T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUMARİN TÜREVLERİNİN *BACTEROIDES FRAGILIS*'İN D-LDH ENZİMİ ÜZERİNE OLAN İNHİBİTÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ERENNUR UĞUREL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. Dilek TURGUT BALIK

EŞ DANIŞMAN

ÖĞR. GÖR. DR. ÖZKAN DANIŞ

İSTANBUL, 2015

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUMARİN TÜREVLERİNİN *BACTEROIDES FRAGILIS*'İN D-LDH ENZİMİ ÜZERİNE OLAN İNHİBİTÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Erennur UĞUREL tarafından hazırlanan tez çalışması 04/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Öğr. Gör. Dr. Özkan DANIŞ

Marmara Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Öğr. Gör. Dr. Özkan DANIŞ

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. İmer OKAR

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Doç. Dr. Merih ÇETİNKAYA

KSS Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Yrd. Doç. Dr. Muhammet U. KAHVECİ

Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Akademik hayata geçmemde ve bu yolda ilerlemem konusunda her zaman bana destek olan, tez çalışmamda bilgisi, deneyimi ve sonsuz sabrı ile yol gösteren, her konuda yakın ilgi ve desteği ile kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Dilek Turgut-Balık'a,

Tez çalışmasının yürütülmesinde hiçbir yardımı esirgemeyen, tez çalışmamda büyük bir sabır ile çalışmalarıma destek olan ve yol gösteren Marmara Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim görevlisi değerli eş danışman Hocam Sayın Dr. Özkan Danış'a,

Yüksek lisans eğitimimde sağlamış olduğu destekten dolayı TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na,

Deneysel çalışmalarımda bana destek olan Marmara Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim görevlisi Hocam Sayın Dr. Başak Yüce Dursun'a, docking çalışmalarında bana destek olan Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Hocam Sayın Özal Mutlu'ya,

Tez çalışmasının yürütülmesine destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanlığı'na ve bölümümdeki tüm hocalarıma,

Tez çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanmasında desteğini esirgemeyen Biyomühendislik Bölümü Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım Uzman Dr. Ayşegül Erdemir, Araş. Gör Emrah Sarıyer, Araş. Gör. Belma Nural, Dr. Ekrem Akbulut, Sinem Yakarsönmez, Zeynep Büşra Bolat, Burcu Ata ve Sezen Spahi ile birlikte Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan diğer yüksek lisans/doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında varlıkları ile bana güç veren ve akademik hayatımın başlangıcında ve devamında da yanımda olan ve aldığım kararlarda desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme,

Her konuda sabırla yardımcı olan, yoğun laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım sürecimde daima özverisini ve desteğini hissettiğim sevgili eşim Osman Uğurel'e,

Çok teşekkür ederim.

Ağustos, 2015

Erennur Uğurel

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ.....vii

KISALTMA LİSTESİ.....viii

ŞEKİL LİSTESİ.....ix

ÇİZELGE LİSTESİ x

ABSTRACT.....xiii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.1.1 *Bacteroides fragilis* 1
1.1.2 Antibiyotik direnci 5
1.1.3 *B. fragilis*'in Enerji Metabolizması 8
1.1.4 D-Laktat Dehidrogenaz 9
1.1.5 Enzim İnhibisyonu 10
1.1.6 Kumarin ve Türevleri 15
1.2 Tezin Amacı 16
1.3 Hipotez 16

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM 18

2.1 Materyaller 18
2.1.1 Kimyasallar ve Sarflar 18
2.1.1.1 D-LDH Genini İçeren Rekombinant DNA Molekülü 18
2.1.1.2 Kumarin Türevleri 19
2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar 26
2.1.3 Besiyerleri, Stok Çözeltiler ve Tamponlar 27
2.1.3.1 Protein Saflaştırma İçin Kullanılan Besiyerleri, Stok Çözeltiler ve Tamponlar 27
2.1.3.2 Enzim İnhibisyonu Çalışması İçin Gereken Çözeltiler ve Tamponlar 33
2.2 Yöntem 33

2.2.1 Protein Saflaştırma ve Analizi ile İlgili Yöntemler 33
2.2.1.1 Rekombinant DNA Molekülüne Sahip Hücrelerin Geliştirilmesi .. 33
2.2.1.2 Saflaştırma 34
2.2.1.3 Enzim aktivite tayini 35
2.2.1.4 SDS PAGE 35
2.2.2 Enzim Aktivitesi ve İnhibisyon Çalışmaları 35
2.2.2.1 Enzim Aktivitesi ve Konsantrasyonunun Tayini 35
2.2.2.2 Kumarin Türevleri ile İnhibisyon Çalışmaları 36
2.2.2.3 K5, K21 ve K23 Kumarin Türevleri ile İnhibisyon Mekanizması Çalışmaları 37
2.2.2.4 Kumarin türevlerinin Lipinski'nin Beş Kuralına Uygunluklarının Araştırılması 37
2.2.2.5 Kumarin Bileşikleri Kullanılarak *Bf*D-LDH Üzerinde Moleküler Docking Çalışmasının Yapılması 38

BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE TARTIŞMA 39

3.1 Enzimin Saflaştırılması ve SDS-PAGE Analiz Sonuçları 39
3.2 Kumarin Türevlerinin İnhibitör Etkinliğinin Saf *Bf*D-LDH Kullanılarak Taranması 41
3.2.1 Enzim Aktivitesi 41
3.2.2 Kumarin Türevleri ile İnhibisyon Çalışmaları 42
3.2.3 İnhibisyon Mekanizması ve Kinetiği 48
3.3 … Kumarin Bileşikleri Kullanılarak *Bf*D-LDH Üzerinde Moleküler Docking Çalışmasının Yapılması 53

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 61

KAYNAKLAR 63

ÖZGEÇMİŞ 68

SİMGE LİSTESİ

[S]	Substrat konsantrasyonu
°C	Derece Santigrat
A	Absorbans
g	Gram
IC_{50}	Enzimi % 50 inhibe etmek için gerekli inhibitör konsantrasyonu
kDa	Kilo Dalton
K_i	İnhibisyon sabiti
K_m	Michaelis Menten sabiti
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki devir sayısı
V_0	Başlangıç hızı
V_{max}	Maksimum hız

KISALTMA LİSTESİ

AcHE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer hastalığı
AIDS	Edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu
*Bf*D-LDH	*Bacteroides fragilis*D- Laktatdehidrogenaz
B.f	*Bacteroides fragilis*
BFT	*Bacteroides fragilis* toksin
D- LDH	D- Laktat dehidrogenaz
dH_2O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleikasit
E. coli	*Escherichia coli*
EC	Enzim Komisyonu
ES	Enzim Substrat Kompleksi
ESI	Enzim Substrat İnhibitör Kompleksi
ETBF	Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis*
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
IPTG	İzopropil-β -D- tiyogaltopiranosid
K1- K29	Kumarin türevleri
LDH	Laktat dehidrogenaz
MLS	Makrolid-Linkozamid-Streptogramin
NAD^+	Nikotinamid adenin dinükleotid
Nİ-NTA	Nikel-nitrilotriasetik asit
NTBF	Nontoksijenik *Bacteroides fragilis*
PBP	Penisilin bağlayan protein
PSA	Polisakkarit A
PSH	Polisakkarit H
SAB	Örnek uygulama tamponu
SDS- PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
UV	Ultraviyole
UV/ Vis	Ultraviyole/ Görünür bölge
β- NADH	β- Nikotinamid adenin dinükleotid

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1 Klinik olarak *Bacteroides* türlerinin görülme oranı 2
Şekil 1. 2 *B. fragilis'*in moleküler alt türleri 3
Şekil 1. 3 Antibiyotiğin keşfi ve ona eşlik eden antibiyotik direncinin gelişmesi 5
Şekil 1. 4 *B. fragilis* NCTC 9343'ün piruvat metabolizması 8
Şekil 1. 5 L-LDH ve D-LDH enzim reaksiyonları 9
Şekil 1. 6 Yarışmalı inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi 11
Şekil 1. 7 Yarışmasız inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi 12
Şekil 1. 8 Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi 12
Şekil 1. 9 Substrat derişimine karşı başlangıç hızının değişimi 13
Şekil 1. 10 Lineweaver–Burk Grafiği 14
Şekil 1. 11 Kumarinin genel yapısı 15
Şekil 2. 1 T4 DNA polimeraz ve dGTP ile ilgili gen üzerinde yapışkan uç üretilmesi ... 19
Şekil 2. 2 pLATE 31 İfade Vektörü 32
Şekil 3. 1 Ni-NTA ve 6 His tag arasındaki etkileşim 39
Şekil 3. 2 Saflaştırılan D-LDH'ın SDS-PAGE analiz sonucu 40
Şekil 3. 3 Saflaştırılan D-LDH'ın SDS-PAGE analiz sonucu 40
Şekil 3. 4 Michealis-Menten grafiği 42
Şekil 3. 5 Bradford standart eğrisi 42
Şekil 3. 6 Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri 43
Şekil 3. 7 Yüksek enzim inhibisyonu gösteren kumarin türevlerinin IC_{50} değerleri 46
Şekil 3. 8 Çalışmada kullanılan 3-aril ve 4-aril kumarin türevlerinin genel yapıları 46
Şekil 3. 9 K5 için Michaelis-Menten grafiği 49
Şekil 3. 10 K5 için Lineweaver–Burk grafiği 49
Şekil 3. 11 K21 için Michaelis-Menten grafiği 50
Şekil 3. 12 K21 için Lineweaver–Burk grafiği 50
Şekil 3. 13 K23 için Michaelis-Menten grafiği 51
Şekil 3. 14 23 için Lineweaver–Burk grafiği 52
Şekil 3. 15 Olası ilaç bağlanma bölgelerinin (ceplerinin) gösterimi 53
Şekil 3. 16 Bütün ligandların (sarı renk ile) bağlandığı aktif bölgenin görüntüsü 54
Şekil 3. 17 K23 ve K5'in farmakofor modelleri ve A: acceptör, D: Donör 60

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Kumarin bileşiklerinin adlandırılması ve kimyasal formülleri 20
Çizelge 2. 2 2xYT Agar bileşenleri 27
Çizelge 2. 3 2xYT Broth 27
Çizelge 2. 4 % 30 Akrilamid/Bis çalışma çözeltisi bileşenleri 28
Çizelge 2. 5 SDS-PAGE örnek uygulama tamponu bileşenleri 28
Çizelge 2. 6 SDS-PAGE ayırma jeli bileşenleri 29
Çizelge 2. 7 SDS-PAGE yükleme jeli bileşenleri 29
Çizelge 2. 8 5X SDS-PAGE tank tamponu bileşenleri 30
Çizelge 2. 9 Protein boyama çözeltisi bileşenleri 30
Çizelge 2. 10 Boya uzaklaştırıcı çözelti bileşenleri 30
Çizelge 2. 11 Liziz tamponu bileşenleri 31
Çizelge 2. 12 Yıkama tamponu bileşenleri 31
Çizelge 2. 13 Elüsyon tamponu bileşenleri 32
Çizelge 3. 1 Kumarin türevleri ve IC_{50} değerleri ve standart sapma değerleri 45
Çizelge 3. 2 6 Kumarin türevinin 50 µM konsantrasyondaki % inhibisyon değerleri 45
Çizelge 3. 3 Docking sonuçları (kcal/mol) 55
Çizelge 3. 4 Kumarin türevleri ile *Bf*D-LDH'ın moleküler docking görüntüleri 56

ÖZET

KUMARİN TÜREVLERİNİN *BACTEROİDES FRAGİLİS*'İN D-LDH ENZİMİ ÜZERİNE OLAN İNHİBİTÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Erennur UĞUREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Eş Danışman: Öğr. Gör. Dr. Özkan DANIŞ

Bacteroides fragilis insan kolon florasında doğal olarak bulunan anaerobik bir bakteridir. *B. fragilis*'in D-laktat dehidrogenazı (*Bf*D-LDH), D-laktatın piruvata dönüşümünü katalize eden çok önemli bir enzimdir ve anaerobik glikolizi düzenler. *B. fragilis* ile ilgili yapılan sonçalışmalar kolon kanseri ile ilişkisini açığa çıkarmıştır. Dünya genelinde *B. fragilis'in* enterotoksijenik suşunun sebep olduğu enfeksiyonlara karşı antibiyotik direnç geliştiği bildirilmiştir. Bu nedenle, bu enfeksiyonların tedavisi için yeni yaklaşımlar bulunmasına yönelik çalışmaların yapılması zorunludur. Bu tez çalışmasında, *B. fragilis*'in kolon florasındaki enfeksiyonunun baskılanması için *Bf*D-LDH'ın inhibe edilmesi hedeflenmiştir. Laboratuvar grubumuz tarafından klonlanmış ve protein ekspresyonu gerçekleştirilmiş olan *Bf*D-LDH'ı saflaştırmak için Ni-NTA agaroz kolonları ile afinite kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. SDS-PAGE analizi ile enzimin yüksek miktarda ve %95 üzeri saflıkla elde edildiği gösterilmiştir. Daha önce sentezlenmiş olan ve -hidroksi, -asetoksi ve -metoksi grupları taşıyan 29 adet kumarin türevinin *Bf*D-LDH üzerindeki inhibe edici etkileri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Yapılan taramada 15 kumarin türevinin 10 µM ve altında IC_{50} değeri ile *Bf*D-LDH'ı yüksek seviyede inhibe ettiği bulunmuştur. En düşük IC_{50} değerini gösteren 3 kumarin türevi için (K5: 0,47 µM, K21:0,57 µM ve K23: 0,057 µM) enzim inhibisyonu mekanizması ve enzimli reaksiyonun kinetik parametreleri ayrıntılı olarak incelenmiş ve

bu bileşikler ile *Bf*D-LDH inhibisyonu mekanizmasının yarışmasız inhibisyon olduğu bulunmuştur (K_i değerleri sırasıyla; 0.4532, 0.5183 ve 0. 3603 µM). *In silico* analiz için ChemDraw V10 programı ile kumarin türevlerinin kimyasal yapıları çizilmiş ve MarvinSketch V6.2 programı ile konformasyonları gösterilmiştir. Kumarin türevlerinin docking çalışmaları Molegro Virtual Docker programı ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan docking çalışmaları sonucunda kumarin türevlerinin enzimin aktif kalıntıları ile etkileşip etkileşmedikleri gösterilmiştir. Bu çalışma *Bf*D-LDH üzerine yapılan ilk inhibisyon çalışmasıdır. Bulunan yüksek inhibisyon sonuçları ve enzimin insanda eşdeğerinin olmaması daha ileri *in vivo* çalışmalar için ümit vericidir.

Anahtar Kelimeler: *Bacteroides fragilis,* D-Laktat Dehidrogenaz, Kumarin, Enzim İnhibisyonu, Kolon Kanseri, Moleküler Docking, Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı

ABSTRACT

DETERMINATION OF INHIBITORY EFFECTSOF COUMARIN DERIVATIVES ON *BACTEROIDES FRAGILIS* D-LDH ENZYME

Erennur UĞUREL

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Co-Adviser: Öğr. Gör. Dr. Özkan DANIŞ

Bacteroides fragilis is an anaerobic bacteria naturally hosted in the human colon flora. *B. fragilis* D-lactate dehydrogenase (*Bf*D-LDH) is an important enzyme which catalyzes the conversion of D-lactate to pyruvate and regulates anaerobic glycolysis. Recent studies show that *B. fragilis* has been associated with colon cancer. Antibiotic resistance has been reported worldwide against infections caused by enterotoxigenic strains of *B. fragilis*. Therefore, it is necessary to find new approaches to treating infections caused by resistant bacteria. In this thesis study, *Bf*D-LDH is selected as a target for suppressing of infections caused by *B. fragilis* in the colon flora. *Bf*D-LDH, that has been cloned and expressed by our laboratory group, is purified with affinity chromatography using Ni-NTA agarose column. SDS-PAGE analysis results show that high amounts of protein was obtained with purity of %95. Inhibitory activities of 29 previously synthetized coumarin derivatives, bearing hydroxyl, acetoxyl and methoxyl substitutions, on *Bf*D-LDH were investigated. In the screening it was found those 15 coumarin derivatives were potently inhibited *Bf*D-LDH with IC_{50} values lower than 10µM. For the coumarin derivatives with the highest inhibitory activity (K5, K21 and K23) inhibition mechanism and kinetic parameters of the enzymatic reaction were studied in detail. Enzyme inhibition mechanism of these compounds was determined

as noncompetitive inhibition (K_i= 0.4532, 0.5108 and 0.3603 µM, respectively). For *in silico* analysis, chemicals were sketched and confermers were identified by ChemDraw v10 and MarvinSketch v6.2 programs. Docking of the coumarins was carried out using Molegro Virtual Docker program and interaction between the coumarin derivatives and active side residues of the enzyme were demonstrated. This study is a pioneer in the inhibition of *Bf*D-LDH. High inhibitory activity of coumarin derivatives and the absence of the equivalent enzyme in human, give hope for future *in vivo* studies.

Keywords: *Bacteroides fragilis,* D- Lactate Dehydrogenase, Coumarin, Enzyme Inhibition, Colon Cancer, Molecular Docking, Structure-Based Drug Design

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 *Bacteroides fragilis*

Mikroorganizmalar, boyutları çok küçük olmasına rağmen, insan vücudunun önemli bir yüzdesini oluşturur [1]. İnsan vücudunda bulunan hücrelerin %90'ı bakteri hücresi iken %10'u ise insana aittir. Sonuç olarak bakteriler; bağışıklık sistemi, sindirim sistemi ve hastalıklara karşı korunmada insan vücudunda önemli role sahiptirler. Mikroorganizmaların insan vücudunda kolonileşmesi insan hayatının başlamasıyla beraber başlar. Kolon, insan vücudunda 10^{13} bakteri/g gaita ile en yoğun mikroorganizma populasyonuna sahiptir. Bu kompleks bakteri topluluğu baskın olarak *Bacteroidetes ve Firmicutes* olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. *Bacteroidetes* şubesinin *Bacteroides* türleri florada bulunan türlerin %30'unu oluşturmaktadır[1].

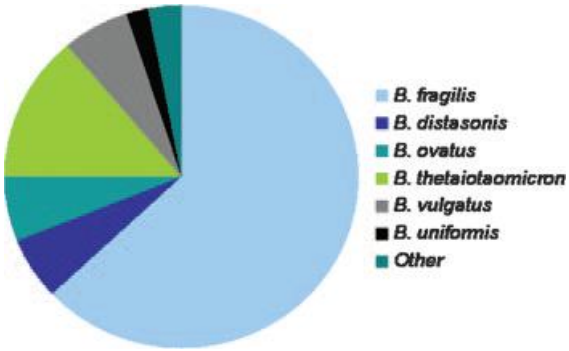
Bacteriodes türleri zorunlu anaerobik, gram negatif ve spor oluşturmayan, omurgalılarda özellikle ağız boşluğunda ve gastrointestinal sistemde yaygın olarak bulunan bakterilerdir [2]. İnsanların ve hayvanların sindirim sistemlerinden birçok *Bacteriodes* türü izole edilmiştir. Bunlar sakkarolitik bağırsak *Bacteriodes* türleri olarak anılmaktadırlar [3]. 1990'lı yıllara kadar *Bacteriodes* türlerinden sadece *Bacteriodes fragilis* biliniyor iken, klinik olarak anlamlı türlerin çoğu *Phorpromonos* veya *Provatella* cinsleri içinde yer almışlar ve *Bacteriodes* türleri olduğu anlaşılamamıştır. *16S*

ribozomal RNA gen dizilimi gibi kültür bağımsız yaklaşımların gelişmesi ile gastrointestinal sistemden veya kandan yeni *Bacteriodes* türleri izole edilmiştir [1].

Bacteroides türleri genelde konağın mukozal yapısına ve bağışıklığına katkıda bulunurken besin durumunada katkıda bulunan ortakçılardır [4]. Gastrointestinal sistemde bulunan *Bacteriodes* türleri; *B. fragilis, B. acidifaciens, B. caccae, B. coprocola, B. coprosuis, B. dorei, B. eggerthii, B. finegoldii, B. goldsteinii, B. helcogenes, B. intestinalis, B. johnsonii, B. massiliensis, B. nordii, B. ovatus, B. plebeius, B. pyogenes, B. salyersai, B. thetaiotaomicron, B. uniformis, B. vulgatus*'tur [4].

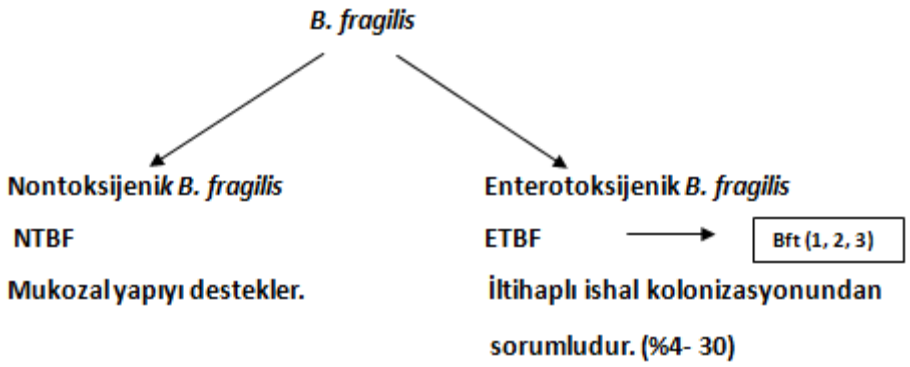
Ortak yaşam süren(kommensal) teriminin, *Bacteriodes* ile onun konağı olan insan arasındaki ilişkiyitam olarak açıklayamadığı ileri sürülmüştür. Ortakçı terimi "bir partner bu ilişkiden yararlanır iken, diğer partner bundan etkilenmez" olarak anlaşılmaktadır. Bilim insanları *Bacteriodes*-İnsan ilişkisi için iki partnerin de karşılıklı birbirinden yararlandığı mutualizm kavramının daha uygun düştüğünü ileri sürmüşlerdir [1].

Yapılan bazı çalışmalarda, bağırsak bakterilerinin özellikle *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* şubelerinin obezite ile ilişkilendirilmesi yapılmış ve obez bireylerin kolon florasında bu şubelere ait türlerin normalden daha az bulunduğu tespit edilmiştir [5], [6], [7], [8]. *Bacteroides* türleri ile insan arasındaki mutualist ilişkinin yanında, bu organizmalar önemli ölçüde hastalık ve ölümlerden sorumludurlar [9]. *B. fragilis* insan kolon florasının sadece %0.5'ini oluşturmasına rağmen klinik olarak en fazla izole edilen anaerobik patojendir [1].



Şekil 1. 1 Klinik olarak *Bacteroides* türlerinin görülme oranı [1]

B. fragilis'in polisakkarit kapsülü konağın bağışıklık sistemini etkiler ve apse oluşumundan sorumludur. Bu nedenle *B. fragilis* en önemli virulans faktörlerden birisidir ve de bu özelliklerinden dolayı 'dost ve düşman' olarak tanımlanır [1]. *B. fragilis*'in toksijenik olmayan nontoksijenik *B.fragilis* (NTBF) ve hastalıklara sebep olan enterotoksijenik *B.fragilis* (ETBF) olmak üzere iki adet moleküler soyu bulunmaktadır [10].



