yang J., (2015), "Altering the Regioselectivity of a Nitroreductase in the Synthesis of Arylhydroxylamines by Structure-Based Engineering", *ChemBioChem*, 16 (8), 1219-1225.
- [124] Havlikova L., Matyas R., Ihnat L., Novakova L., Satinsky D., (2014), "Degradation study of nitroaromatic explosives 2-diazo-4,6-dinitrophenol and picramic acid using HPLC and UHPLC-ESI-MS/MS", *Analytical Methods*, 6 (13), 4761-4768.
- [125] Mason R. P. and Holtzman J. L., (1975), "Mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates", *Biochemistry*, 14 (8), 1626-1632.
- [126] Koder R. L., Haynes C. A., Rodgers M. E., Rodgers D.W., Miller A. F., (2002), "Flavin Thermodynamics Explain the Oxygen Insensitivity of Enteric Nitroreductases", *Biochemistry*, 41 (48), 14197-14205.
- [127] McCalla D. R., Kaiser C., Green M. H. L., (1978), "Genetics of Nitrofurazone Resistance in *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, 133 (1), 10-16.
- [128] Bryant C., Hubbard L., McElroy W. D., (1991), "Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*", *Journal of Biological Chemistry*, 266 (7), 4126-4130.
- [129] Zenno S, Koike H., Kumar A. N., Jayaraman R., Tanokura M., Saigo K., (1996), "Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase", *Journal of Bacteriology*, 178 (15), 4508-4514.
- [130] Nokhbeh M. R., Boroumandi S., Pokorny N., Koziarz P., Paterson E. S., Lambert I. B., (2002), "Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* TA1535", *Mutation Research*, 508 (1-2), 59-70.
- [131] Lei B., Liu M., Huang S., Tu S. C., (1994), "*Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme", *Journal of Bacteriology*, 176 (12), 3552-3558.
- [132] Caballero A., Lázaro J. J., Ramos J. L., Esteve-Núñez A., (2005), "PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11", *Environmental Microbiology*, 7 (8), 1211-1219.
- [133] Watanabe M., Ishidate M., Nohmi T., (1990), "Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene", *Nucleic Acids Research*, 18 (4), 1059.

- [134] Rey M., Ramaiya P., Nelson B., Brody-Karpin S., Zaretsky E., Tang M., Leon A., Xiang H., Gusti V., Clausen I., Olsen P., Rasmussen M., Andersen J., Jørgensen P., Larsen T., Sorokin A., Bolotin A., Lapidus A., Galleron N., Ehrlich S., Berka R., (2004), "Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species", *Genome Biology*, 5 (10), 1-12.
- [135] Zenno S., Koike H., Tanokura M., Saigo K., (1996), "Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*", *The Journal of Biochemistry*, 120 (4), 736-744.
- [136] Choi J. W., Lee J., Nishi K., Kim Y. S., Jung C. H., Kim J. S., (2008), "Crystal Structure of a Minimal Nitroreductase, ydjA, from *Escherichia coli* K12 with and without FMN Cofactor", *Journal of Molecular Biology*, 377 (1), 258-267.
- [137] Hughes M. A. and Williams P. A., (2001), "Cloning and characterization of the pnb genes, encoding enzymes for 4-nitrobenzoate catabolism in *Pseudomonas putida* TW3", *Journal of Bacteriology*, 183 (4), 1225-1232.
- [138] Manina G., Bellinzoni M., Pasca M. R., Neres J., Milano A., De Jesus Lopes Ribeiro A. L., Buroni S., Škovierová H., Dianišková P., Mikušová K., Marák J., Makarov V., Giganti D., Haouz A., Lucarelli Anna P., Degiacomi G., Piazza A., Chiarelli L. R., De Rossi E., Salina E., Cole S. T., Alzari P. M., Riccardi G., (2010), "Biological and structural characterization of the *Mycobacterium smegmatis* nitroreductase NfnB, and its role in benzothiazinone resistance", *Molecular Microbiology*, 77 (5), 1172-1185.
- [139] Streker K., Freiberg C., Labischinski H., Hacker J., Ohlsen J., (2005), "*Staphylococcus aureus* NfsA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response", *Journal of Bacteriology*, 187 (7), 2249–2256.
- [140] Green L., Syddall S., Carlin K., Bell G., Guise C., Mowday A., Hay M., Smaill J., Patterson A., Ackerley D., (2013), "*Pseudomonas aeruginosa* NfsB and nitro-CBI-DEI - a promising enzyme/prodrug combination for gene directed enzyme prodrug therapy", *Molecular Cancer*, 12 (1), 58.
- [141] Green L., Storey M., Williams E., Patterson A., Smaill J., Copp J., Ackerley D., (2013), "The Flavine Reductase MsuE Is a Novel Nitroreductase that Can Efficiently Activate Two Promising Next-Generation Prodrugs for Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy", *Cancers*, 5 (3), 985-997.