Şekil 1. 2 *B. fragilis'*in moleküler alt türleri [4]

NTBF'nin insan vücuduna birçok yararı bulunmaktadır. *B. fragilis* potansiyel patojenlerin girişini ve çoğalmasını sınırlayan immün yanıtın gelişmesinden sorumludur [1]. Bugüne kadar, sadece iki NTBF suşu dizilenmiştir ve tamamen dizilenmiş olan (NCTC 9343) suşu ile(Accession NO: NC_003228.3) NTBF biyolojisinin önemli bir bölümü açıklığa kavuşmuştur. NTBF polisakkarit A, B, C, D, E, F, G ve H (PSA-H) olmak üzere sekiz faklı polisakkariti ifade eder ve PSA aracılığı ile NTBF'nin konak bağışıklık sistemi üzerinde güçlü etkileri olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada *B. fragilis*'in kapsüler PSA (polisakarit A) protein antijenlerinin kullanılması yolağıyla, T hücre-bağımlı bağışıklık tepkilerine aracılık ettiği, PSA'nın potansiyel patojen fırsatçı bakterilerin neden olduğu bağırsak iltihabı ve hastalık gelişimini önleyebileceği bildirilmiştir [4], [11].

NTBF insanlar için yararlı olmakla birlikte, ETBF bu bakterinin neden olduğu hastalıklardan sorumludur. ETBF, *B.fragilis* toksin (BFT) olarak bilinen bir pro-

enflamatuvar toksini salgılama yoluyla hastalıklara neden olur. ETBF ile diyare arasındaki ilişki ilk olarak 1992 de yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [12].

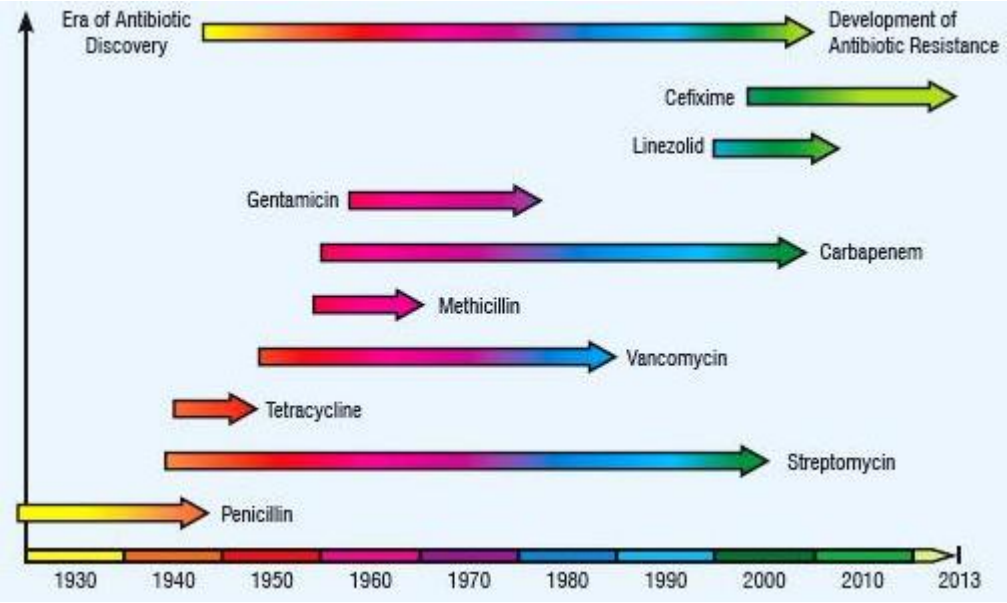
B. fragilis bir travmadan sonra bağırsak florasından, hasarın olduğu bölgeye doğru hareket ederek vücudun farklı bölgelerinde enfeksiyonlara sebep olabilir [1]. Bakteremi, septik artrit ve enflamatuar bağırsak hastalıkları *B. fragilis* ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda ölüm oranı %21- %43 oranlarına varan kalp zarı iltihaplarına, nadir olarak beyin apsesine, menenjite ve de karın içi sepsis, apandisit iltihabı ve jinekolojik enfeksiyonlara sebep olmaktadır [1]. *B. fragilis* ile kolon kanseri ilk olarak Toprak vd. tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışma ile ilişkilendirilmiştir [2]**.**ETBF, aktif bölgesinde [Zn^{+2}] olan frajilizin adı verilen enterotoksin salgılamaktadır. Bu toksin bağırsak epitelyum hücrelerinde bazı morfolojik değişimler oluşturarak küçük çocuklarda ishale sebep olmaktadır. Frajilizin, bağırsak epitel hücrelerini birbirine bağlamakla görevli olan zonula adherensin ekstra-selüler parçası E-kaderin'i parçalayarak etkisini göstermektedir. E-kaderin yıkıldığı zaman hücre içi sinyal mekanizması devreye girer ve çekirdekte bulunan c-Myc gibi onkojen proteinlerin ekspresyonu artar. Kolon kanseri oluşumunda bu mekanizmayı devreye sokan frajilizinin etkili olabileceği düşünülmüştür [13].

Kanser, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunudur [14]. Kolorektal kanser dünya üzerinde ölüme neden olan kanser türleri arasında ikinci sırada yer almaktadır ve en sık tanı konulan dördüncü hastalıktır [15]. 2012 yılında dünya çapında kolorektal kanseri ile ilgili 1.4 milyon yeni teşhis konulmuş olmakla beraber 2035 yılına kadar 2.4 milyon kolorektal kanser teşhisi konulması beklenmektedir [15]. Kolorektal kanseri tetikleyen ya da engelleyen birçok faktör bilinmektedir. Bunlar engellenebilen ve engellenemeyen faktörlerdir [14]. Engellenemeyen faktörlerden bazıları kolorektal kanserde aile öyküsü ve kişisel kronik enflamatuar barsak hastalığı öyküsüdür. Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %5'inde hastalığına neden olan tanımlanmış genetik sendrom bulunmaktadır. Bunlardan en yaygını (kalıtsal olmayan kolorektal kanser olarak da bilinir), Lynch sendromudur. Yaklaşık her 35 kolorektal kanser hastasının 1 tanesinde Lynch sendromu vardır. Kolorektal kanser öyküsü olan kişilerde kolonda veya rektumda bir daha kansere yakalanma riski daha yüksektir [16]. Yaşa,

cinsiyete ve ırka göre de kolon kanserine yakalanma riskleri değişkenlik göstermektedir [14].

1.1.2 Antibiyotik direnci

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan bakterileri öldüren ya da çoğalmalarını engelleyen maddelerdir [17]. Antibiyotikler, biyolojik kaynaklı veya sentetik olarak elde edilen ilaçlardır. Yirminci yüzyılda bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki mekanizmaları ile bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaları, tıp tarihinde bir dönüm noktası olmuştur. Ancak bakteriler, çevrelerinde meydana gelen değişiklere hızlı bir şekilde uyum sağlama ve hayatta kalma yetenekleri oldukça yüksek canlılardır. Bakterilerin bu özellikleri göz önüne alındığında, son 50 yıl içinde tanımlanan antibiyotik direncinin beklenen bir sonuç olduğu ortadadır [18]. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarına göre antibiyotik direnci toplum sağlığını tehdit eden ve giderek artan bir problemdir [19]. Yapılan bir araştırmada, 400 farklı türde 20.000'den fazla potansiyel direnç geninin varlığını açıklamışlardır [18]. Antibiyotiklerin kullanılması ile beraber bakteriler bu antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmeye başlamışlardır. Şekil 1. 3'te bu gelişim süreci gösterilmiştir.



Şekil 1. 3 Antibiyotiğin keşfi ve ona eşlik eden antibiyotik direncinin gelişmesi [20]

B. fragilis antibiyotikler ile tedavi edilmediğinde karın içi enfeksiyon ve bakteremi gibi hastalıklarla ölüme sebep olabilmektedir [1], [21]. *B. fragilis* tedavisinde kullanılan en

etkili antibiyotikler; penisilin, sefalosporin, karbapenem, klindamisin ve metronidazol'dür. Bununla birlikte son yıllarda *B. fragilis*'in antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir [22], [23], [24], [25].

Avrupada yapılan araştırmalar *B. fragilis* izolatlarının %24,2 ile %28,5'inin klindamisine dirençli olduğu sonucunu ortaya koymuştur [21], [26]. Yapılan bir çalışmada [21]özetlendiği gibi; 1980 yılında ABD'de yapılan bir araştırmada klindamisine %6 direnç belirtilmiş fakat 2007'de bu oran %35'e kadar yükselmiştir. Karbapenem direncinin, metalo-beta-laktamazı kodlayan *cfiA* geninin varlığı sebebiyle oluştuğu gösterilmiştir. ABD ve Avrupada yapılan araştırmalarda imipeneme olan direncin %1'den daha düşük olduğu belirtilmiştir. Sefoksitin direncinin ise Avrupa'da %13,7 iken ABD'de %9 olduğu rapor edilmiştir. *B. fragilis'*in sebep olduğu enfeksiyonlar için kullanılan en etkili antibiyotik metronidazoldür. Bu antibiyotik tedavi için diğer antibiyotikler denendikten sonra son seçenek olarak bulundurulan 5-nitroimidazol ajandır. Dünya çapında metronidazol direncinin ise %1 ile %5 oranları arasında olduğu rapor edilmiştir. 23 *B. fragilis* izolatının genetik analizleri sonucunda metronizadol dirençli suşların hiçbirinde *nima-j* genini taşımadığı bildirilmiş, ayrıca hiçbirinde *cfxA* ve *ermf* genleri de tespit edilmemiştir. Tetrasikline dirençli izolatların tümü *tetQ* genini içerirken, tigesikline duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Dirençli bir suşta ise *cfiA* geni üzerindeki promotor bölgede G bazının A bazına dönüştüğü tespit edilmiştir [21].

β-laktam antibiyotikler (penisilin, karbapenemler, sefalosporinler ve monobaktamlar) etkilerini, bakterinin hücre duvar sentezinin son basamağında peptidoglikan zincirini birbirine bağlamakla görevli olan transpeptidasyon işlevini bozarak gösterirler[27]. Bu antibiyotikler, hücre duvarının oluşumunda etkili penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak duvar yapımına engel olurlar [27]. Bir direnç mekanizması, bakteri kromozomunda mutasyon sonucu yeni PBP'ler oluşur ve β-laktam antibiyotikler bu PBP'lere bağlanamadığı için antibiyotikler etkilerini gösteremez. Başka bir direnç mekanizmasında ise kromozomlarda oluşan mutasyon sonucu dış membran proteinlerinde yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu durumda β-laktam antibiyotikler hücre içine giremez ve PBP'lere ulaşamaz. Son bir direnç mekanizması ise; *B. fragilis* grubu bakterilerin A.B.D, Japonya ve Avrupa ülkelerinde %75-100 oranında β-laktamaz

ürettikleri bildirilmiştir. β-laktamazlar, β-laktam halkasının amid bağını hidrolize ederler ve β-laktam antibiyotikleri inaktif hale getirirler [27], [28],[29], [30].

Makrolid-Linkozamid-Streptogramin (MLS) grubu antibiyotikler, farklı gruplara ait olmalarına rağmen, aynı ribozomal alt üniteye bağlanarak etki gösterirler ve burada oluşan mutasyonlar bu üç antibiyotiğe birden direnç (MLS direnci) geliştirmektedir [31]. Anaerob bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda MLS antibiyotikleri içinde en fazla klindamisin kullanılmaktadır [32]. Klindamisin, bakteri ribozomunun 50S alt-birimine bağlanırlar ve aynı yere tRNA molekülünün bağlanmasını ve aynı zamanda peptid zincirinin uzamasını önleyerek bakteride protein sentezini engelleyerek etkisini gösterir. Bakteri ribozomunun 50S alt birimindeki 23S rRNA'da bulunan adenin yan zincirinin metilasyonu sonucu MLS_B antibiyotiklerinin ortak hedef bölgelerine bağlanmaları azalmakta ve ilaç etkisini gösterememektedir. Bakteri tarafından salınan ve metilasyonu sağlayan N-metil transferaz (metilaz)'ı *erm* genleri kodlamaktadır ve *B. fragilis*'te *erm FU*, *erm FS* ve *erm F* genleri tanımlanmış ve direnç %5-20 olarak bulunmuştur [31], [32].

Tetrasiklin direnci ise dünya genelinde %80-90 civarında olup son 40 yıldır kullanılmamaktadır. Direnç tetrasiklin hedef bölgesi olan ribozomlarda meydana gelen değişimlerle ortaya çıkmıştır [32].

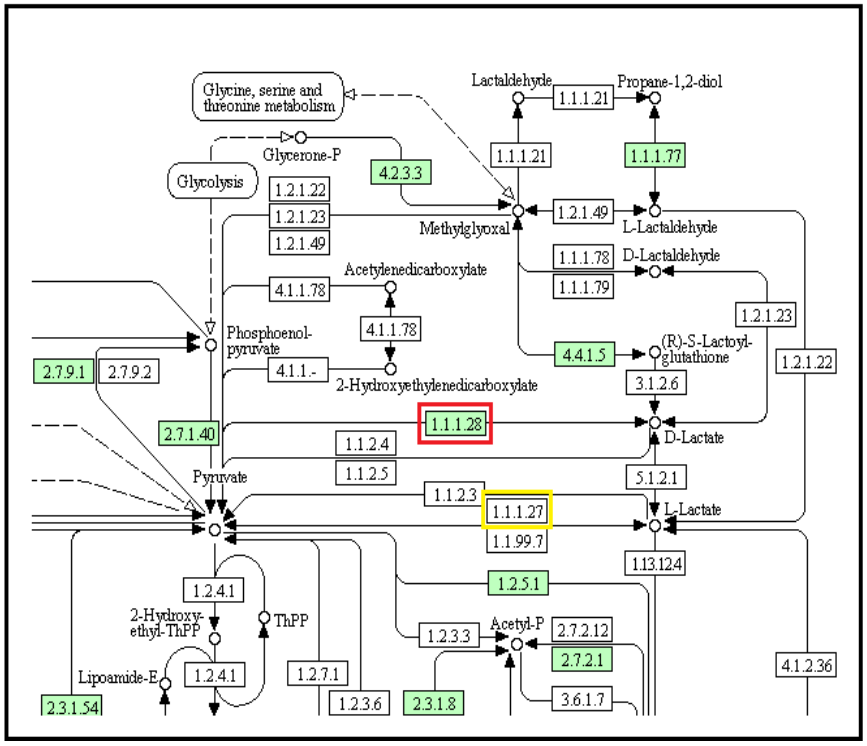
Metronidazol ise 5' nitroimidazol türevleri içinde en fazla kullanılan antibiyotiktir. Metronidazolün nitro grubu indirgendiğinde, aktif olarak bakteriyostatik etki gösterir ve anaerob ortamlarda sabit kalır. Oksijenli ortamda ise indirgenen yapı hızlı bir şekilde eski halini alır. Oksijensiz ortamda indirgenen metronidazolün hidroksiamin yapısı bakterinin DNA'sına bağlanır ve çift sarmal yapıyı bozarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engellemiş olur. Mitronidazole direnç nitroredüktaz enzim aktivitesinde azalma ile ve hücre içine antibiyotik girişinde azalma ile gerçekleşmektedir. Dirence *nim A* ve *nim B* genlerinin sebep olduğu bildirilmiştir[28], [30].

Kloramfenikol ise bakteri ribozomunun 50 S alt birimine bağlanır ve protein sentezini durdurarak antimikrobik etki gösterir. *Bacteroides*'lerde asetil transferaz ve nitoredüktaz enzimlerini kodlayan iki direnç geni tanımlanmıştır. Bu enzimler

kloramfenikolün yapısında değişimlere sebep olmuş ve bakteri ribozomuna bağlanamadığı için ilaç etkisini gösteremediği tespit edilmiştir [28], [30].

1.1.3 *B. fragilis*'in Enerji Metabolizması

Bakteriler, enerji ihtiyaçlarını aminoasit metabolizması ya da karbonhidrat metabolizması gibi farklı metabolik yollarla sağlayabilirler. Karbonhidratlar organizmaların metabolik süreçlerinde önemli rol oynamaktadır ve canlı hücrelerin yapı taşları ve enerji kaynakları olarak görev almaktadırlar. Glikolizde her bir glikoz molekülü, iki adet üç karbonlu piruvata dönüşür. Piruvatın bir sonraki aşaması organizmanın metabolik koşullarına göre değişir. Anaerobik organizmalar, piruvatı laktik asit, etanol, asetik asit ve benzeri moleküllere çevirebilir [33]. *B. fragilis,* temel enerji kaynağı olarak karbonhidrat metabolizmasını kullanır [1]. Şekil 1. 4'te *B. fragilis* NCTC 9343 piruvat metabolizmasını göstermektedir.

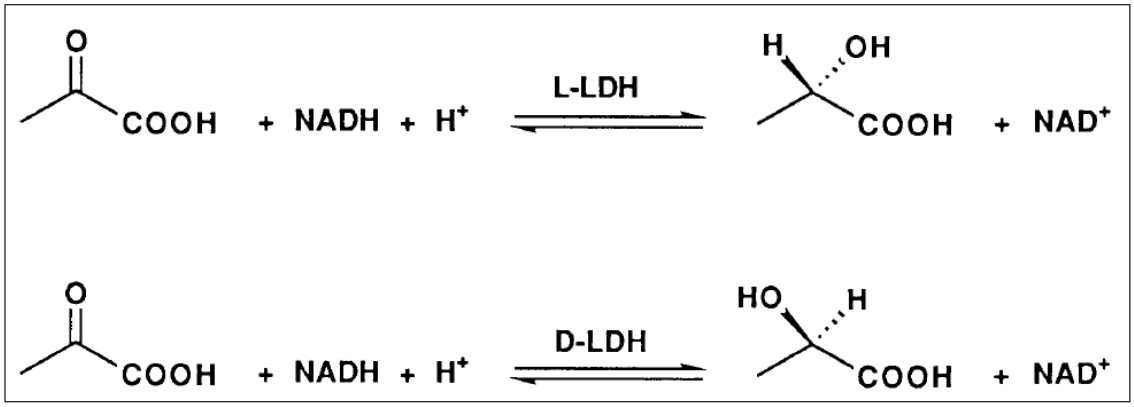


Şekil 1. 4 *B. fragilis* NCTC 9343'ün piruvat metabolizması [34]

1.1.4 D-Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (Şekil 1. 5), glikolizin devamı için anaerobik solunumda kritik olan piruvatın laktata ve laktatın piruvata dönüşümünü çift yönlü katalizleyen ve NAD^{+}' ın kendi içlerinde çevirimini sağlayan enzimdir [35], [36].

Birbirine benzeyen fakat aynı zamanda eşsiz substrat özgüllüğüne sahip laktat dehidrogenazın doğal olarak meydana gelen iki formu; prokaryotlar, mantarlar ve omurgasızlar gibi basit yapılı organizmalardan izole edilmiştir [34]. L-Laktat dehidrogenaz (EC 1.1.1.27) ve D-Laktat dehidrogenaz (EC 1.1.1.28), laktat dehidrogenazın L ve D izomerleridir [34].



Şekil 1. 5 L-LDH ve D-LDH enzim reaksiyonları [35]

Bu yolak glikozun 3 karbonlu piruvata oksidasyonundan ve parçalanmasından sorumludur. Anaerobik koşullarda NADH bağımlı mekanizma yoluyla piruvat, laktik asite indirgenir. Laktik asidoz adı verilen vücutta laktik asit birikmesi meydana geldiğinde ise hücreler oksidasyon ile laktik asiti piruvata çevirerek bu birikmeyi kontrol altına alırlar. Bu dönüşüm yine LDH ile gerçekleşir. Fakat bu durumda kofaktör olarak NAD^{+} kullanılır [34].

İlk olarak 1970 yılında köpek balığı LDH'ının yapısı yayımlanmıştır [37]. Bränden ve Rossman 1970 yılında köpek balığı LDH'ı ile at karaciğeri alkol dehidrogenazının yapılarını karşılaştırmış ve NAD^{+} bağlanma bölgelerinde temel benzerlikler olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra Rao ve Rossman (1973) süper ikincil yapıların karşılaştırması için sistematik yöntemler geliştirmişler ve bu yöntemi dehidrogenazlar ve flavodoksinler üzerinde uygulamışlardır. Dehidrogenazların NAD^{+} bağlanma

bölgeleri korunmuş olarak βαβαβ motifine sahip olduğu gözlemlenmiştir. NAD^+'ın bağlandığı enzimler GXGXXG parmak izi adı verilen karakteristik bir dizi bulunmaktadır. Laktat dehidrogenaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, alkol dehidrogenaz ve dihidropteridin redüktaz aynı GXGXXG parmak izine sahiptir. G; glisin aminoasitini ifade ederken X; herhangi bir aminoasiti temsil eder. Malat ve format dehidrogenaz ise ilk glisin yerine alanin aminoasitini içerir [38].

Lactobacillus bulgaricus'un D-LDH'ı için Histidin296, Arjinin235 ve Glutamik asit264 X-ışını kristalografisi ile aktif rezidüler olduğu tespit edilmiş ve benzer sonuçlar *Lactobacillus helveticus* ile de göstermiştir [39].

İlk iki glisin aminoasitinin nükleotid bağlanması ile ilişkili olduğu ve üçüncü glisin aminoasitinin ise β tabakasının katlanması ile ilişkili olduğu bilinmektedir [36]. *P. denti* ve bilinen diğer *Bacteroides* D-LDH' larında üçüncü glisin yerine alanin bulunmaktadır [40], [41]. Substrat bağlanma bölgelerini içeren modelleme çalışmalarında Tyr101, Asn77, Val 78 ve Gly 79'un piruvat ile etkileştikleri gösterilmiştir [37].

1.1.5 Enzim İnhibisyonu

İnhibitörler enzimatik tepkimelerin hızını yavaşlatan ya da durduran ajanlardır. Enzimatik inhibisyon, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır [42].

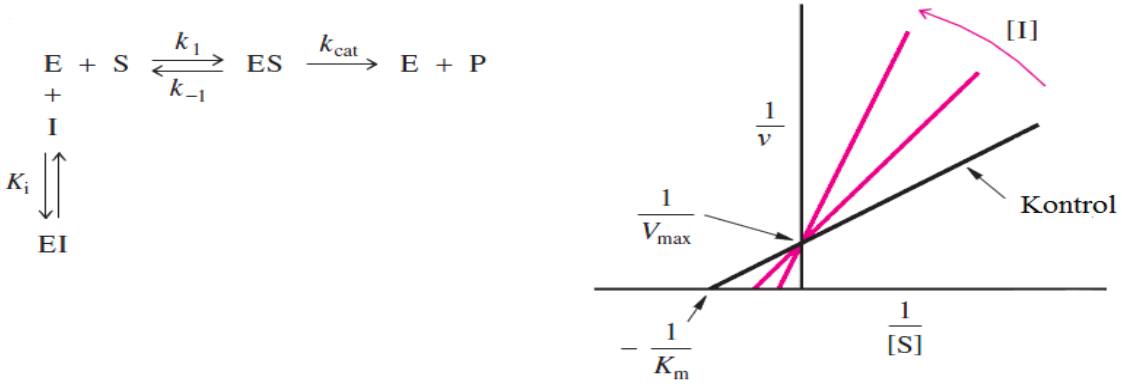
Geri dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı olarak üçe ayrılmaktadır. Yarışmalı inhibisyonda, enzimin aktif bölgesi için inhibitör ve substrat birbirleri ile yarışırlar. Yarışmalı inhibitör, yapı olarak substrata çok benzemektedir. İnhibitör enzime geri dönüşümlü olarak bağlanmıştır ve substrat derişiminin artması ile tepkime substratın enzime bağlanması yönünde ilerleyebilir [42].

Yarışmalı inhibisyonun kinetiği Michealis-Menten eşitliği ile aşağıdaki gibi ifade edilebilir [42].

$$\mathrm{V0} = \frac{Vmax \times [S]}{\alpha \times Km + [S]} \qquad (1.1)$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{Ki} \tag{1.2}$$

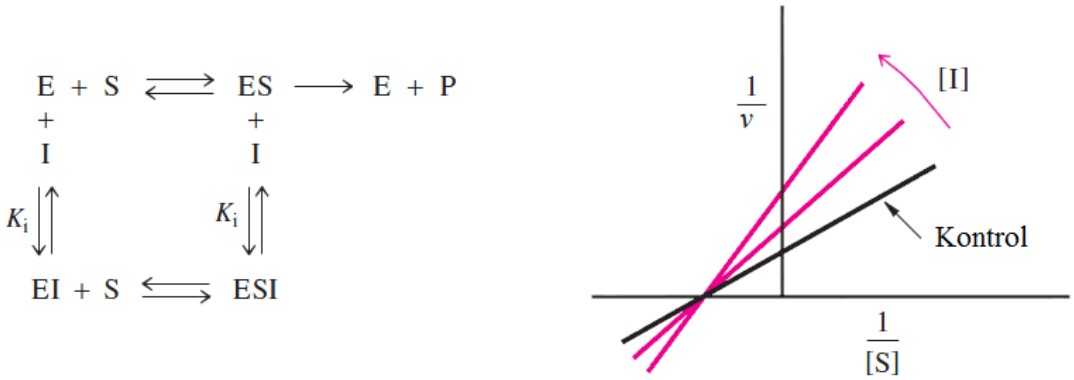
$$Ki = \frac{[E]\times[I]}{[EI]} \tag{1.3}$$



Şekil 1. 6 Yarışmalı inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi [43]

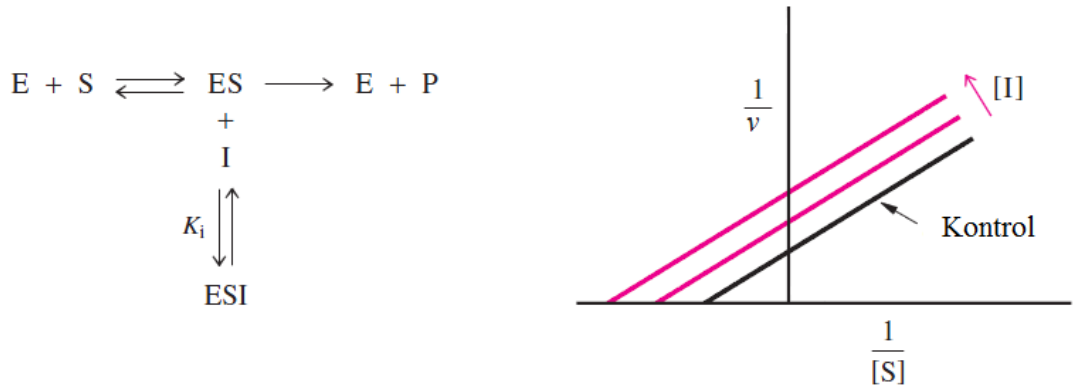
İnhibitörsüz ve iki farklı konsantrasyonda inhibitör içeren enzim reaksiyonuna ait Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 1. 6'da verilmiştir. Grafikten görülebileceği gibi İnhibitör konsantrasyonunun artırılması ile aynı V_{max} değerine fakat farklı K_m değerlerine sahip olan eğriler elde edilmiştir. Yarışmalı inhibisyonda yeterli substrat konsantrasyonu olduğunda substrat inhibitörün önüne geçeceğinden V_{max} değişmez [42].

Yarışmasız inhibisyon tipinde inhibitör enzime ya da enzim substrat kompleksine bağlanır ve aktif olmayan EI ve ESI kompleksi oluşturabilir.Substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanabilir. Yarışmasız inhibitör etkisini, enzimin katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Bu tip inhibisyonda, inhibitör ile substrat arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılması ile inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin K_m değeri sabit kalırken V_{max} değeri azalır [43].



Şekil 1. 7 Yarışmasız inhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi [43]

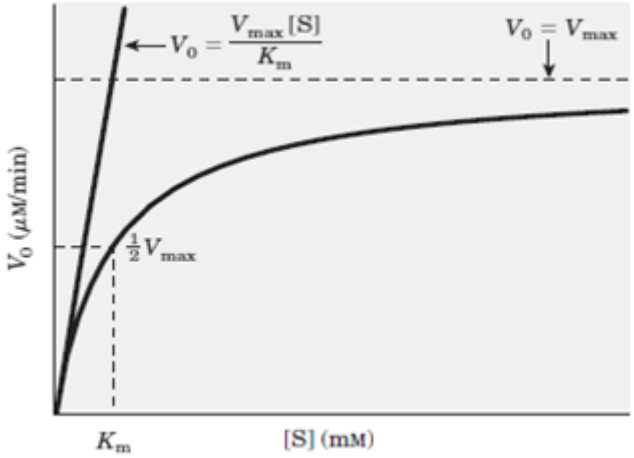
Bir başka geri dönüşümlü inhibisyon tipi ise yarı yarışmalı inhibisyondur. İnhibitör, enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır fakat serbest enzime bağlanamaz. Birden fazla substratlı enzimler için geçerliliği yüksektir. Bu inhibisyon tipinde aktif olmayan enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi oluşur ve inhibitörile V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu ile ES kompleksi ortamdan sürekli çekilir, ES kompleksinin oluşumu reaksiyon dengesini sağa kaydırır ve böylece K_m değeri azalır.



Şekil 1. 8 Yarı yarışmalıinhibisyonda inhibitörün enzime bağlanması ve Lineweaver - Burk eğrisi [43]

Geri dönüşümsüz inhibisyondaise inhibitör enzimin işlevsel kısmını bozan ya da enzim ile birleşerek kararlı yapı oluşturan bileşiklerdir. Bu grup inhibitörlerin intihar inaktivatörleri olarak bilinen türleri bulunmaktadır. Bu inhibitörler enzime spesifiktir ve enzimin aktif bölgesine bağlanana kadar reaktif değillerdir [42].

Enzimatik reaksiyonlarda belirli bir aralıktaki substrat konsantrasyonunun değişimine karşı ürün oluşum hızı eğrisi çizilmektedir [42].



Şekil 1. 9 Substrat derişimine karşı başlangıç hızının değişimi [42]

$$V_0 = \frac{Vmax \times [S]}{Km + [S]} \tag{1.4}$$

Michaelis-Menten eşitliği; başlangıç substrat derişimi [S], ilk hızı V_0 ve maksimum ilk hızı V_{max} arasındaki ilişkinin ortaya konulduğu bir ifadedir ve aradaki ilişki Michaelis-Menten (K_m) sabiti ile ilişkilendirilerek belirtilmiştir [42].

V_0' ın, V_{max}'in tam olarak yarısına eşit olduğu durumda denklem (1.5)'te verilen eşitlik ortaya çıkmaktadır.

$$\frac{Vmax}{2} = \frac{Vmax \times [S]}{K_m + [S]} \tag{1.5}$$

Denklem sadeleştirildiğinde ise;

$$K_m = [S] \tag{1.6}$$

olmaktadır. Bu durumda K_m ilk hızın (V_0), maksimum ilk hızın (V_{max}) yarısına eşit olduğu durumdaki substrat derişimidir [42].

Michaelis-Menten eşitliğindeki [S]'ye karşı V_0 grafiğinin tersi olan düz çizgi olarak çizilen 1/[S]' ye karşı $1/V_0$ grafiği, Lineweaver-Burk eşitliği olarak ifade edilir [42].

$$V_0 = \frac{Vmax \times [S]}{K_m + [S]} \tag{1.7}$$

Denklem (1.8)'de verilen Michaelis-Menten eşitliği ters çevrildiğinde;

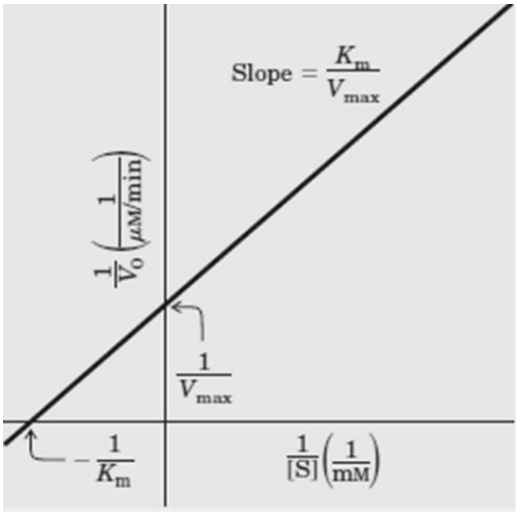
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{Vmax \times [S]} \tag{1.8}$$

eşitliğine dönüşür. Eşitlik daha iyi ifade edilecek olursa;

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{Vmax \times [S]} + \frac{1}{Vmax} \tag{1.9}$$

Olarak ifade edilir [42].

$\frac{1}{V_0}$'a karşı $\frac{1}{[S]}$ grafiği ise Lineweaver–Burk grafiğini göstermektedir.



Şekil 1.10Lineweaver–BurkGrafiği[42]

Eğim, K_m/V_{max}'ı ifade ederken eğimin $1/V_0$'ı kestiği nokta $1/V_{max}$'ı ifade etmektedir. 1/[S] ekseninin kesim noktası ise $-(1/K_m)$'dir [42].

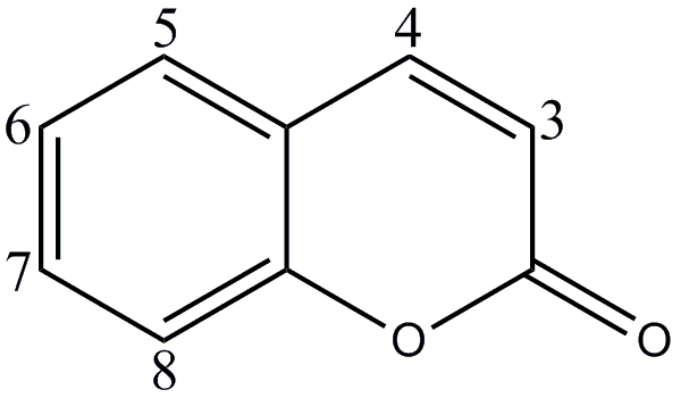
Aşağıdaki denklemde verilmiş olan [S], substrat konsantrasyonunu ifade eder ve K_i, V_{max} ve K_m ise [S]'tan bağımsız sabitlerdir. [S]'tan bağımsız sabitler olan ve K_i, V_{max} ve K_m lineer olmayan en küçük kareler yöntemi fiti ile hesaplanmakta olup K_i'nin sonsuza gitmesi durumunda Michealis-Menten denklemine dönüşmektedir [44].

$$v = \frac{Vmax \times [S]}{K_m + [S] + \frac{[S^2]}{Ki}} \quad (1.10)$$

Sabitlerin değeri ise Lineweaver–Burkgrafiği yardımıyla hesaplanmaktadır [44].

1.1.6 Kumarin ve Türevleri

Kumarinler ile ilgili çalışmalar 200'den fazla yıl önce başlamıştır ve kelime olarak kumarin, adını bileşiğin ilk olarak izole edildiği *Coumarouna odorata Aube* ağacından almaktadır[45]. Kumarinler 19. yüz yılda tonka fasülyelerinden izole edilmiştir ve bu tarihten beri yemeklerde tat veren ajanlar olarak ve parfümeride kullanılmaktadır [46]. Kumarin (2H-Chromen-2-one), doğal olarak birçok bitkide bulunan ve benzopironlar grubundan, kristal yapılı, renksiz bir kimyasal bileşiktir. Serbest olarak ya da glukoz ile beraber bulunabilirler [47].



Şekil 1. 11 Kumarinin genel yapısı [41]

Kumarinler; antikanser, antimikrobiyal, analjezik, lipid düşürücü, karaciğer koruyucu, anti-oksidan, anti-depresan, anti-inflamatuar, anti-viral, anti-diyabetik, anti-hipertensif, anti-alerjik, anti-tümör, anti-astım, anti-HIV1, anti-koagülan ve anti-fungal gibi geniş biyolojik aktivite ve etki alanına sahiptirler [45], [48], [49], [50].

Kumarinlerin enzimler üzerindeki inhibitör etkisi farklı hastalıklar için incelenmiştir. Alzheimer hastalığı öğrenme, hafıza, davranış ve duygusal tepkiler ile ilgili beyin bölgelerinde asetilkolin düzeylerinde azalma ile birlikte kolinerjik sistemin kaybı ile ilişkilidir. Nöro-patolojik olarak alzheimer hastalığı, beta-amiloid plakları, nörofibril yumakları ve dejenerasyon / bazal ön beyin kolinerjik nöronlarının atrofi varlığı ile karakterize edilir. Bu duruma göre, AH'nin semptomatik tedavisi için en ümit verici yaklaşım, öncelikli olarak hidrolizden ve eylem sonlandırılmasından sorumlu asetilkolinesteraz (AChE) enzimini inhibe ederek, beyindeki ACh sinaptik seviyeleri arttırmaktır. Farklı kumarin türevleri için IC_{50} değerleri 10, 275 ve 0.236 nM olarak bulunmuştur [50].

AIDS' e karşı direnç gelişimi, geleneksel tedavi yaklaşımları ile ilgili önemli bir sorundur. HIV replikasyonu için gerekli olan birçok noktaya direkt ajanlar ile müdahale edilmesi bu hastalığın üstesinden gelinmesi için ümit verici bir gelişmedir. HIV enzimleri arasında 3 tanesi tedavi amaçlı hedef olarak tespit edilmiştir. Bu enzimlerden ilk ikisi ters transkriptaz, proteazdır ve piyasada veya klinik denemelerde kullanılan inhibitörleri bulunmaktadır. Üçüncü enzim olan integraz, ilk iki enzim kadar ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. Son raporlar, çeşitli bileşiklerin HIV integraz üzerine olan inhibitör etkisini ortaya çıkarmıştır. Kumarinlerin HIV integraz üzerine olan inhibitör çalışmasında IC_{50} değerleri farklı kumarin türevleri için 1.5, 4.2 ve 43 µM olarak bulunmuştur [51].

1.2 Tezin Amacı

Yapıya dayandırılmış ilaç tasarımında önemli bir basamağının gerçekleştirilmesi amacıyla; 29 adet kumarin türevinden oluşan inhibitör kütüphanesinin, *B. fragilis*'in enerji metabolizmasında önemli role sahip olan ve deneysel olarak yüksek saflık ve miktarda üretilecek olan D-LDH üzerindeki etkisinin yapısal ve kinetik olarak test edilerek bu bileşiklerin öncü bileşik olma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

B. fragilis'in D-LDH'ının yüksek saflıkta üretilerek, sentezlenmiş olan kumarin türevleri ile seçici inhibisyon çalışmalarının kolon kanserine sebep olan enterotoksijenik *B.*

fragilis enfeksiyon/kolonizasyon tedavisine alternatif bir ilaç geliştirilmesi yönündeki çalışmaların önünü açacağı öngörülmektedir.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyaller

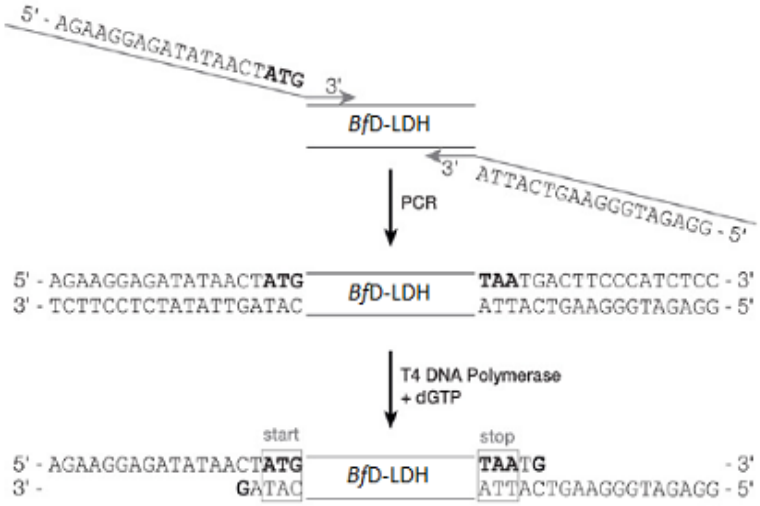
2.1.1 Kimyasallar ve Sarflar

*Bf*D-LDH'ın saflaştırılması amacıyla kullanılan nikel-nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz QIAGEN'den (Almanya) temin edilmiştir. Saflaştırılan proteinin, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile (SDS-PAGE) analizinde protein belirteci olarak Thermo Scientific (ABD) tarafından üretilen Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder kullanılmıştır.

Tez çalışması için kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH, Sigma, Promega, Roche, Aldrich ve Bacto™ firmalarından temin edilmiştir.

2.1.1.1 D-LDH Genini İçeren Rekombinant DNA Molekülü

Laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan çalışmada D-LDH'ı kodlayan geni aLICator LIC klonlama ve ekspresyon kit 3 (C terminal Histag) sistemi kullanılarak pLATE 31 vektörüne klonlanmıştır. T4 DNA polimeraz, geni vektöre transfer etmeden önce, gen üzerinde yapışkan uçlar üretmek için kullanılmıştır. T4 DNA polimeraz dNTP eklenerek5'→3' polimeraz aktivitesine ve 3'→5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. LIC reaksiyonunda bu özelliklerinden dolayı T4 DNA polimeraz kullanılmıştır [52].



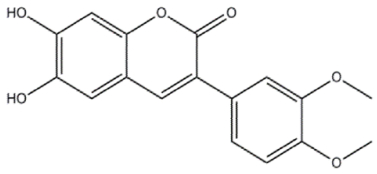
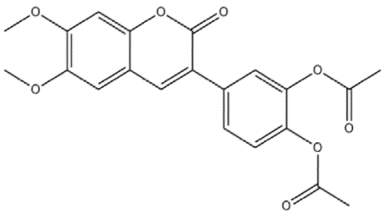
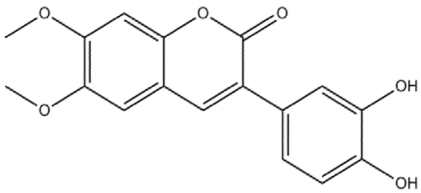
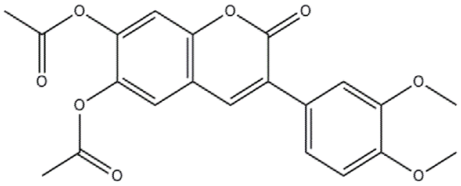
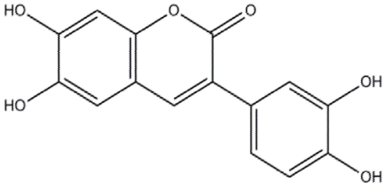
Şekil 2. 1 T4 DNA polimeraz ve dGTP ile ilgili gen üzerinde yapışkan uç üretilmesi [53]

pLATE31 ifade vektörünün iki ana özelliği bulunmaktadır. Bakteriyofaj T7 promotoru ile yüksek verimde gen ekspresyonu sağlanır ve C terminal bölgesinde bulunan 6 Histidin bölgesi ile ekspresyonu gerçekleşen proteinin kolona afinitesini sağlayarak saflaştırma işleminin gerçekleşmesine olanak verir [53].

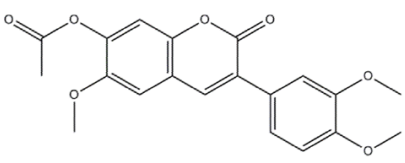
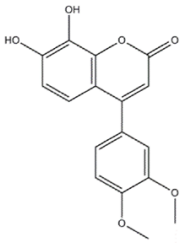
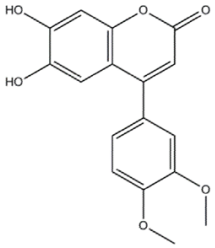
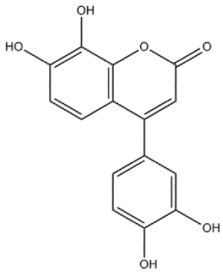
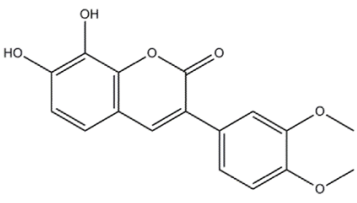
2.1.1.2 Kumarin Türevleri

Çalışmamızda kullanılan kumarin türevleri Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya ve Organik Kimya Anabilim Dallarında sentezlenmiş ve yapıları Çizelge 2. 1'de verilmiştir [54], [55].