- [142] Takahashi S., Furuya T., Ishii Y., Kino K., Kirimura K., (2009), "Characterization of a flavin reductase from a thermophilic dibenzothiophene-desulfurizing bacterium, *Bacillus subtilis* WU-S2B", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (1), 38-41.
- [143] Morokutti A., Lyskowski A., Sollner S., Pointner E., Fitzpatrick T. B., Kratky C., Gruber K., Macheroux P., (2005), "Structure and Function of YcnD from *Bacillus subtilis*, a Flavin-Containing Oxidoreductase", *Biochemistry*, 44 (42), 13724-13733.
- [144] Schmidt A. C., Herzsuh R., Matysik F. M., Engewald W., (2006), "Investigation of the ionisation and fragmentation behaviour of different nitroaromatic compounds occurring as polar metabolites of explosives using electrospray ionisation tandem mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (15), 2293-2302.
- [145] Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T., Oliyai R., Oh D., Jarvinen T., Savolainen J., (2008), "Prodrugs: design and clinical applications", *Nature Reviews Drug Discovery*, 7 (3), 255-270.
- [146] Redinbo M. R., Bencharit S., Potter P.M., (2003), "Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery", *Biochemical Society Transactions*, 31 (3), 620-624.
- [147] Huttunen K. M., Raunio H., Rautio J., (2011), "Prodrugs—from Serendipity to Rational Design", *Pharmacological Reviews*, 63 (3), 750-771.
- [148] Zhang J., Kale V., Chen M., (2015), "Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy", *The AAPS Journal*, 17 (1), 102-110.
- [149] Huttunen K. M., Mahonen N., Leppanen J., Vepsalainen J., Juvonen R. O., Rauni H., Kumpulainen H., Jarvinen T., Rautio J., (2007), "Novel cyclic phosphate prodrug approach for cytochrome P450-activated drugs containing an alcohol functionality", *Pharmaceutical Research*, 24 (4), 679-687.
- [150] Ortiz de Montellano P. R., (2013), "Cytochrome P450-activated prodrugs", *Future Medicinal Chemistry*, 5 (2), 213-228.
- [151] Hu L., (2005), "Drug Delivery: Principles and Applications", 9780471475736, John Wiley & Sons, Inc.
- [152] Rooseboom M., Commandeur J. N. M., Vermeulen N. P. E., (2004), "Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs", *Pharmacological Reviews*, 56 (1), 53-102.

- [153] Pereira A. T., (1962), "Coagulase-negative strains of staphylococcus possessing antigen 51 as agents of urinary infection", *Journal of Clinical Pathology*, 15 (3), 252-253.
- [154] Kuroda M, Yamashita A., Hirakawa H., Kumano M., Morikawa K., Higashide M., Maruyama A., Inose Y., Matoba K., Toh H., Kuhara S., Hattori M., Ohta T., (2005), "Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (37), 13272-13277.
- [155] Goodyer L., (2000) "Fundamentals of Pharmacology: A Text For Nurses and Health Professionals", *International Journal of Nursing Studies*, 37 (6), 555.
- [156] Organization W. H., (2015), 'WHO Model Lists of Essential Medicines', 19th Edition, World Health Organization.
- [157] Institute C. A. L. S., (2014), 'M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement', In Zone Diameter and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Standards for *Staphylococcus* spp., pp 68-75, USA.
- [158] Majewsky M., Wagner D., Delay M., Bräse S., Yargeau V., Horn H., (2014), "Antibacterial Activity of Sulfamethoxazole Transformation Products (TPs): General Relevance for Sulfonamide TPs Modified at the para Position", *Chemical Research in Toxicology*, 27 (10), 1821-1828.
- [159] Bonev B., Hooper J., Parisot J., (2008), "Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (6), 1295-1301.
- [160] Jaberipour M., Vass S. O., Guise C. P., Grove J. I., Knox R. J., Hu L., Hyde E. I., Searle P. F., (2010), "Testing double mutants of the enzyme nitroreductase for enhanced cell sensitisation to prodrugs: Effects of combining beneficial single mutations", *Biochemical Pharmacology*, 79 (2), 102-111.
- [161] Li Z., Han J., Jiang Y., Browne P., Knox R. J., Hu L., (2003), "Nitrobenzocyclophosphamides as potential prodrugs for bioreductive activation: synthesis, stability, enzymatic reduction, and antiproliferative activity in cell culture", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11 (19), 4171-4178.
- [162] Hu L., Yu C., Jiang Y., Han J., Li Z., Browne P., Race P. R., Knox R. J., Searle P. F., Hyde E. I., (2003), "Nitroaryl phosphoramides as novel prodrugs for *E. coli* nitroreductase activation in enzyme prodrug therapy", *Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (23), 4818-4821.

- [163] Hu L., Wu X., Han J., Chen L., Vass S. O., Browne P., Hall B. S., Bot C., Gopalakrishnapillai V., Searle P. F., Knox R. J., Wilkinson S. R., (2011), "Synthesis and structure–activity relationships of nitrobenzyl phosphoramidate mustards as nitroreductase-activated prodrugs", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 (13), 3986-3991.

ÖZGEÇMİŞ

Gülden YETİŞ 1984 yılında Kocaeli'nde doğdu. 2002 yılında başladığı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünü 2007 yılında başarıyla tamamladı ve 2008 yılında yüksek lisans eēitimine Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı. 2011 yılında yüksek lisans eēitimini tamamlayıp aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında doktora eēitimine başladı. 2015 yılında Atatürk Orman iftliēi Mdrlē Süt ve Mamlleri Fabrikasında göreve başladı.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Çelik A., Yetiş G., Ay M., Güngör T., (2016), “Modification of existing antibiotics in the form of precursor prodrugs that can be subsequently activated by nitroreductases of the target pathogen”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26 (16), 4057–4060.