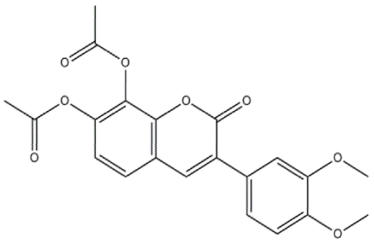
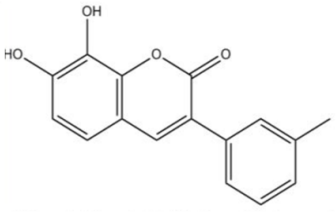
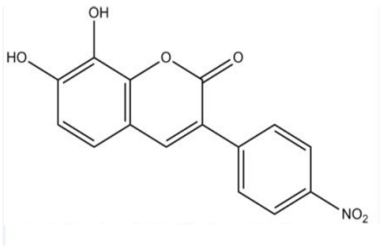
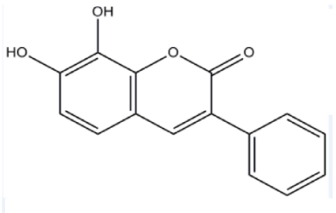
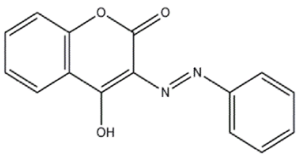
Çizelge 2. 1 Kumarin bileşiklerinin adlandırılması ve kimyasal formülleri

Kumarin Bileşikleri	
Numarası	Formülü
K1	 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K2	 3-(3,4-diacetoxyphenyl)-6,7-dimethoxy-2H-chromen-2-one
K3	 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dimethoxy-2H-chromen-2-one
K4	 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-diacetoxy-2H-chromen-2-one
K5	 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one

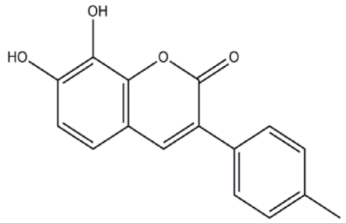
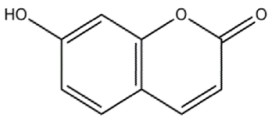
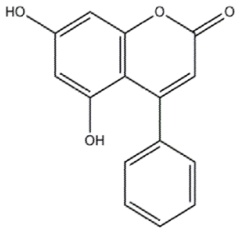
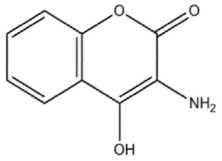
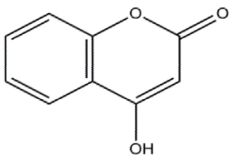
Çizelge 2. 1 Kumarin bileşiklerinin adlandırılması ve kimyasal formülleri (devamı)

Kumarin Bileşikleri	
Numarası	Formülü
K6	 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methoxy-7-acetoxy-2H-chromen-2-one
K7	 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K8	 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K9	 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K10	 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one

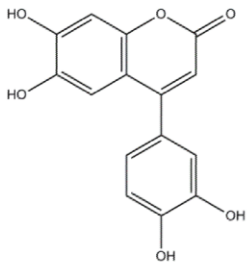
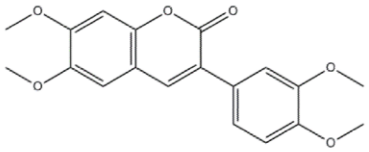
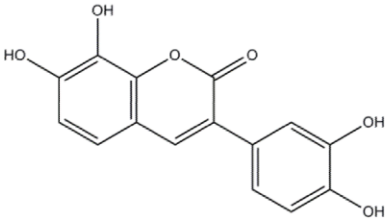
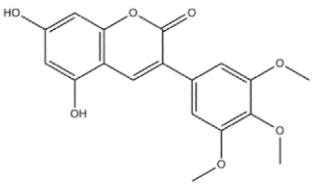
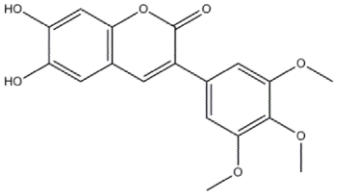
Çizelge 2. 1 Kumarin bileşiklerinin adlandırılması ve kimyasal formülleri (devamı)

Kumarin Bileşikleri	
Numarası	Formülü
K11	 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-7,8-diacetoxy-2H-chromen-2-one
K12	 3-(3-methylphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K13	 3-(4-nitrophenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K14	 3-phenyl-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K15	 3-(phenyldiazenyl)-4-hydroxy-2H-chromen-2-one

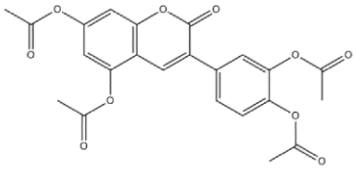
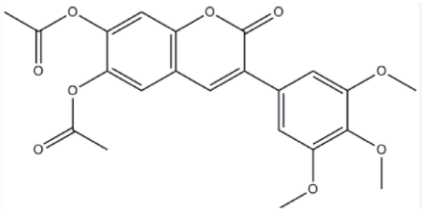
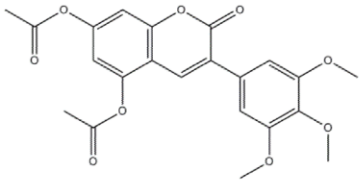
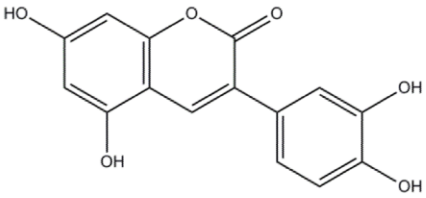
Çizelge 2. 1 Kumarin bileşiklerinin adlandırılması ve kimyasal formülleri (devamı)

Kumarin Bileşikleri	
Numarası	Formülü
K16	 3-(4-methylphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K17	 7-hydroxy-2H-chromen-2-one
K18	 4-phenyl-5,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K19	 3-amino-4-hydroxy-2H-chromen-2-one
K20	 4-hydroxy-2H-chromen-2-one

Çizelge 2. 1 Kumarin bileşiklerinin adlandırılması ve kimyasal formülleri (devamı)

Kumarin Bileşikleri	
Numarası	Formülü
K21	 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K22	 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-dimethoxy-2H-chromen-2-one
K23	 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,8-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K24	 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one
K25	 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one

Çizelge 2. 1 Kumarin bileşiklerinin adlandırılması ve kimyasal formülleri (devamı)

Kumarin Bileşikleri	
Numarası	Formülü
K26	 3-(3,4-diacetoxyphenyl)-5,7-diacetoxy-2H-chromen-2-one
K27	 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-6,7-diacetoxy-2H-chromen-2-one
K28	 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,7-diacetoxy-2H-chromen-2-one
K29	 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one

2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Su Banyosu- Kerman

Çalkalamalı İnkübatör- GFL

pH Metre- CyberScan

Ultrasonikasyon- Bandelin

Etüv- Binder

Hassas Terazi- Ohaus

Buz Makinası- Optic Ivymen System

Distile Su Cihazı- GFL

Otoklav- Systec

-20 °C Buzdolabı- Beko

+4 °C Buzdolabı- Beko

-80°C Buzdolabı- Heto

Kabin

Mikrosantrifüj- Sigma

Soğutmalı Santrifüj- Sigma

UV Visible Spektrofotometre- Thermo Scientific

Vorteks- Heidolph

Manyetik Karıştırıcı- Heidolph

Çalkalayıcı – Labn

Mikroplate Spektrofotometre–Epoch

Kuru Blok Isıtıcı – Inovia

Çok Kanallı Mikropipet – Rainin

2.1.3 Besiyerleri, Stok Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.3.1 Protein Saflaştırma İçin Kullanılan Besiyerleri, Stok Çözeltiler ve Tamponlar

2xYT Agar

Çizelge 2. 2 2xYT Agar bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
Bacto Yeast Ekstraktı	10 g/L
Bacto Tripton	16 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

1L distile su içerisinde bileşenler belirtilen miktarlarda çözülür ve otoklav ile sterilize edilir.

2xYT Broth

Çizelge 2. 3 2xYT Broth

Bileşenler	Miktarlar
Bacto Yeast Ekstraktı	10 g/L
Bacto Tripton	16 g/L
NaCl	5 g/L

Bileşenler 100 mL distile su içerisinde çözülür. 121 °C'de otoklav ile sterilize edilir.

Ampisilin (100 mg/mL)

Stok ampisilin 0,1 g üzerine 1 L'ye tamamlanacak şekilde distile su ilave edilir ve filtre ile sterilize edilir.

IPTG (İzopropil-β -D- tiyogaltopiranosid)

250 mM 1 mL stok IPTG için 0,06 g IPTG tartılır ve distile su ile 1 mL'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir. Hazırlanan tampon -20 °C'de saklanır.

Akrilamid/Bis Çalışma Çözeltisi (% 30)

Çizelge 2. 4 % 30 Akrilamid/Bis çalışma çözeltisi bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
Akrilamid	8,7 g
N, N'-Metilen-Bis-Akrilamid	0,3 g

Bileşenler 30 mL distile su içerisinde çözülür.

Amonyum Persülfat Çözeltisi (% 10)

0,03g amonyum persülfat 0,3 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanmaktadır.

SDS-PAGE Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB) (10 mL)

Çizelge 2. 5 SDS-PAGE örnek uygulama tamponu bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
% 10 SDS	1 g
0.5 M Tris HCl (pH: 6.8)	0.6 g
% 5 Gliserol	0.5 mL
% 25 β-Merkaptoetanol	0.25 mL
% 0.05 Bromfenol mavisi	0.005 g

10 mL'lik tampon için belirtilen miktarlardaki bileşenler bir araya getirilerek hazır hale getirilir.

SDS-PAGE Ayırma Jeli (%12)

Çizelge 2. 6 SDS-PAGE ayırma jeli bileşenleri

Bileşenler	**Miktarlar**
dH_2O	3,35 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
%10 SDS	0,100 mL
%30 Akrilamid/Bis	4 mL
% 10 Amonyum Persülfat	0,075 mL
TEMED	0,015 mL

Bileşenler verilen miktarlarda bir araya getirilerek hazırlanır.

SDS-PAGE Yükleme Jeli (%4)

Çizelge 2. 7 SDS-PAGE yükleme jeli bileşenleri

Bileşenler	**Miktarlar**
dH_2O	3,05 mL
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 mL
%10 SDS	0,050 mL
%30 Akrilamid/Bis	0,65 mL
% 10 Amonyum Persülfat	0,030 mL
TEMED	0,006 mL

Bileşenler verilen miktarlarda bir araya getirilerek hazırlanır. Daha sonra ayırma jeli üzerine ilave edilerek jelin donması beklenir ve kullanıma hazır hale getirilir.

5X SDS-PAGE Tank Tamponu

Çizelge 2. 8 5X SDS-PAGE tank tamponu bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
0,025 M Trizma Base	15 g/L
0,192 M Glisin	72 g/L
% 0,5 SDS	5 g/L

Bileşenler 1L distile su içerisinde çözülerek çalışma tampon hazırlanır.

Protein Boyama Çözeltisi

Çizelge 2. 9 Protein boyama çözeltisi bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
% 0,1 Coomassie Brillant Mavisi	0.1 g
% 10 Glasiyal Asetik Asit	10 mL
% 40 Metanol	40 mL
Distile su	50 mL

50 mL distile su içerisinde bileşenlerin belirtilen miktarları bir araya getirilip çözülerek çözelti hazır hale getirilmiştir.

Boya Uzaklaştırıcı Çözelti

Çizelge 2. 10 Boya uzaklaştırıcı çözelti bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
%5 Metanol	50 mL
%7 Asetik asit	70 mL

Bileşenler 1L distile su içerisinde çözülerek hazırlanır. Boya uzaklaştırıcı çözeltisi ile muamele edilen örnekler aktif karbon ile muamele edilir ve Coomassie Brillant mavisinin çökeltilmesi sağlanır. Hazırlanan çözelti, filtre kağıdı ya da peçete ile süzülerek yeniden kullanılabilir.

Liziz Tamponu (1 L) (pH : 8.0)

Çizelge 2. 11 Liziz tamponu bileşenleri

Bileşenler	**Miktarlar**
50 mM NaH_2PO_4	6,90 g NaH_2PO_4 (MW 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
10 mM imidazol	0,68 g imidazol (MW 68,08 g/mol)

Bileşenler 1L distile su içerisinde çözülerek hazırlanır. pH ayarlaması NaOH kullanılarak yapılır.

Yıkama Tamponu (1 L) (pH : 8.0)

Çizelge 2. 12 Yıkama tamponu bileşenleri

Bileşenler	**Miktarlar**
50 mM NaH_2PO_4	6,90 g NaH_2PO_4 (MW 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
20 mM imidazol	1,36 g imidazol (MW 68,08 g/mol)

Bileşenler 1L distile su içerisinde çözülerek hazırlanır. pH ayarlaması NaOH kullanılarak yapılır.

Elüsyon Tamponu (1 L) (pH : 8.0)

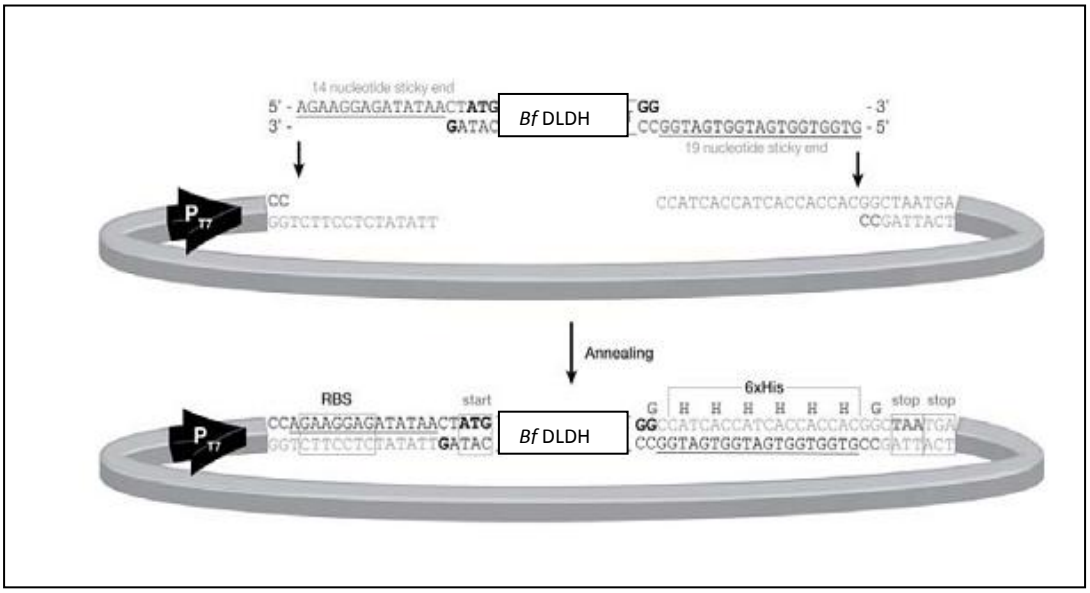
Çizelge 2. 13 Elüsyon tamponu bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
50 mM NaH_2PO_4	6,90 g NaH_2PO_4 (MW 137,99 g/mol)
300 mM NaCl	17,54 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
250 mM imidazol	17 g imidazol (MW 68,08 g/mol)

Bileşenler 1L distile su içerisinde çözülerek hazırlanır. pH ayarlaması NaOH kullanılarak yapılır.

pLATE31 İfade Vektörü

pLATE31 ifade vektörü, C terminal bölgesinde 6 Histidin içerir ve ekspresyonu gerçekleşen proteinin kolona afinitesini sağlayarak saflaştırma işleminin gerçekleşmesine olanak verir. Şekil 2. 2'de belirtilen vektör üzerinde yapışkan uç bölgeleri ile *B. fragilis* D-Laktat dehidrogenazı kodlayan *Bf*D-LDH geninin vektöre ligasyonu sağlanır ve T7 promotör bölgesi, IPTG indüklemesini sağlayarak mRNA üretimi gerçekleştirir [53].



Şekil 2. 2 pLATE 31 İfade Vektörü [53]

2.1.3.2 Enzim İnhibisyonu Çalışması İçin Gereken Çözeltilerve Tamponlar

Potasyum Hidroksit (KOH) 1 M

56.11 g potasyum hidroksit tartılır ve distile su ile 1L'ye tamamlanarak kullanıma hazır hale getirilir.

Potasyum Fosfat Tamponu (KH_2PO_4) (pH: 7.5) 100 mM

13.61 g potasyum fosfat tartılır ve üzerine 1L'ye tamamlanacak şekilde distile su ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilir.

Dimetil Sülfoksit (C_2H_6OS) 78.13 g/mol

A3006 katalog numaralı DMSO, Panreac AppliChem firmasından temin edilmiştir.

Piruvat (20 mM)

0.0110 g piruvat tartılır ve 5 mL distile su içerisinde çözülür.

NADH (11 mM)

0.0390 g NADH tartılır ve 5 mL distile su içerisinde çözülür.

2.2 Yöntem

2.2.1 Protein Saflaştırma ve Analizi ile İlgili Yöntemler

2.2.1.1 Rekombinant DNA Molekülüne Sahip Hücrelerin Geliştirilmesi

Bileşenleri 2.1.3 bölümünde verilen 2xYT Agar besiyeri petrilere dökülmüş ve ateş başında donması beklendikten sonra -80 °C derin dondurucu içinde *Bf*D-LDH genini içeren pLATE31 ifade vektörünün bulunduğu *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri 2xYT Agar petrilere sürme ekimi yapılmıştır. 37 °C'de 16 saat inkübe edildikten sonra

otoklavlanmış kürdan yardımı ile tek koloni seçimi yapılır ve *E. coli* hücreleri ampisilin içeren 5 mL'lik 2xYT Broth besiyerinde geliştirilmeye bırakılır.

2.2.1.2 Saflaştırma

Laboratuvar grubumuz tarafından daha önce yapılmış olan çalışmada 1011 baz çifti uzunluğundaki *B. fragilis*'in D-LDH'ını kodlayan geni pGEM®-T easy vektörüne klonlanmıştır.

Protein saflaştırma öncesinde ekspresyon için 100 mL 2xYT besiyeri 100 µl ampisilin eklenerek hazırlanmıştır. Bu besiyerine 1 mL *Bf*D-LDH'ı kodlayan geni içeren *E.coli BL21(DE3)* hücreleri ekilmiştir. 600 nm'de OD değeri 0,6 olana kadar 37 °C'de 180 devirde inkübe edilmiştir. Son konsantrasyon 0,1 mM olacak şekilde IPTG indüklemesi yapılmıştır ve 30 °C'de dakikada 180 devir ile 5 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen hücre kültürü 4 °C'de 5000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atılmıştır ve hücre pelletleri 3 mL liziz tamponunda çözdürülmüştür. Hazırlanan pelletlerin 3 adet 1.5 mL'lik steril tüplere bölünmüş ve %20'lik güç kullanılarak 10 ssonikasyon 10 sbekleme olacak şekilde 6 döngülük ultrasonikasyonu yapılmıştır. Ultrasonikasyon yapıldıktan sonra; 14000 rpm'de 4 °C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Bu aşamada süpernantlar alınmıştır [56], [57].

Elde edilen yaklaşık 4 mL hücre lizatı, 1 mL nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz ile 1 saat boyunca 4 °C'de 120 rpm'de karıştırılmıştır. Bu sırada kolon hazırlaması için, 5 mL'lik şırınga alınarak alt yüzeyine kurutma kağıdı konulmuştur ve 2 mL çizgisine kadar cam yünü eklenmiştir. Uç kısmına tubing geçirilerek kolon hazırlanmıştır. Hücre lizatı ve Ni-NTA agaroz karışımı kolona yüklenmiştir. İlk süzüntü fraksiyonu toplanmıştır. Kolon 8 mL yıkama tamponu ile yıkanmıştır ve yıkama fraksiyonları (W_1, W_2, W_3) toplanmıştır. Son olarak 4 mL elüsyon tamponu kullanılarak elüsyon fraksiyonları toplanmıştır [58]. Toplanan örneklerin her birinden 50 µl alınarak aynı miktar SDS-PAGE örnek uygulama tamponu SDS-PAGE için hazırlanmıştır.

2.2.1.3 Enzim aktivite tayini

D-LDH'ın aktivite tayininde 340 nm'de UNICAM UV/Vis spektrometresi kullanılarak NADH'ın $NAD^{+'}$a çevrilmesi ölçülmüştür. Reaksiyon hacmi 1 mL ve reaksiyon süresi 1 dakika kabul edilmiştir. Reaksiyon 25°C'de 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (pH: 7.5). Piruvat bir substrat ve β-NADH kofaktör olarak kullanılmıştır. Tampon ve NADH, enzim ile birlikte 1 mL tek kullanımlık küvette önceden karıştırılmış ve reaksiyon piruvat ilavesiyle başlatılmıştır.

Saflaştırılan enzim konsantrasyon hesaplaması ise;

$$mg/ml = (\Delta A_{280}/dk) \times Dilüsyon \times Mw /((\varepsilon_{LDH}) \quad (2.1)$$

denklemi ile yapılmıştır.

ΔA_{280}; 1 mL reaksiyonda kullanılan 20 µl elüsyon, 980 µl dH2O içinde çözülerek A_{280} nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri, dilüsyon faktörü; seyreltme faktörü, MW; enzimin molekül ağırlığı ve $\varepsilon_{LDH;}$ enzimin aminoasit dizisinin web tabanlı bir program olan 'Peptide Property Calculator' yardımı ile elde edilen sonuçtur.

2.2.1.4 SDS PAGE

SDS-PAGE analizleri BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak hazırlanmıştır. SDS-PAGE hazırlama aşamalarında kullanılan %12'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli bileşenleri 2. 1. 3 bölümünde verilmiştir. Dikey jel sisteminde %12'lik ayırma jeli altta bulunurken %4'lük yükleme jeli ise üstte bulunmaktadır [59].

2.2.2 Enzim Aktivitesi ve İnhibisyon Çalışmaları

2.2.2.1 Enzim Aktivitesi ve Konsantrasyonunun Tayini

Enzim aktivitesinin tayini spektrofotometrik olarak 340 nm dalga boyunda Biotek Epoch UV Plaka Okuyucu (BioTek, Winooski, ABD) kullanılarak tayin edilmiştir. 96 kuyucuklu plakalarda 184.9 µl tampon çözelti (100mM potasyum fosfat, pH 7.5), 3.7 µl

NADH (0,2 mM), 2 µl dimetil sülfoksit (DMSO, %1) ve 2 µl enzim (son konsantrasyon10,3 µg/mL) ile 25 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyulara 7.4 µL, farklı konsantrasyonlardaki (son konsantrasyon 0.046-0.739 mM olacak şekilde) piruvat (substrat) çözeltilerinden eklenmiş ve 340 nm dalga boyunda, iki dakika boyunca 10s aralıklarla absorbans ölçümü yapılmıştır. Tüm denemeler en az 3 kez tekrarlanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Ltd.,La Jalla, USA) programında enzim kinetiği modülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Çalışmada kullanılan enzimin konsantrasyonu ise Bradford yöntemi ile hesaplanmıştır [60].

2.2.2.2 Kumarin Türevleri ile İnhibisyon Çalışmaları

Kumarin türevleri ile yapılan inhibisyon çalışmalarında, kumarin türevleri DMSO içinde çözülmüş ve çalışma ortamında DMSO içeriği en fazla % 1 olacak şekilde seyreltilmiştir. 96 kuyucuk içeren plakalarda; 184.9 µl tampon çözelti (100mM potasyum fosfat, pH 7.5), 3.7 µl NADH (0,2 mM), 2 µl inhibitör (DMSO içinde çözünmüş farklı konsantrasyonlarda 29 adet kumarin türevi) ve 2 µl enzim(son konsantrasyon10.3 µg/mL)ile 25 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyulara 7.4 µL piruvat çözeltisi (son konsantrasyon 0.739 mM)eklenmiş ve 340 nm dalga boyunda, iki dakika boyunca 10 s aralıklarla absorbans ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol olarak, 2 µL kumarin örnek çözeltisi yerine 2 µL DMSO (çözelti içindeki son konsantrasyon %1) eklenerek absorbans ölçümü yapılmıştır. Enzimatik olmayan reaksiyonların varlığını tayin etmek için reaksiyon koşullarında enzim yerine tampon kullanılarak ölçüm alınmıştır. Bu çalışmalar sonunda %20 ile %80 oranında inhibisyon veren 4 kumarin konsantrasyonu belirlenmiştir.

% enzim inhibisyonu aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\Delta A_{340} \text{ kontrol} - \Delta A_{340} \text{ örnek}) / \Delta A_{340} \text{ kontrol}] \times 100 \qquad (2.2)$$

Denklemde verilen;

ΔA_{340} kontrol: Kontrol çözeltisinin 340 nm'de okunan absorbans değerini,

ΔA_{340} örnek: Örnek çözeltisinin 340 nm'de okunan absorbans değerini vermektedir.

*Bf*D-LDH'ın IC_{50} değeri (enzimin %50 inhibe etmek için gerekli olan inhibitör konsantrasyonu); en az dört farklı inhibitör konsantrasyonunun $\log_{10}$ değeri ile bunlara karşılık gelen yüzde inhibisyon değerlerinin lineer olmayan regresyon analizleri ile GraphPad Prism 5.0 yazılımı (GraphPad Software Ltd., La Jalla, ABD) programı kullanılarak belirlenmiştir. Düşük düzeyde inhibisyon gösteren bileşiklerin IC_{50} değerleri hesaplanmamış, bunun yerine çalışılan en yüksek konsantrasyondaki (50 µM) inhibisyon değerleri verilmiştir.

2.2.2.3 K5, K21 ve K23 Kumarin Türevleri ile İnhibisyon Mekanizması Çalışmaları

Kumarin türevlerinin inhibisyon mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla gerçekleştirilen tarama çalışmaları sonunda en iyi inhibisyonu veren K5, K21 ve K23 kumarin türevlerinin farklı konsantrasyonlarına karşı 0.046 ile 0.739 mM piruvat konsantrasyonları değişimleri incelenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakalarda 184.9 µl tampon çözelti (100mM potasyum fosfat, pH 7.5), 3.7 µl NADH (0,2 mM), 2 µl farklı konsantrasyonlarda kumarin çözeltileri (DMSO içinde, %1) ve 2 µl enzim (son konsantrasyon10.3 µg/mL)) ile 25 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyulara 7.4 µL farklı konsantrasyonlardaki (son konsantrasyon 0.046-0.739 mM olacak şekilde) piruvat çözeltilerinden eklenmiş ve 340 nm dalga boyunda, iki dakika boyunca 10s aralıklarla absorbans ölçümü yapılmıştır. K_m ve V_{max} değerleri GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Ltd.,La Jalla, USA) programında enzim kinetiği modülü kullanılarak belirlenmiştir.Ki değeri yine GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Ltd., La Jalla, USA) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.2.4 Kumarin türevlerinin Lipinski'nin Beş Kuralına Uygunluklarının Araştırılması

Bu tez çalışmasında kullanılan kumarin türevlerinin ilaç ham maddesi olarak kullanılabilirliğini ölçmek için, Lipinski'nin beş kuralına uygunlukları araştırılmıştır. Buna göre bir bileşiğin *in vivo* etken madde olarak kullanılabilmesi için bileşiğin molekül ağırlığı 500 Da veya daha az olmalıdır. Hidrojen bağı donörlerinin sayısı en fazla 5

olmalıdır. Hidrojen bağı alıcılarının sayısı en fazla 10 olmalıdır. Bileşiğin hesaplanan log P (oktanol- su ayrılım katsayısı) değeri ortalama -1 ile +5 arasında olmalıdır [61].

2.2.2.5 Kumarin Bileşikleri Kullanılarak *Bf*D-LDH Üzerinde Moleküler Docking Çalışmasının Yapılması

Bilgisayar destekli çalışmalarda daha önce moleküler modeli yapılmış *Bf*D-LDH [52] proteinin 3-boyutlu yapısı kullanılmıştır. Ligandların 2-boyutları yapıları ChemDraw v10 programında çizilmiş ve MarvinSketch v6.2 programı ile 3-boyutlu ve en düşük enerjili konformasyonları hazırlanıp MOL2 dosya formatında kaydedilmiştir. Bütün moleküler yerleştirme (docking) çalışmalarında Molegro Virtula Docker 2010.4.2.0 programıkullanılmış ve Molegro Molecular Viewer 2012.2.5.0 ile görüntülenmiştir [62]. Docking çalışması MolDock SE (Simplex Evolution) algoritması ve Moldock Score fonksiyonu kullanılarak, her bir ligand için 10 koşturma yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Moldock Score fonksiyonu; Protein-ligand arasındaki ve ligandın kendi iç enerjisinin toplamı şeklinde ifade edilmektedir.

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \qquad (2.3)$$

Protein-ligand etkileşim enerjisi; protein ve ligand arasındaki, H bağı, elektrostatik enerji (Coloum potansiyeli) ve Sterik etkileşimer (van der Waals)'in toplamı şeklinde ifade edilmektedir.

$$E_{\text{inter}} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{protein}} \left[E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4 r_{ij}^{\,2}} \right] \qquad (2.4)$$

Ligandın kendi iç enerjisi ise; ligand içi H bağı, Sterik etkileşimer (van der Waals) ve ligand atomik bağlarının torsion enerjilerinin toplamı şeklinde ifade edilmektedir [62].

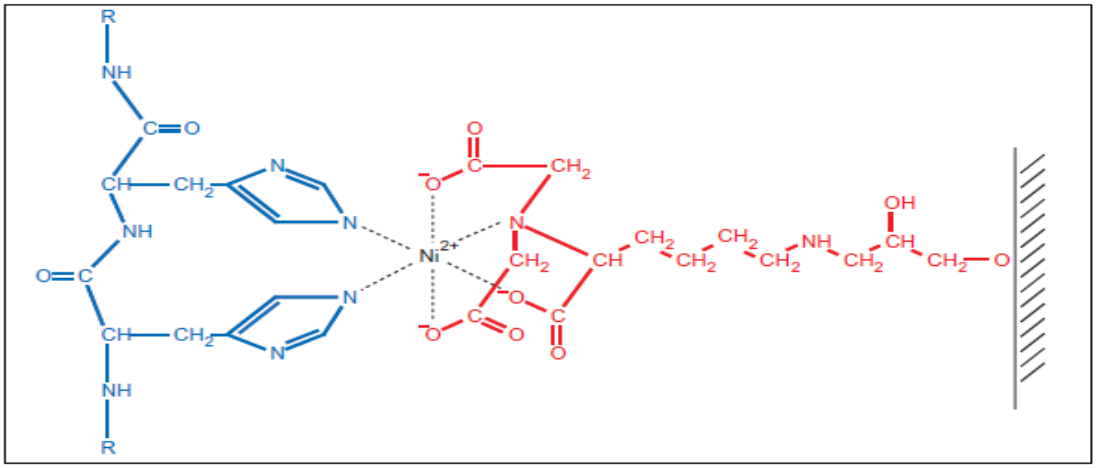
$$E_{\text{intra}} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{ligand}} E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexible bonds}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{\text{clash}} \qquad (2.5)$$

BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Enzimin Saflaştırılması ve SDS-PAGE Analiz Sonuçları

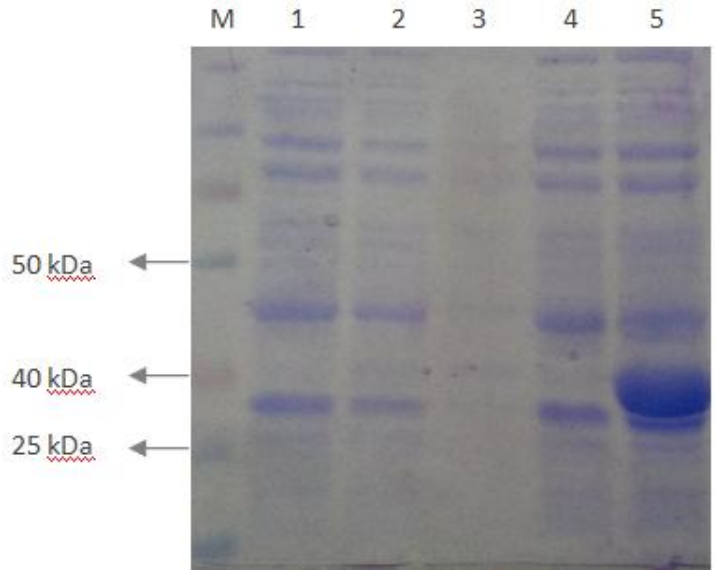
Metal şelat afinite kromatografisi, polihistidin içeren rekombinant proteinlerin saflaştırılması için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz afinite kromotografisinde kullanılan bir dolgu maddesi olup nikel iyonunun 6 adet ligand bağlanma bölgesinden dört tanesi ile bağ yapmaktadır. Geriye kalan 2 adet bağlanma bölgesi ise yüksek afinite ile 6-His tag bölgesiyle etkileşime girmektedir [58].



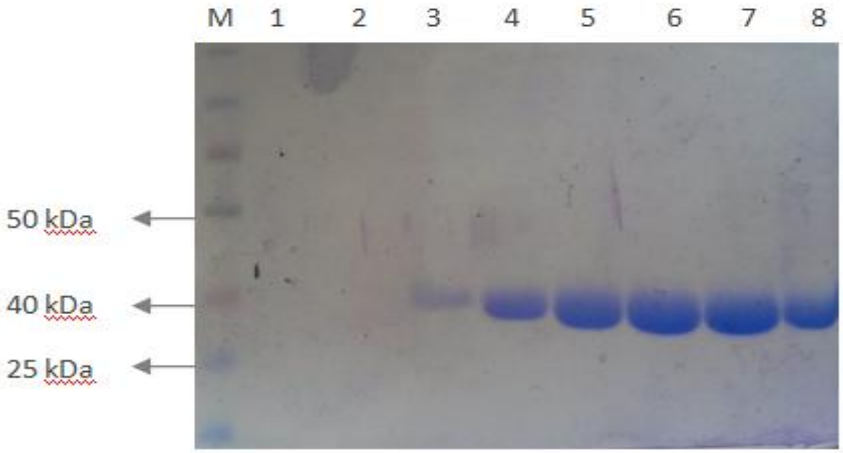
Şekil 3. 1 Ni-NTA ve 6 His tag arasındaki etkileşim [58]

*B. fragilis'*in D-LDH'ını kodlayan genin *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri içerisinde, pLATE31 vektöründe ifade edilen rekombinant proteinin C terminal ucuna eklenmiş olan C-

terminal 6 His-tag bölgesi ile bu sistem içerisinde yüksek saflıkta saflaştırılması gerçekleştirilmektedir. Yıkama tamponu içerisinde bulunan 20 mM imidazol ile spesifik olmayan proteinlerin uzaklaştırılması sağlanır. Daha sonra elüsyon tamponu içerisinde bulunan 250 mM imidazol ile Ni-NTA ile etkileşimde olan protein kolondan uzaklaştırılır ve % 95 üzeri saflıkta elde edilir.



Şekil 3. 2 Saflaştırılan D-LDH'ın elüsyon dışındaki fraksiyonların SDS-PAGE analiz sonucu Hat M: Protein Markır, hat 1-3: Yıkama fraksiyonu 1, Yıkama fraksiyonu 2 ve Yıkama fraksiyonu 3, hat 4: İlk fraksiyon, hat 5: Hücre lizatı.



Şekil 3. 3 Saflaştırılan D-LDH'ın elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analiz sonucu Hat M: Protein Markır, hat 1-8: Elüsyon 1, Elüsyon 2, Elüsyon 3, Elüsyon 4, Elüsyon 5, Elüsyon 6, Elüsyon 7, Elüsyon 8

Saflaştırma işleminden sonra SDS-PAGE analiz sonuçları Şekil 3. 2 hat 5'te gösterildiği gibi 37.6 kDa büyüklüğünde bir bant vermiştir. Yıkama işlemleri sırasında çok az

miktarda *Bf*D-LDH kaybı olmuştur. Fakat elüsyon fraksiyonlarında oldukça yoğun miktarda ve yüksek saflıkta protein elde edilmiştir (Şekil 3. 3).

Saflaştırılan enzim konsantrasyonu;

$mg/ml = (\Delta A_{280}/dk) \times Dilüsyon \times Mw / ((\varepsilon_{LDH})$ (3.1)

mg/ml =(0.087)x50x37647/26530

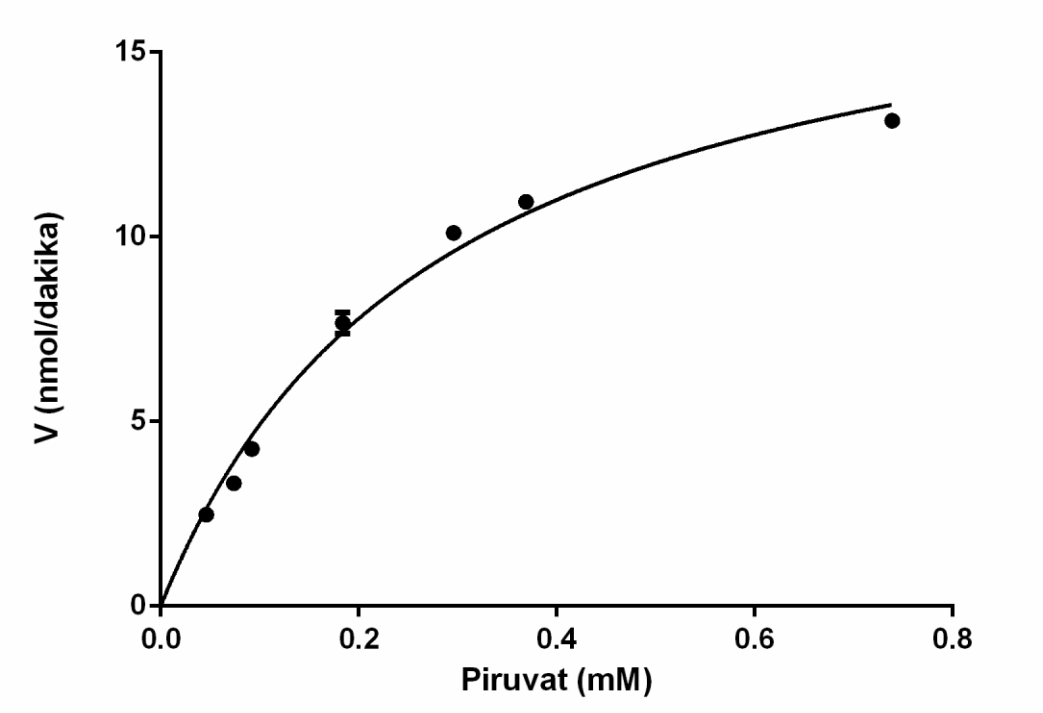
=6.1728 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.2 Kumarin Türevlerinin İnhibitör Etkinliğinin Saf *Bf*D-LDH Kullanılarak Taranması

B. fragilis'in D-Laktat Dehidrogenaz' ının %95 üzeri saflıkta elde edilmesinden sonra kumarin türevlerinin inhibitör etkinliği enzim üzerinde denenmiştir.

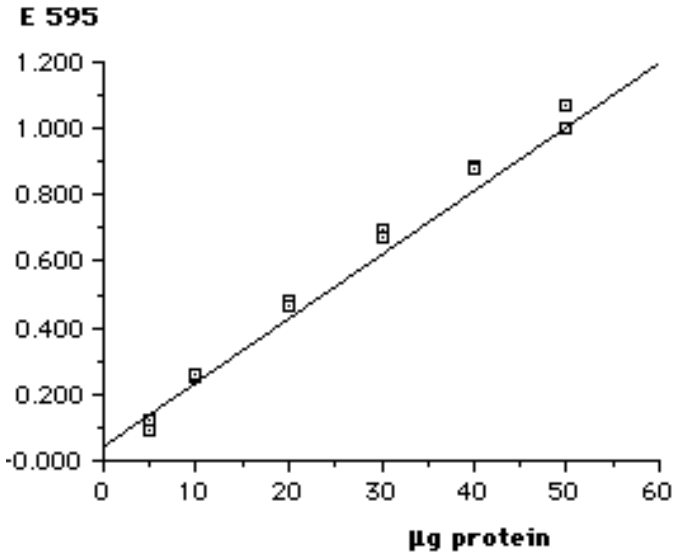
3.2.1 Enzim Aktivitesi

Enzim aktivitesi tayin edilmiş ve Michaelis-Menten grafiği Şekil 3. 4'te gösterildiği gibi elde edilmiştir. K_m değeri0,28 mM, V_{max} değeri 18,76 nmol/dakika olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 4 Michealis-Menten grafiği

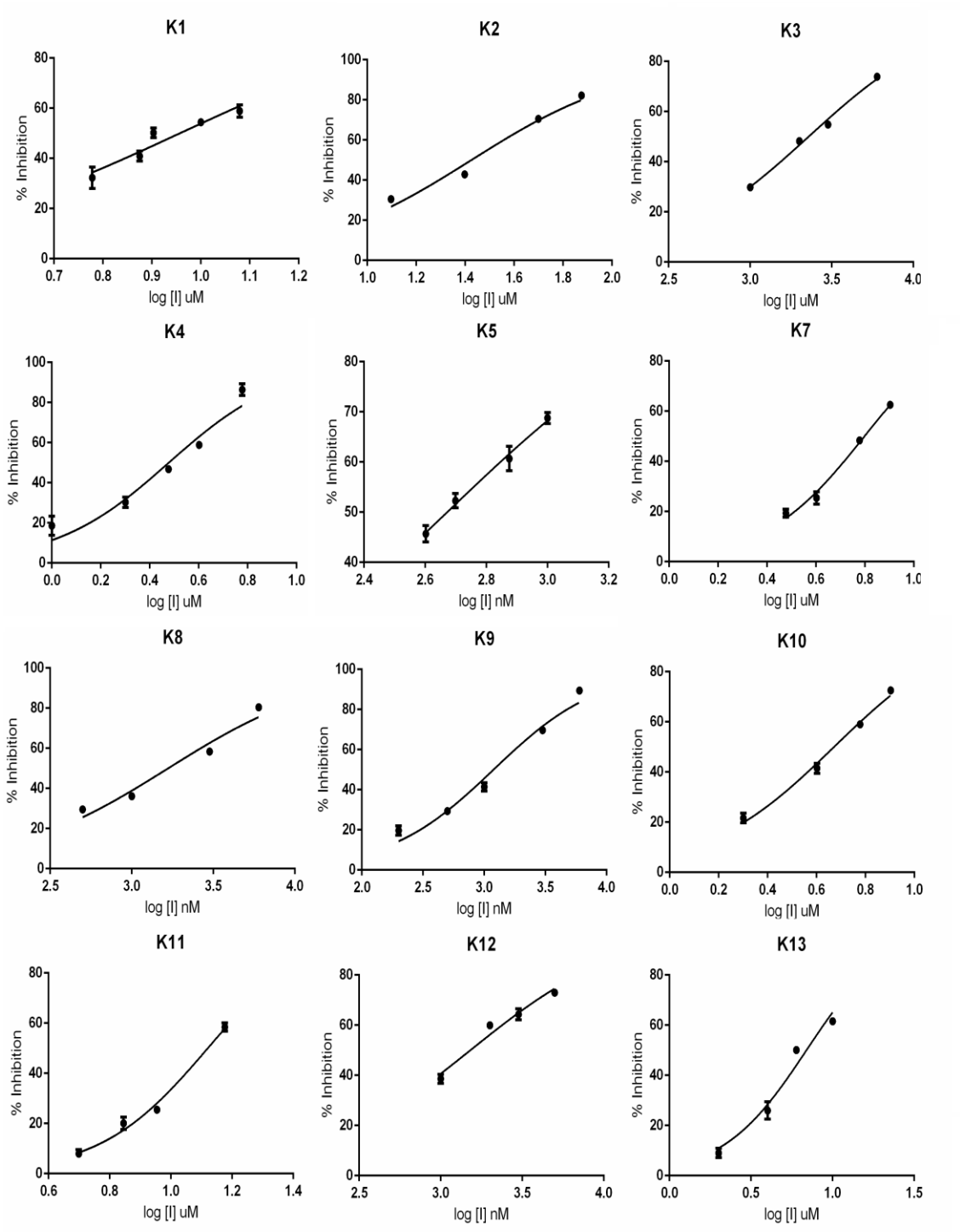
Bradford yöntemi kullanılarak saflaştırılmış olan enzimin protein konsantrasyonu 0.74 mg/mL olarak hesaplanmıştır.



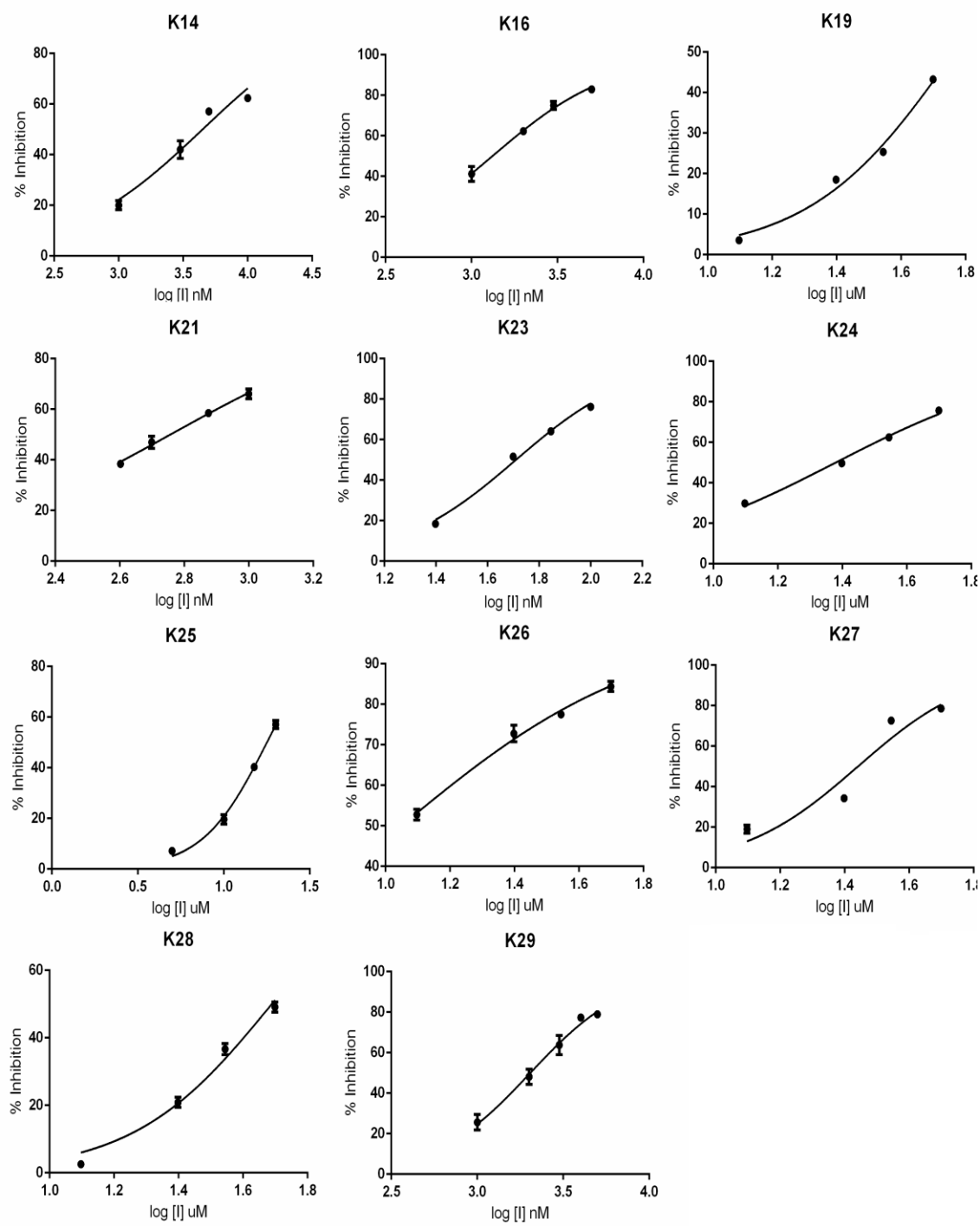
Şekil 3. 5 Bradford standart eğrisi [63]

3.2.2 Kumarin Türevleri ile İnhibisyon Çalışmaları

D-LDH'ın kumarin türevleri ile yapılan inhibisyon tayini Bölüm 2. 2. 2. 3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3. 6'da 23 adet kumarin türevinin yüzde inhibisyon grafikleri verilmiştir.



Şekil 3. 6 Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri



Şekil 3. 6 Kumarin türevlerinin % inhibisyon grafikleri (devamı)

Şekil 3. 6'da verilen grafikler ile kumarin türevlerinin *Bf*D-LDH'ın yüzde ellisini inhibe eden konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3. 1'de verilmiştir.

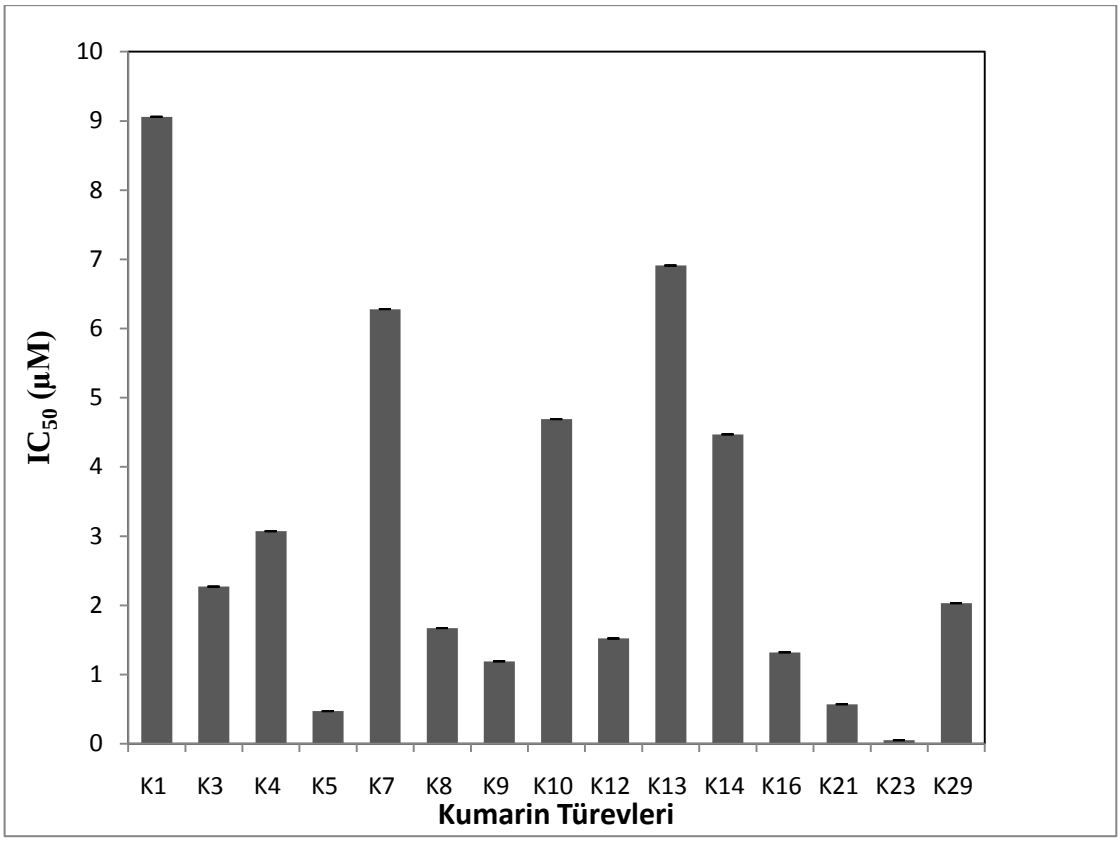
Çizelge 3. 1 Kumarin türevleri ve IC_{50} değerleri ve standart sapma değerleri

Kumarin Türevleri	**IC_{50} (µM)**	**Standart Sapma**	**Kumarin Türevleri**	**IC_{50} (µM)**	**Standart Sapma**
K1	9,06	±0.108	K14	4,47	±0.033
K2	26,62	±0.335	K16	1,32	±0.006
K3	2,27	±0.006	K19	58,10	±0.385
K4	3,07	±0.116	**K21**	**0,57**	±0.002
K5	**0,47**	±0.002	**K23**	**0,05**	±0.001
K7	6,28	±0.055	K24	23,93	±0.148
K8	1,67	±0.015	K25	17,80	±0.082
K9	1,19	±0.011	K26	11,17	±0.160
K10	4,69	±0.058	K27	27,61	±0.424
K11	13,20	±0.104	K28	48,86	±0.372
K12	1,52	±0.010	K29	2,03	±0.008
K13	6,91	±0.147			

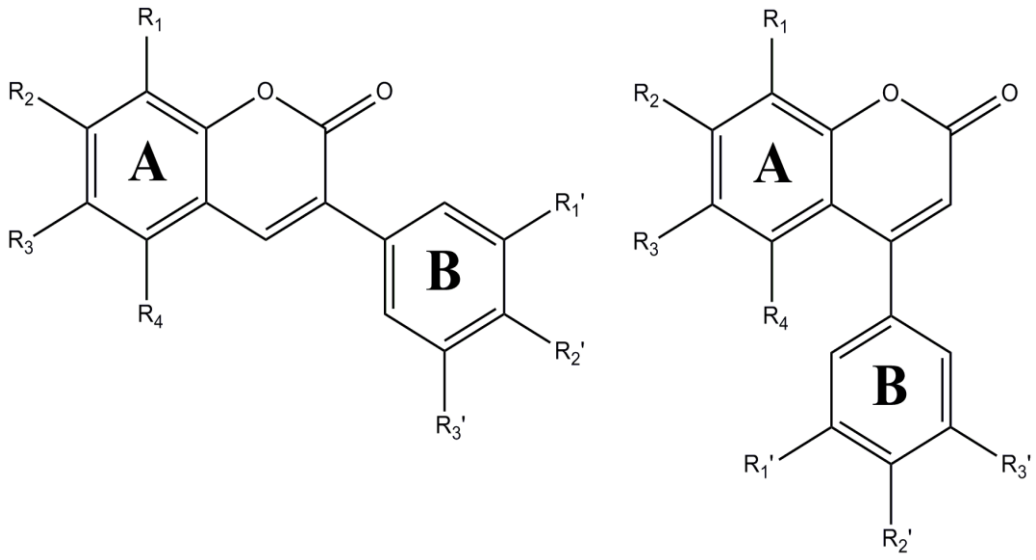
Çizelge 3. 2 6 Kumarin türevinin 50 µM konsantrasyondaki % inhibisyon değerleri

K6	**K15**	**K17**	**K18**	**K20**	**K22**
%15.9	N.A	%16,5	%12.1	%4,1	N.A

IC_{50} değerleri belirlenemeyen K6, K15, K17, K18, K20 ve K22 kumarin türevlerinin 50 µM'daki % inhibisyon değerleri Çizelge 3. 2'de verilmiştir. K15 ve K22 kumarin türevleri ise 50 µM'da inhibisyon vermemiştir.



Şekil 3. 7 Yüksek enzim inhibisyonu gösteren kumarin türevlerinin IC_{50}değerleri



Şekil 3. 8 Çalışmada kullanılan 3-aril ve 4-aril kumarin türevlerinin genel yapıları

Çalışmada kullanılan kumarin türevlerini yapıları incelendiğinde *Bf*D-LDH'ı inhibe etme özellikleri açısından dört ana gruba ayırmak mümkündür.

Bitişik A ve B halkasında bitişik hidroksi (–OH) grupları içeren tetrahidroksi kumarin türevleri (K5 [R_2,R_3,R_1',R_2'= -OH], K23 [R_1,R_2,R_1',R_2'= -OH], K21 [R_2,R_3,R_1',R_2'= -OH], ve K9 [R_1,R_2,R_1',R_2'= -OH]) en yüksek inhibisyon değerlerini göstermişlerdir (IC_{50}= 0.47, 0.05, 0.57 ve 1.19 µM.)

İnhibe etme potansiyelleri açısından bu türevleri sadece A veya sadece B halkasında bitişik –OH grubu içeren kumarin türevleri takip etmektedir (K1, K3, K7, K8, K10, K12, K13, K14, K16, K25 ve K29). Bu türevlerin IC_{50} değerleri 1.32 ile 9.06 µM arasında yüksek sayılabilecek bir inhibisyon göstermektedirler.

Bu grubun tek istisnası 17.80 µM'lık bir IC_{50} değerine sahip olan K25 türevidir. Bu göreceli düşük aktivite türevin B halkasında içerdiği üç metoksi (–OCH_3)grubunun oluşturduğu sterik engelleme ile açıklanabilir.

3. grup kumarin türevleri yapılarında A veya B halkasında bitişik asetoksi (-OAc) grupları içermektedir (K2, K4, K11, K26 ve K27). Bu grup orta-yüksek seviyede inhibisyon aktivitesine sahiptir (3.07-27,61 µM). Bileşiklerin yapıları incelendiğinde özellikle A halkasında bitişik -OAc grupları içeren kumarin türevlerinin yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Yine, B halkasında bitişik üçlü –OCH_3grubu içeren K27 bu grup içerisinde en düşük inhibisyon potansiyelini göstermiştir.

En düşük inhibisyon potansiyelinin gözlemlendiği 4. grup A halkasında R_1 ve R_3 pozisyonlarında iki -OAc veya iki -OH grubu içeren (K18 [50 µM konsantrasyonda %2 inhibisyon], K24 [IC_{50}; 23.93µM] ve K28 [IC_{50}; 48.86 µM) ve sadece bitişik –OCH_3 grupları içeren (K6 [N.A.] ve K22 [N.A.]) bileşiklerden oluşmuştur. Bu gruptaki bileşiklerin ortak özelliği B halkasında üç –OCH_3 grubuna veya bitişik –OCH_3 gruplarına sahip olmalarıdır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde yapıda A veya B halkasında bitişik –OH gruplarının bulunmasının enzim inhibisyon aktivitesini güçlendirdiği, özellikle A halkasındaki bitişik –OAc gruplarının, -OH gruplarından az olmakla birlikte inhibisyon aktivitesine önemli katkıda bulunduğu belirlenmiştir.

Kumarin türevlerindeki substitüsyonların enzim aktivitesi üzerine etkisi şu şekilde özetlenebilir:

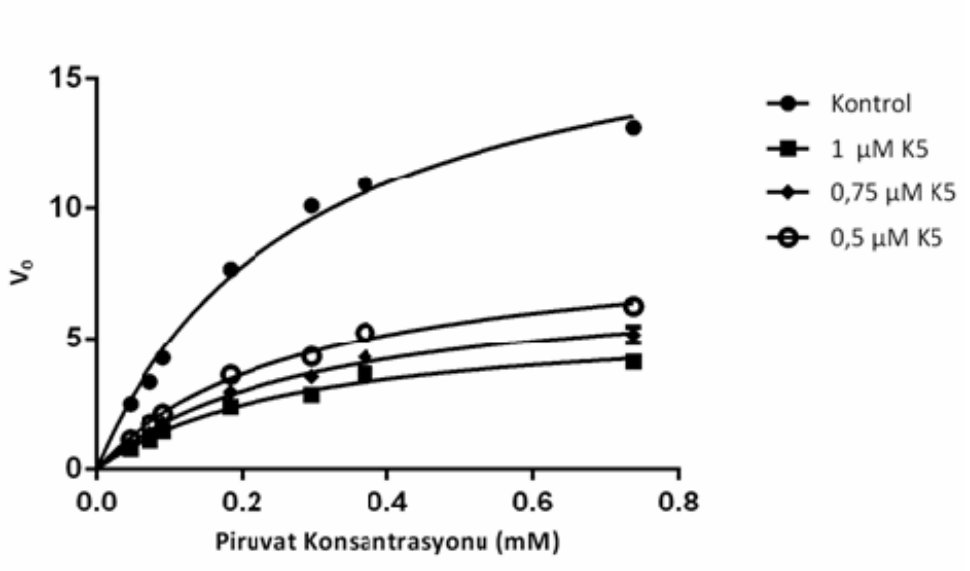
o-OH >*o*-OAc >*m*-OH >*m*-OAc >*o*-CH_3

Yapılan çalışmada kumarin ana yapısına fenil grubunun 3. veya 4. pozisyondan bağlanması ile enzim inhibisyon potansiyeli arasında istatistiksel bir ilişki belirlenememiştir.

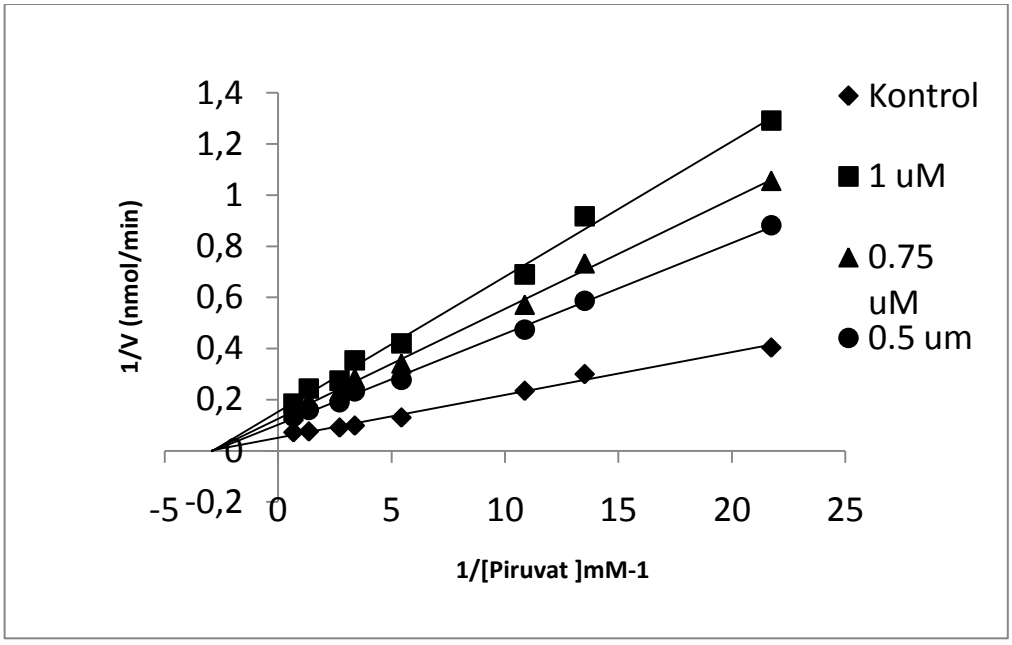
3.2.3 İnhibisyon Mekanizması ve Kinetiği

Kumarin türevleri arasında *Bf*D-LDH üzerinde en yüksek inhibisyon değerine sahip olan K5, K21 ve K23 kumarin türevlerinin inhibisyon mekanizması tayin çalışması Bölüm2.2.2.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.Şekil 3.9, Şekil 3.11 ve Şekil 3.13'te K5, K21 ve K23 kumarin türevlerine ait Michaelis-Menten grafikleri verilmiştir. Şekil 3.10, Şekil 3.12 ve 3.14'de K5, K21 ve K23 kumarin türevlerine ait Lineweaver-Burk eğrileri verilmiştir.

Lineweaver-Burk eğrisine göre 0.5 µM konsantrasyondaki K5kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 0.2868 mM, V_{max} değerinin ise 8.848 µmol/mg/dakika, 0.75 µM konsantrasyondaki kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 0.2921 mM, V_{max} değerinin ise 7.306 µmol/mg/dakika, 1 µM konsantrasyondaki kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında ise K_m değerinin 0.2771 mM, V_{max} değerinin ise 5.811 µmol/mg/dakika olduğu tespit edilmiştir.



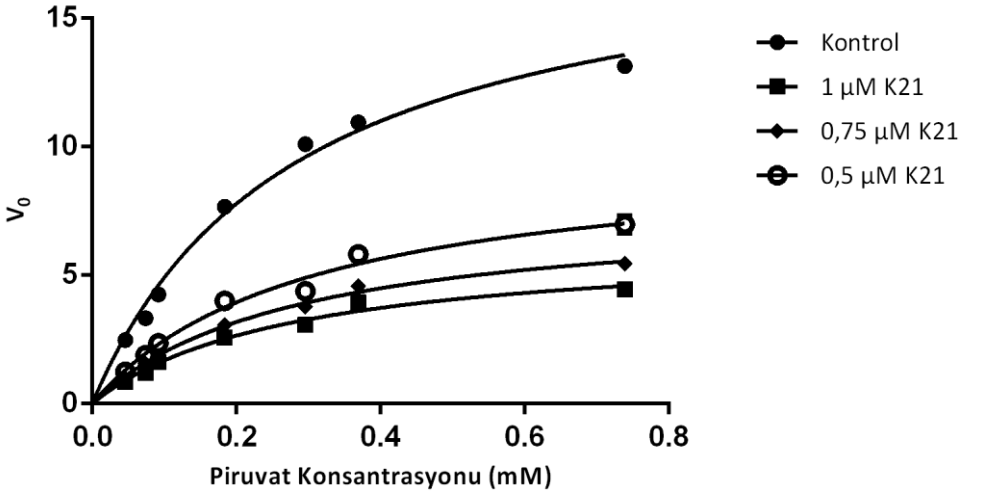
Şekil 3. 9 K5 için Michaelis-Menten grafiği



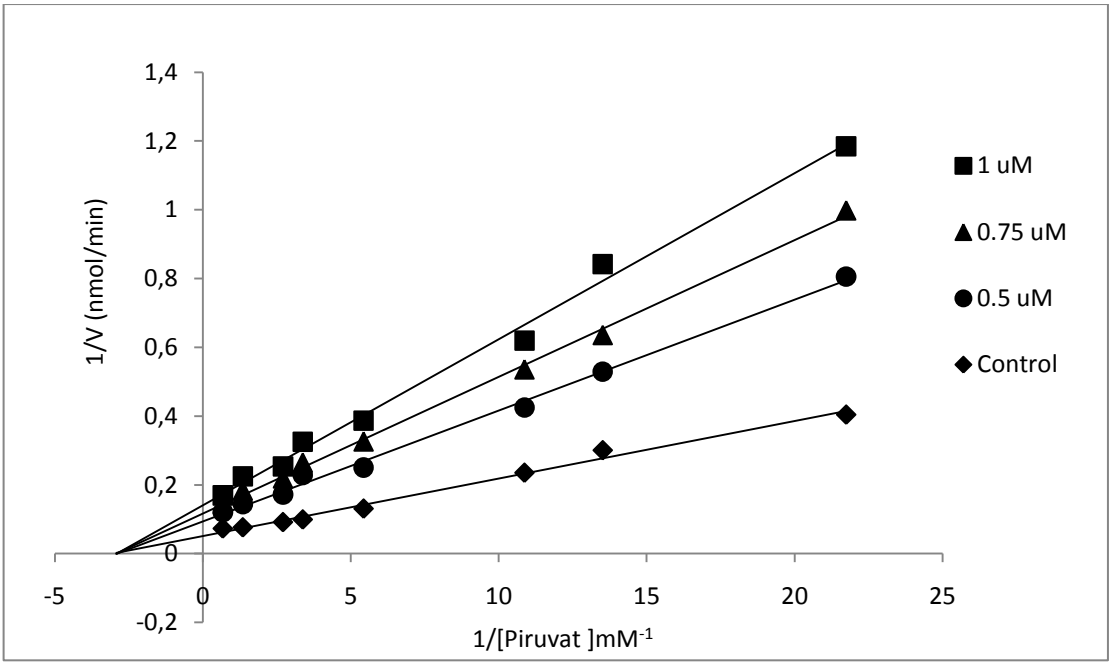
Şekil 3. 10 K5 için Lineweaver–Burk grafiği

Lineweaver-Burk eğrisine göre 0.5µM konsantrasyondaki K21 kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 0.2984 mM, V_{max} değerinin ise 9.844 µmol/mg/dakika, 0.75 µM konsantrasyondaki kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 0.2807 mM, V_{max} değerinin ise 7.642 µmol/mg/dakika, 1 µM konsantrasyondaki kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında ise K_m

değerinin 0.2728 mM, V_{max} değerinin ise 6.271 µmol/mg/dakika olduğu tespit edilmiştir.



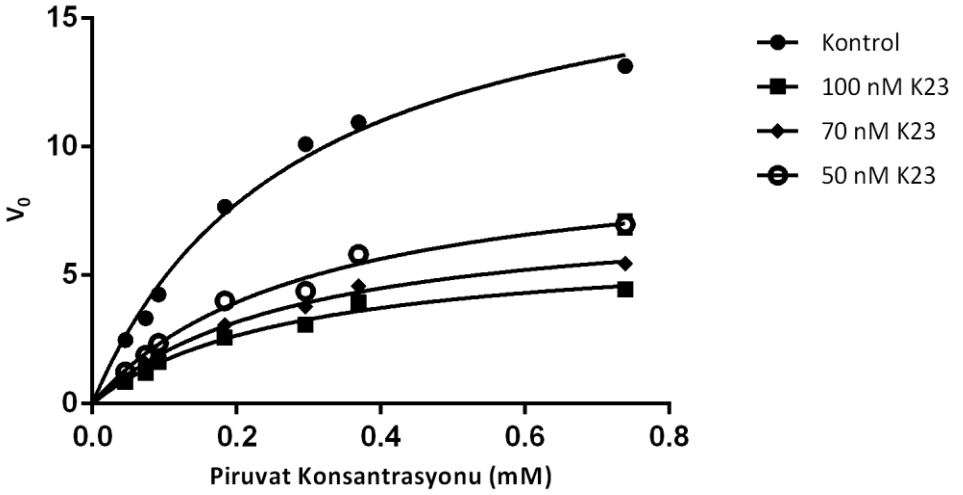
Şekil 3. 11 K21 için Michaelis-Menten grafiği



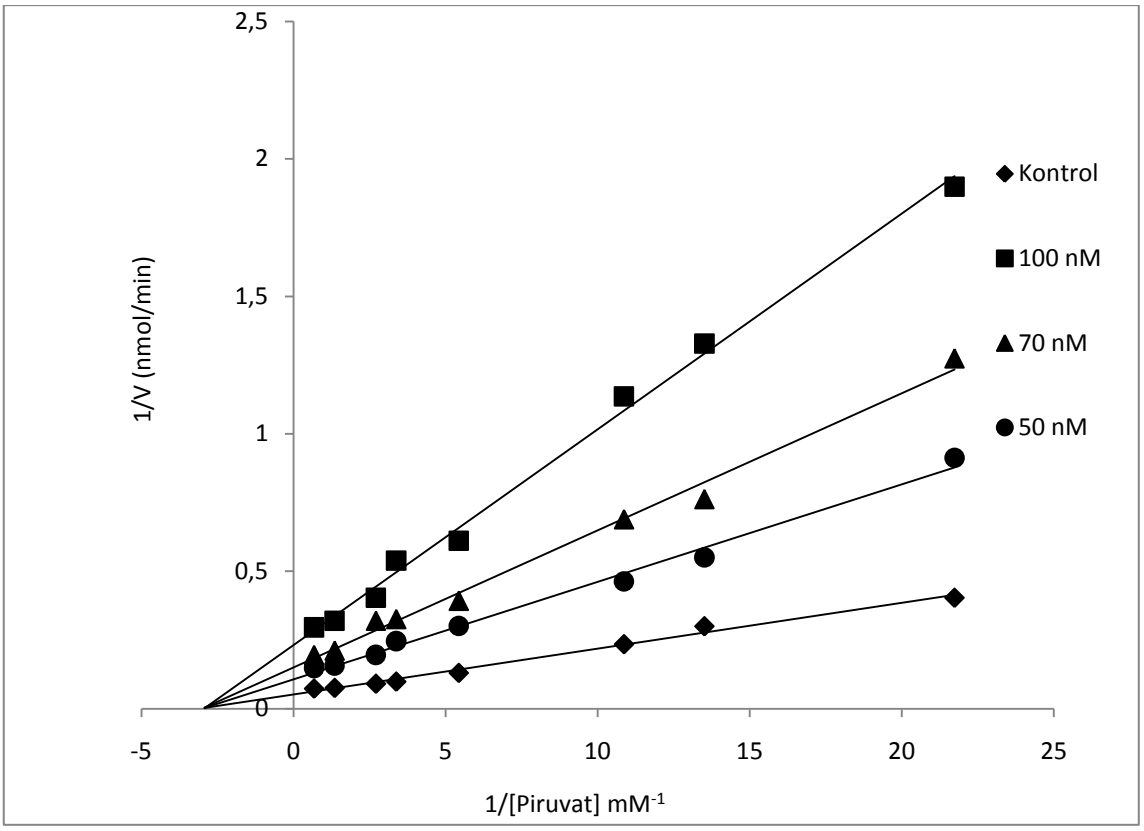
Şekil 3. 12 K21 için Lineweaver–Burk grafiği

Lineweaver-Burk eğrisine göre 50 nM konsantrasyondaki K23 kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında ise K_m değerinin 0.2984 mM, V_{max} değerinin ise

9.844 µmol/mg/dakika, 70 nM konsantrasyondaki kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında K_m değerinin 0.2807mM, V_{max} değerinin ise 7.642 µmol/mg/dakika, 100 nM konsantrasyondaki kumarin türevi için yapılan enzim kinetiği çalışmasında ise K_m değerinin 0.2728 mM, V_{max} değerinin ise 6.271 µmol/mg/dakika olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. 13 K23 için Michaelis-Menten grafiği

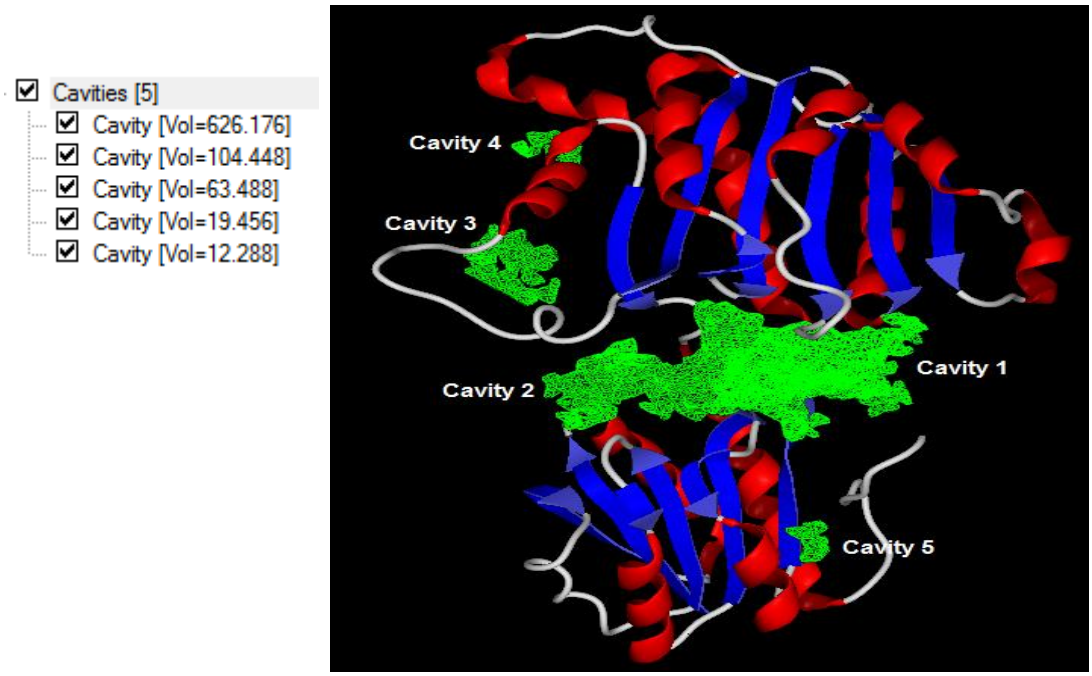


Şekil 3. 14 K23 için Lineweaver–Burk grafiği

Buna göre inhibitör konsantrasyonu arttığında K_m değeri sabit kalırken V_{max} değerinin azaldığı görülmektedir. K5 için K_i değeri 0.4532 µM, K21 için 0.5183 µM ve K23 için 0. 3603 µM olarak belirlenmiştir.

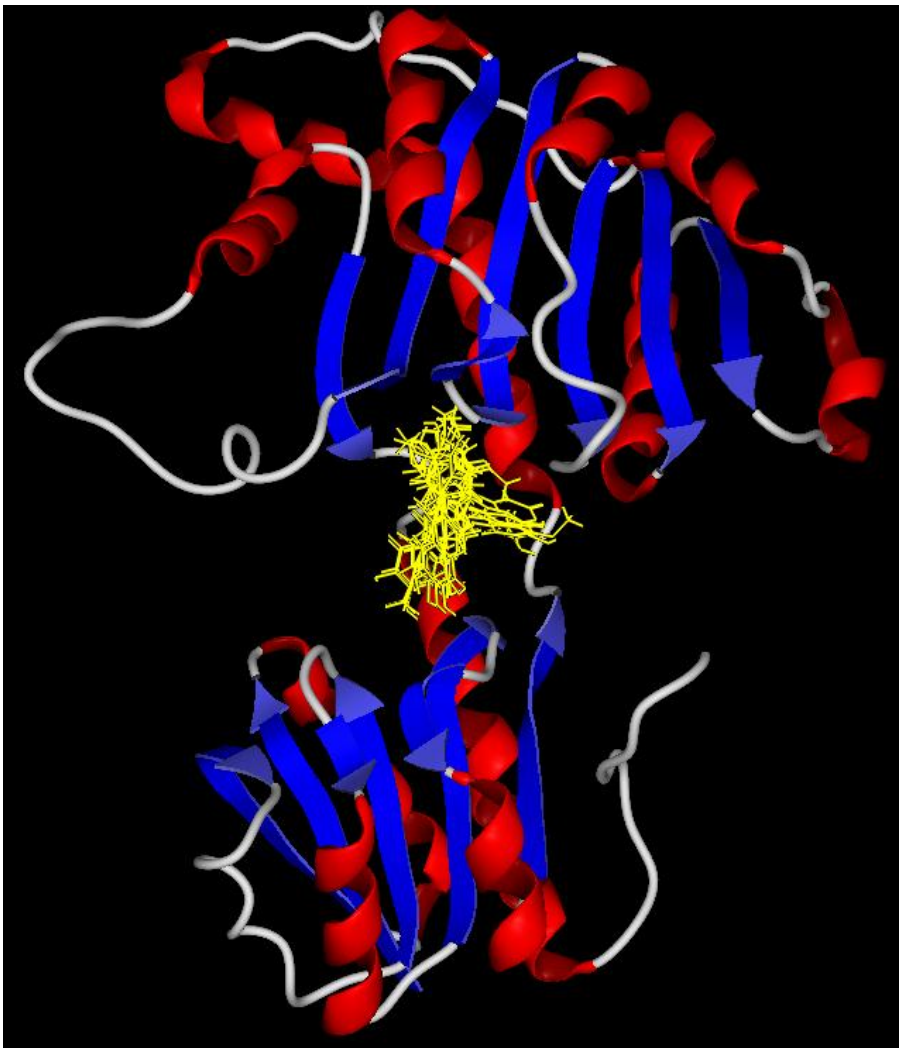
Elde edilen veriler ışığında K5, K21 ve K23 kumarin türevleri için *Bf*D-LDH'ınınhibisyon mekanizması geri dönüşümlü yarışmasız inhibisyon olarak tanımlanmıştır. İnhibitör ile substrat arasında bir yarışma söz konusu değildir. Yarışmasız inhibitör, enzimin katalitik aktivitesini düşürerek etkisini gösterir ve substrat konsantrasyonunun arttırılması inhibisyonu engellemez. Bu durumda K_M değeri sabit kalmış ve V_{max} değeri azalmıştır.

3.3 Kumarin Bileşikleri Kullanılarak *Bf*D-LDH Üzerinde Moleküler Docking Çalışmasının Yapılması



Şekil 3. 15 Olası ilaç bağlanma bölgelerinin (ceplerinin) gösterimi.

Docking öncesi protein üzerindeki cepler (pockets, cavities) belirlenerek ligandların nereye yönlendirileceği seçilmiştir. Protein üzerindeki hacmi 12.288 A^3-626.176A^3 arasında değişen 5 farklı cep bölgesi belirlenmiştir. Belirlenen bu ceplerden homoloji modelleme sonuçlarına göre Cavity1 NADH ve piruvatın bağlandığı aktif bölgedir [52]. Bu nedenle bütün dockingler bu bölge üzerinde yapılmıştır.



Şekil 3. 16 Bütün ligandların (sarı renk ile) bağlandığı aktif bölgenin görüntüsü

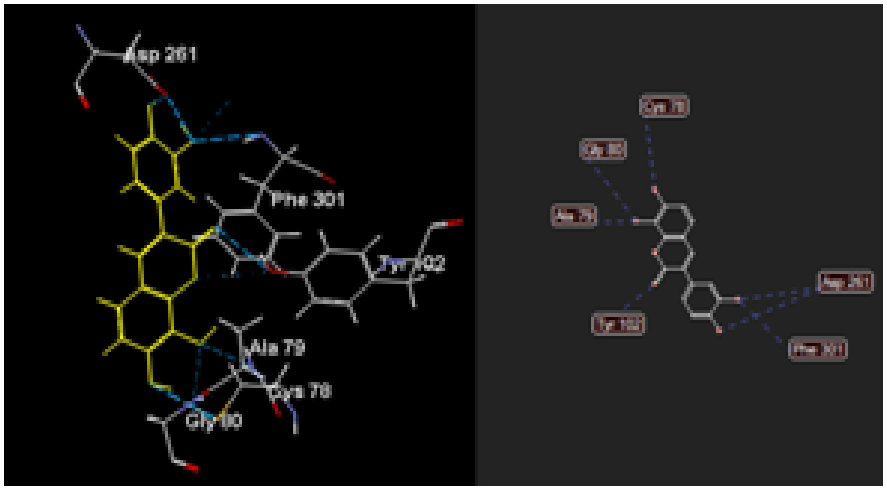
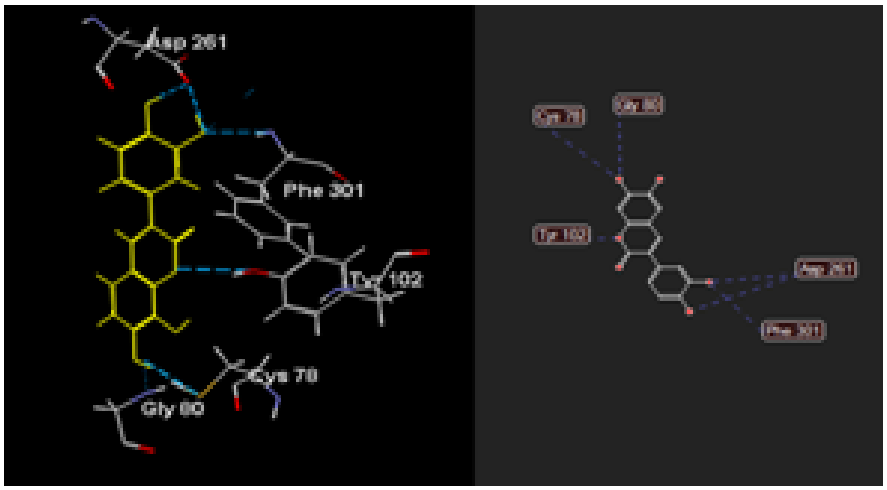
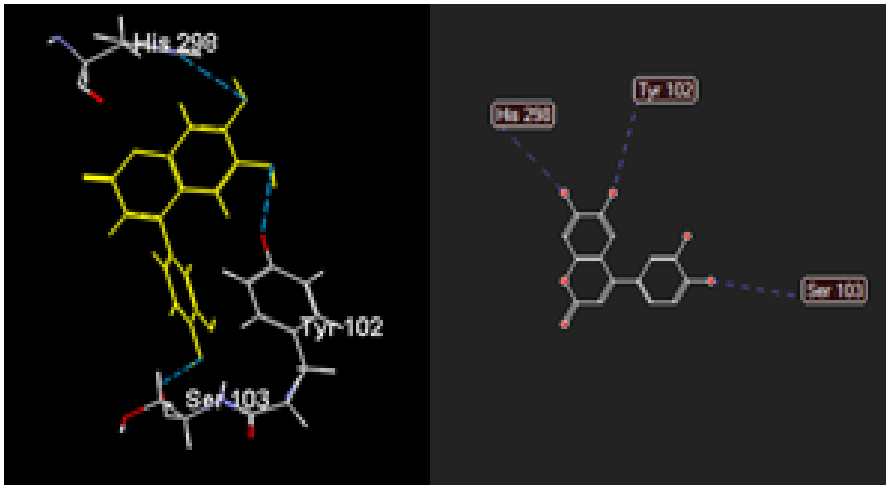
Docking sonuçlarına göre ligandlar cavity1'de piruvatın bağlandığı bölgeye bağlanmıştır. NADH'ın bağlandığı bölge daha geniş ve affinitesinin bütün ligandlardan daha yüksek olması ile ligandlar, piruvatın NADH'a bağlanmasını engelleyerek aktivite gösterebilmektedirler. Bu nedenle ligandlar NADH'ın bağlandığı bölgeden uzakta bulunmaktadırlar.

Çizelge 3. 3 Docking sonuçları (kcal/mol)

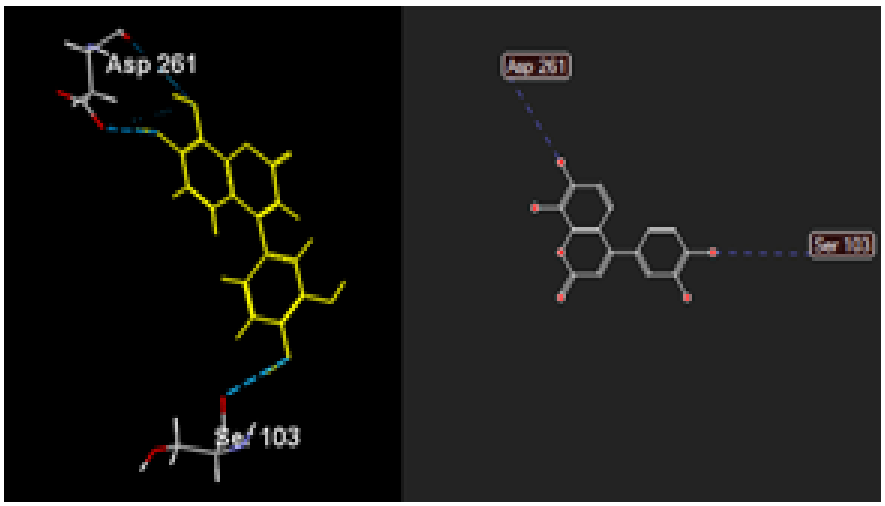
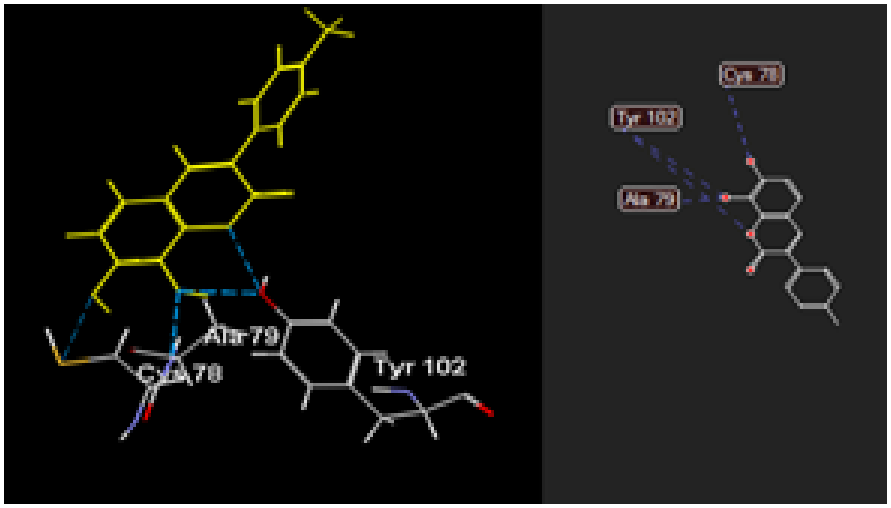
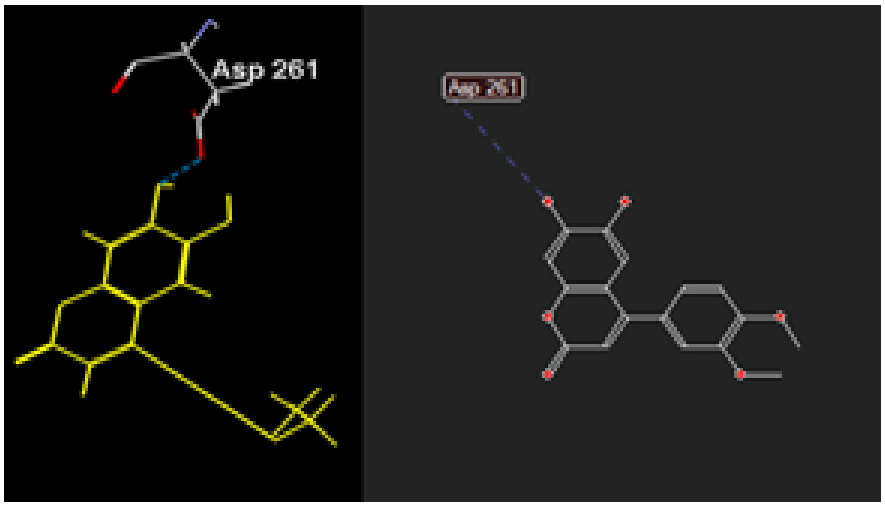
Ligand Adı	Moldock Skoru	Protein-Ligand Etkileşimi	Hidrojen Bağı	Sterik Etkileşim
K23	**-100.878**	**-111.261**	**-17.710**	**-93.551**
K5	**-95.955**	**-109.155**	**-13.477**	**-95.678**
K21	**-91.920**	**-108.509**	**-6.709**	**-101.800**
K9	-87.337	-107.506	-5.719	-101.787
K16	-86.554	-105.767	-10	-95.767
K12	-85.017	-104.695	-8.730	-95.965
K8	-90.693	-107.311	-2.5	-104.811
K14	-74.772	-99.528	-3.280	-96.248
K10	-77.552	-100.657	-2.760	-97.897
K7	-72.948	-96.197	-2.127	-94.070
K13	-75.983	-96.758	-2.909	-93.849
K1	-69.191	-95.347	-3.694	-91.653

Molegro virtual docker programından alınan sonuçlara göre en çok H-bağı yapan kumarin türevleri K23 (6 adet H bağı) ve K5 (5 adet H-bağı) olmuştur. Her iki ligandın da bağlanma modu birbirine benzer olup aktif bölge amino asitleri ile H-bağı yapmışlardır. H-bağ enerjisi yüksek olmasından dolayı toplam protein-ligand etkileşim enerji değerleri diğer kumarinlere göre daha yüksektir. Kumarin 9, 16, 12 ve 8'in skorları birbirine yakın değerlerdir. Kendi içinde K9 ve K8 moleküllerinin yapılarından dolayı sterik etkileşimler daha fazla fakat H-bağları daha zayıf durumdadır. K1, K7, K10, K13 ve K14 kumarin türevlerinin H bağı değerleri birbirine yakın fakat sterik etkileşimler ileberaber toplam skor en düşük K1'de görülmektedir.

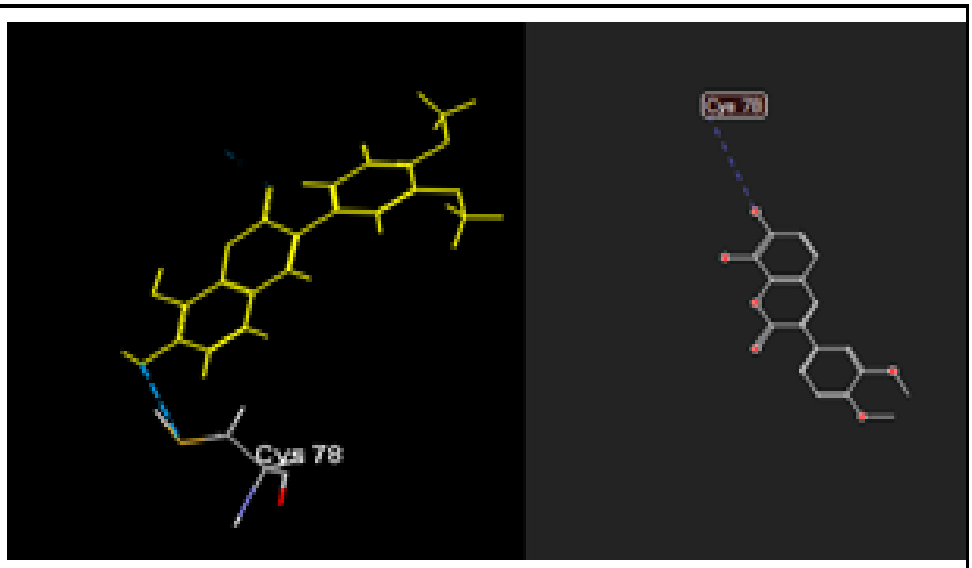
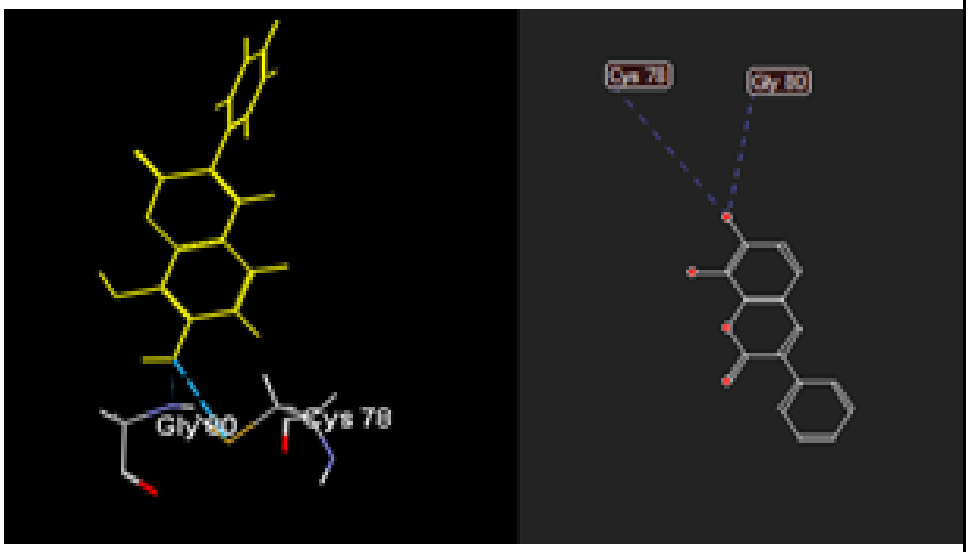
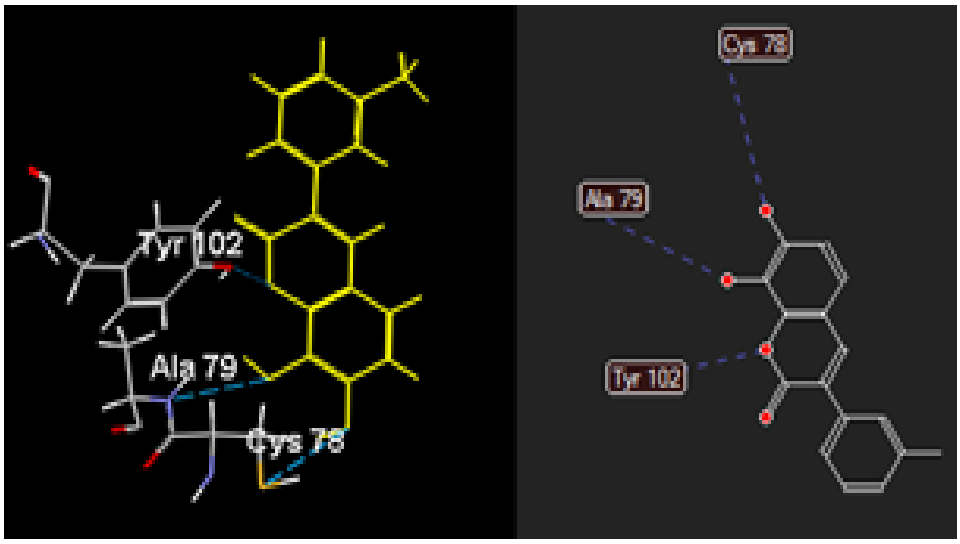
Çizelge 3. 4 Kumarin türevleri ile *Bf*D-LDH'ın moleküler docking görüntüleri

K23	
K5	
K21	

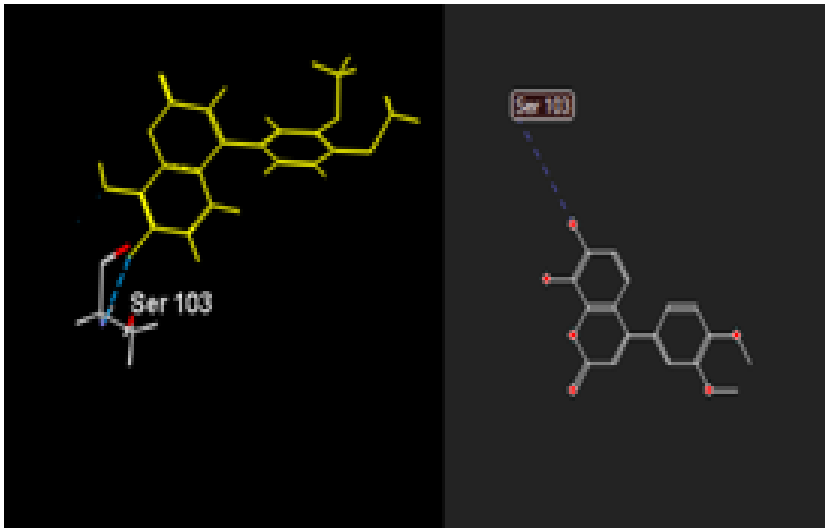
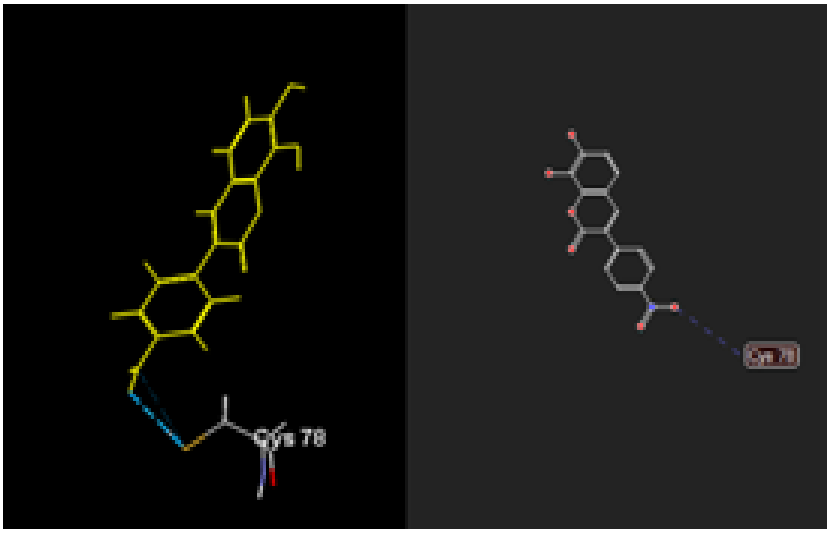
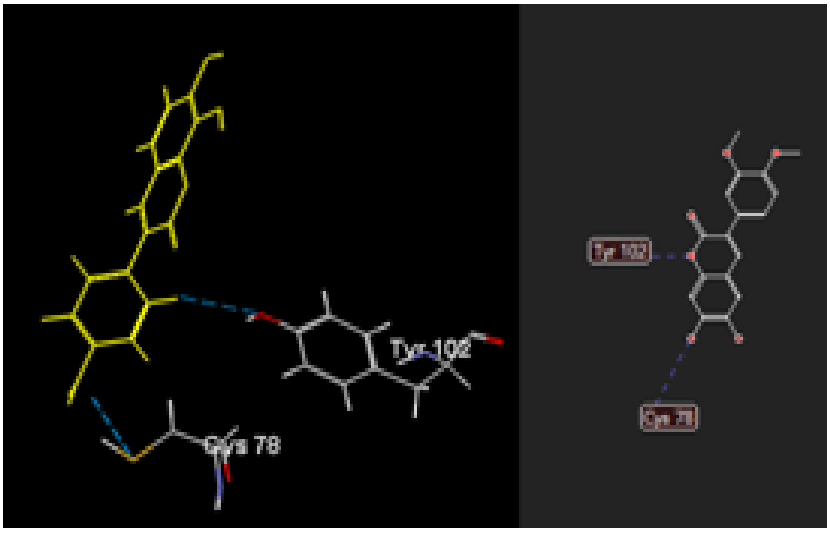
Çizelge 3. 4 Kumarin türevleri ile *Bf*D-LDH'ın moleküler docking görüntüleri (devamı)

K9	
K16	
K8	

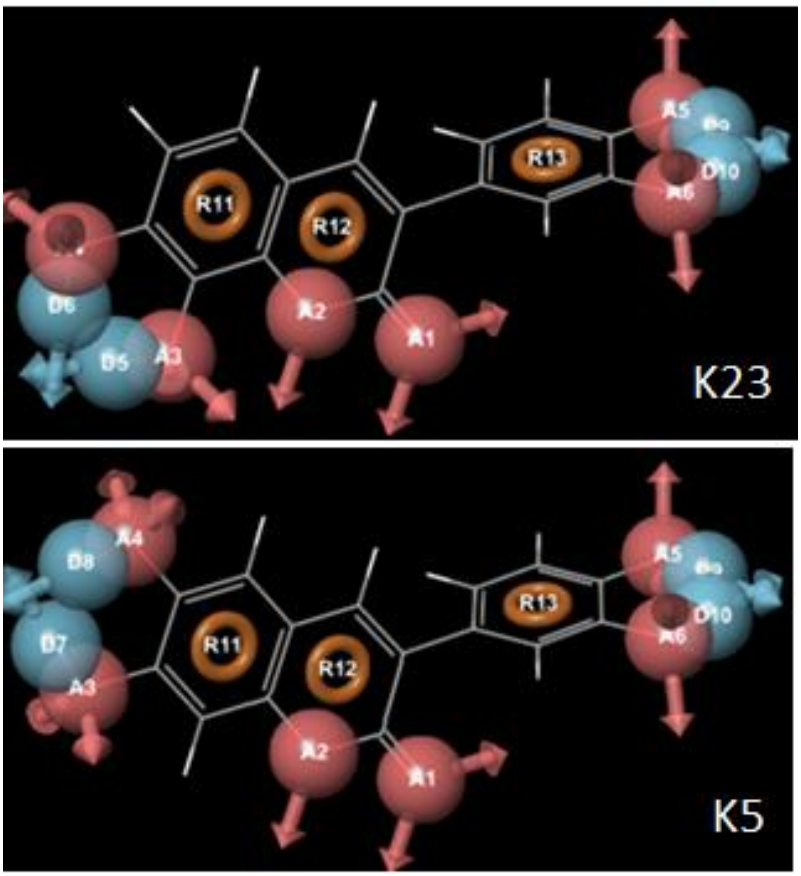
Çizelge 3. 4 Kumarin türevleri ile *Bf*D-LDH'ın moleküler docking görüntüleri (devamı)

K10	
K14	
K12	

Çizelge 3. 4 Kumarin türevleri ile *Bf*D-LDH'ın moleküler docking görüntüleri (devamı)

K7	
K13	
K1	

Protein ile inhibitör arasında kurulan H bağları Çizelge 3. 4'te mavi renkli olarak gösterilmiştir. En fazla inhibisyonu, 6 H bağı ile proteinin aktif bölge elemanlarına bağlanan K23 hemen sonrasında 5 H bağı ile K5 vermektedir.



Şekil 3. 17 K23 ve K5'in farmakofor modelleri ve A: acceptör, D: Donör

Farmakofor modelleri incelendiğinde K23 ve K5kumarin türevlerinin 6 adet H-alıcı (acceptör) ve 4 adet H-bağ verici (donor) bölgelerinin olduğu aralarındaki tek farkın bir adet hidroksil grubunun yerinin farklı olmasıdır. Docking sonuçlarına göre bu fark aktif bölgede çok büyük bir etki yaratmamaktadır ve ligandların bağlanma modu değişmemektedir. Tüm kumarinler beraber değerlendirildiğinde H-bağ avantajları ve aktif bölge içindeki konumları nedeniyle K23 ve K5 en iyi ilaç adayı olabilecek kumarin türevleridir.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bakteriler, enerji ihtiyaçlarını farklı metabolik yolaklar ile sağlayabilirler. Karbonhidratlar organizmaların metabolik süreçlerinde önemli rol oynamaktadır ve canlı hücrelerin enerji kaynakları ve yapı taşları olarak görev almaktadırlar. Glikoliz yolağında her bir glikoz molekülü, iki adet üç karbonlu piruvata dönüşür ve sonraki aşamalar organizmanın metabolik koşullarına göre değişkenlik gösterebilir. Anaerobik organizmalar, piruvattan sonraki yolakta etanol, laktik asit, asetik asit ve benzeri moleküller oluşturabilir [33]. *B. fragilis,* enerji kaynağı olarak karbonhidrat metabolizmasını kullanır [1]. Laktat dehidrogenaz, glikolizin ve enerji ihtiyacının karşılanması için anaerobik solunumda önemli role sahip olan piruvatın laktata ve laktatın piruvata dönüşümünü çift yönlü olarak katalizleyen ve NAD^+ çevirimini sağlayan enzimdir [35], [36].

Antibiyotikler, sentetik olarak elde edilen veya biyolojik kaynaklı olan ilaçlardır. Bakteriyosidal veya bakteriyostatik etki mekanizmaları ile bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanımları tıpta büyük ilerlemelere yol açmıştır. Ancak, bakteriler hayatta kalma yetenekleri oldukça yüksek canlılardır. Bakterilerin bu özellikleri ile antibiyotik direncinin ortaya çıkması kaçınılmaz bir sonuçtur [18].

B. fragilis ile kolon kanserinin ilişkilendirilmesinin [2] ardından bildirilen antibiyotik direnci raporları yeni ilaç ihtiyacını ortaya koymuştur. Yapılan bu tez çalışmasında Kumarin türevlerinin *Bf*D-LDH üzerine olan inhibitör etkisi çalışılmış, kinetik

karakterizasyonu yapılmış ve IC_{50} değeri 0,469 µM, 0,5708 µM ve 0,05124 µM olan 3 kumarin türevi belirlenmiştir. Belirlenen bu değerler ışığında ileriye yönelik ilaç çalışmaları daha fazla önem kazanmaktadır.

İleride yapılması planlanan *in vivo* çalışmalar ile belirlenen K5, K21 ve K23 kumarin türevlerinin *B. fragilis* metabolizmadaki etkisinin gösterilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Wexler, H.M., (2007). "Bacteroides: The Good, The Bad, And The Nitty-Gritty", Clinical Microbiology Reviews, 20: 593-621.

[2] Ulger Toprak, N. Yagci, A. Gulluoglu, B. Akin, M. Demirkalem, P. Celenk, T. ve Soyletir, G., (2006). "A Possible Role Of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin in The Aetiology of Colorectal Cancer", Clinical microbiology and infection, 12: 782-786.

[3] Johnson, J., (1978). "Taxonomy Of The Bacteroides I. Deoxyribonucleic Acid Homologies Among *Bacteroides fragilis* and Other Saccharolytic Bacteroides Species", International journal of systematic bacteriology, 28: 245-256.

[4] Wick, E.C. ve Sears, C.L., (2010). "Bacteroides Spp. And Diarrhea", Current Opinion in Infectious Diseases, 23: 470.

[5] Gill, S.R. Pop, M. DeBoy, R.T. Eckburg, P.B. Turnbaugh, P.J. Samuel, B.S. Gordon, J.I. Relman, D.A. Fraser-Liggett, C.M. ve Nelson, K.E., (2006). "Metagenomic Analysis Of The Human Distal Gut Microbiome", Science, 312: 1355-1359.

[6] Ley, R.E. Bäckhed, F. Turnbaugh, P. Lozupone, C.A. Knight, R.D. ve Gordon, J.I., (2005). "Obesity alters gut microbial ecology", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 11070-11075.

[7] Turnbaugh, P.J. Ley, R.E. Mahowald, M.A. Magrini, V. Mardis, E.R. ve Gordon, J.I., (2006). "An Obesity-Associated Gut Microbiome With İncreased Capacity For Energy Harvest", Nature, 444: 1027-1131.

[8] Watts, P.C. Buley, K.R. Sanderson, S. Boardman, W. Ciofi, C. ve Gibson, R., (2006). "Human Gut Microbes Associated With Obesity", Change, 1: 90.

[9] Paulsen, I. Banerjei, L. Myers, G. Nelson, K. Seshadri, R. Read, T. Fouts, D. Eisen, J. Gill, S. ve Heidelberg, J., (2003). "Role Of Mobile DNA İn The Evolution Of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecalis", Science, 299: 2071-2074.

[10] Dejea, C. Wick, E. ve Sears, C.L., (2013). "Bacterial Oncogenesis in The Colon", Future Microbiology, 8: 445-460.

[11] Troy, E.B. ve Kasper, D.L., (2010). "Beneficial Effects of *Bacteroides fragilis* Polysaccharides on the Immune System", Frontiers in Bioscience: A Journal And Virtual Library, 15: 25.

[12] Sack, R.B. Myers, L.L. Almeido-Hill, J. Shoop, D.S. Bradbury, W.C. Reid, R. ve Santosham, M., (1992). "Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: epidemiologic Studies Of Its Role As A Human Diarrhoeal Pathogen", Journal Of Diarrhoeal Diseases Research: 4-9.

[13] Balkan, N. Toprak Ülger, N. ve Özaydın, N., (2012). "Farklı Kalsiyum Konsantrasyonlarının Enterotoksijenik *Bacteroides fragilis* kökenlerinin Üremesi Üzerine Etkisi", Müsbed 2(4):149-154.

[14] Anonim (2014). "American Cancer Society". Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. ".

[15] Day, L.W. ve Velayos, F., (2015). "Colorectal cancer screening and surveillance in the elderly: updates and controversies", Gut and liver, 9: 143.

[16] Mysliwiec, P.A. Cronin, K.A. ve Schatzkin, A., (1973). "New Malignancies Following Cancer Of The Colon, Rectum, And Anus", New Malignancies Among Cancer Survivors: SEER Cancer Registries, 1973–2000: 111-144.

[17] Anonim, (2015). "Akıllı İlaç Kullanımı ", Available at: http://www.akilciilac.gov.tr/?page_id=1009&lang=tr_TR. Accessed 25.07.2015.

[18] Davies, J. ve Davies, D., (2010). "Origins and Evolution Of Antibiotic Resistance", Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74: 417-433.

[19] Organization, W.H., (2015). "Worldwide Country Situation Analysis: Response To Antimicrobial Resistance".

[20] Anonim, (2012). "Antimicrobial Resistance Timeline ", Available at: http://lumibyte.eu/microbiology-news/antimicrobial-resistance-timeline/ Accessed 22.07.2015.

[21] Meggersee, R. ve Abratt, V., (2015). "The occurrence Of Antibiotic Resistance Genes İn Drug Resistant *Bacteroides fragilis* Isolates From Groote Schuur Hospital, South Africa", Anaerobe, 32: 1-6.

[22] Control, C.f.D. ve Prevention, (2013). "Multidrug-Resistant Bacteroides fragilis--Seattle, Washington, 2013", MMWR. Morbidity And Mortality Weekly Report, 62: 694.

[23] Snydman, D. Jacobus, N. McDermott, L. Ruthazer, R. Goldstein, E. Finegold, S. Harrell, L. Hecht, D. Jenkins, S. ve Pierson, C., (2002). "In Vitro Activities Of Newer Quinolones Against *Bacteroides* Group Organisms", Antimicrobial agents and chemotherapy, 46: 3276-3279.

[24] Snydman, D. Jacobus, N. McDermott, L. Golan, Y. Goldstein, E. Harrell, L. Jenkins, S. Newton, D. Pierson, C. ve Rosenblatt, J., (2011). "Update On Resistance of Bacteroides fragilis Group And Related Species With Special Attention To Carbapenems 2006–2009", Anaerobe, 17: 147-151.

[25] Ülger N., Çelik C., Söyletir G., (2004). "Klindamisine Dirençli Bacteroides fragilis ve Bacteroides thetaiotaomicron Kökenlerinin Diğer Antibiyotiklere Çapraz Direnci", 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler, 8-10 Nisan 2004, İstanbul.

[26] Eitel, Z. Sóki, J. Urbán, E. ve Nagy, E., (2013). "The Prevalence Of Antibiotic Resistance Genes In Bacteroides fragilis Group Strains Isolated In Different European Countries", Anaerobe, 21: 43-49.

[27] Nord, C.E. ve Hedberg, M., (1990). "Resistance to β-lactam Antibiotics in Anaerobic Bacteria", Review of Infectious Diseases, 12: S231-S234.

[28] Rasmussen, B. Bush, K. ve Tally, F., (1997). "Antimicrobial Resistance in Anaerobes", Clinical Infectious Diseases, 24: S110-S120.

[29] Bush, K. Jacoby, G.A. ve Medeiros, A.A., (1995). "A Functional Classification Scheme For Beta-Lactamases And Its Correlation with Molecular Structure", Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 39: 1211.

[30] Garcıa-Rodrıguez, J. Garcıa-Sánchez, J. ve Munoz-Bellido, J., (1995). "Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria: Current Situation", Anaerobe, 1: 69-80.

[31] Uzun, B. Gungor, S. Pektas, B. Aksoy, G.A. Yula, E. Kocal, F. ve Kaya, S., (2014). "Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLSB) Resistance Phenotypes in Clinical *Staphylococcus* Isolates And Investigation Of Telithromycin Activity", Mikrobiyoloji Bulteni, 48: 469-476.

[32] Roberts, M.C., (1995). "Distribution Of Tetracycline And Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Genes in Anaerobic Bacteria", Clinical Infectious Diseases: 367-S369.

[33] Macfarlane, G.T. ve Gibson, G.R., (1997). Carbohydrate Fermentation, Energy Transduction and Gas Metabolism in The Human Large Intestine, ed. Gastrointestinal microbiology. Springer, 269-318.

[34] Flick, M.J. ve Konieczny, S.F., (2002). "Identification of Putative Mammalian D-Lactate Dehydrogenase Enzymes", Biochemical and Biophysical Research Communications, 295: 910-916.

[35] Ethan S. Sımon, R.P. ve Whıtesıdes, A.G.M., (1989). "D-Lactate Dehydrogenase Substrate Specificity and Use as a Catalyst in the Synthesis of Homochiral 2-Hydroxy Acids", Applied Biochemistry and Biotechnology, 22: 169-179.

[36] Shi, Y. ve Pinto, B.M., (2014). "Human Lactate Dehydrogenase A İnhibitors: A Molecular Dynamics Investigation".

[37] Adams, M. Ford, G. Koekoek, R. Lentz, P. McPherson, A. Rossmann, M. Smiley, I. Schevitz, R. ve Wonacott, A., (1970). "Structure of Lactate Dehydrogenase at 2.8 Å Resolution", nature, 227: 1098-1103.

[38] Lesk, A.M., (1995). "NAD-Binding Domains of Dehydrogenases", Current Opinion in Structural Biology, 5: 775-783.

[39] Razeto, A. Kochhar, S. Hottinger, H. Dauter, M. Wilson, K.S. ve Lamzin, V.S., (2002). "Domain Closure, Substrate Specificity and Catalysis of D-Lactate Dehydrogenase from Lactobacillus Bulgaricus", Journal of Molecular Biology, 318: 109-119.

[40] Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, accession number: NP_810488., Available at: https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-2079.html. Accessed 17.05.2015

[41] Prevotella denticola F0289, accession number: YP_004329224, Available at: http://bacmap.wishartlab.com/organisms/1304, Accessed 17.05.2015

[42] Nelson, D.L. ve Cox, M.M., (2005). "Lehninger Biyokimyanın İlkeleri", Üçüncü baskı. Ankara. Palme Yayıncılık, 203.

[43] Horton, H.R. ve Moran, L.A., Principles of biochemistry.

[44] Wang, J. Araki, T. Ogawa, T. Matsuoka, M. ve Fukuda, H., (1999). "A method of Graphically Analyzing Substrate-İnhibition Kinetics", Biotechnology and Bioengineering, 62: 402-411.

[45] Borges, F. Roleira, F. Milhazes, N. Santana, L. ve Uriarte, E., (2005). "Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity", Current Medicinal Chemistry, 12: 887-916.

[46] Kulkarni, M.V. Kulkarni, G.M. Lin, C.-H. ve Sun, C.-M., (2006). "Recent Advances in Coumarins And 1-Azacoumarins as Versatile Biodynamic Agents", Current Medicinal Chemistry, 13: 2795-2818.

[47] Venugopala, K.N. Rashmi, V. ve Odhav, B., (2013). "Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity", BioMed Research International, 2013.

[48] Yüce, B., (2006). Hesperidin, Rutin ve 7,8-Dihidroksi-3-(4-Metilfenil) Kumarin Bileşiklerinin Lipit Düşürücü ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, Marmara Üniversitesi.

[49] Lee, S. Sivakumar, K. Shin, W.-S. Xie, F. ve Wang, Q., (2006). "Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives", Bioorganic & medicinal chemistry letters, 16: 4596-4599.

[50] Anand, P. Singh, B. ve Singh, N., (2012). "A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease", Bioorganic & medicinal chemistry, 20: 1175-1180.

[51] Zhao, H. Neamati, N. Hong, H. Mazumder, A. Wang, S. Sunder, S. Milne, G.W. Pommier, Y. ve Burke, T.R., (1997). "Coumarin-Based Inhibitors of HIV Integrase 1", Journal of medicinal chemistry, 40: 242-249.

[52] Bolat, Z.B., (2013). Isolatıon And Characterızatıon Of The Gene Encodıng D-Lactate Dehydrogenase Enzyme from *Bacteroıdes fragilis* That Is Known To Be Localızed In Colon Cancer Tıssues, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[53] Scientific, T., "aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System", Available at: www.thermoscientificbio.com. Accessed 22.05.2015.

[54] Gündüz, C. Salan, Ü. ve Bulut, M., (2010). "The Synthesis and Fluorescence Properties of Novel Chromenone-Crown Ethers", Supramolecular Chemistry, 22: 491-498.

[55] Gündüz, C. Salan, Ü. ve Bulut, M., (2009). "The Synthesis of Novel 4-(3, 4-dimethoxyphenyl) Chromenone-Crown Ethers and Their Cation Binding, As Determined Using Fluorescence Spectra", Supramolecular Chemistry, 21: 724-731.

[56] Shoemark, D.K., (2000). The Kinetic Characterization Of The Lactate Dehydrogenase Enzyme From *Plasmodium Falciparum*, University of Bristol.

[57] Çayır, E., (2013). *Theileria annulata*'nın Enolaz Enzimini Kodlayan Genin İntronsuz Olarak Klonlanması, Enzimin İfade Edilmesi, Saflaştırılması ve Kinetik Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[58] QIAGEN, (2003). "A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins", Available at: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf. Accessed.

[59] Laemmli, U.K., (1970). "Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4", Nature, 227: 680-685.

[60] DeNovix, (2013). Available at: http://www.genplaza.com/kilavuzlar/GenPlaza_TR_Denovix_DS11.pdf. Accessed 10.07.2015.

[61] Topçu, G., (2013). "Tıbbi Bitkilerden İlaca Giden Yol", Available at: http://www.itam.org.tr/dosya/mayis2013/gulacti-topcu.pdf. Accessed 10.07.2015.

[62] Thomsen, R. ve Christensen, M.H., (2006). "MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking", Journal of Medicinal Chemistry, 49: 3315-3321.

[63] "Experimental Techniques II Seperation Methods", Available at: http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/bradford.gif. Accessed 05.06.2015.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Erennur UĞUREL

Doğum Tarihi ve Yeri :01/03/1990 Niksar/ TOKAT

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :erennurugurel@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lise	Fen	Tokat Milli Piyango İhya Balak Fen Lisesi	2008

YAYINLARI

Bildiri

1. **Ugurel E.,** Bolat ZB., Turgut-Balik D. “Effect of Temperature on the Stability ofD-Lactate Dehydrogenase fromEnterotoxigenic *Bacteroides fragilis* associated with colon cancer” 2nd International Bau-Drug Desıgn Symposıum, Istanbul, Turkey, 17-18-19 April 2014.

2. **Ugurel E.,** Danis O., Mutlu O., Yuce-Dursun B., Gunduz C., Turgut-Balik D. ” Determination of the Inhibitory Effect of Some Coumarin Derivatives on *Bacteroides fragilis*D-LDH” International Symposium on Molecular Chemistry, Istanbul, Turkey, 18–19 December 2014.