

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİN İZOLASYONU, KLONLANMASI VE ANALİZİ**

EMRAH SARIYER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK TURGUT BALIK**

İSTANBUL, 2013

T.C.YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİN İZOLASYONU, KLONLANMASI VE ANALİZİ**

Emrah SARIYER tarafından hazırlanan tez çalışması ../../.... 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

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İmer OKAR
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Akademik hayattaki ilk tecrübelerimi edinmemi sağlayan, laboratuvar ve tez aşamamda bilgi, deneyim ve tecrübesiyle bana yol gösteren, karşılaştığım tüm sorunlar için sabırla çözüm üreten, akademik çalışma hayatım dışında da her konuda fikir ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Dilek Turgut-Balık'a,

Tez çalışmasının yürütülmesine maddi destek sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na (YÖK), Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne, Gümüşhane Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne ve her iki bölümdeki hocalarıma,

Tez çalışmasında kullanılan *Fusobacterium nucleatum* genomik DNA'sını sağlayan Dr. Mike Milward ve Dr. Paul R. Cooper'a, The School of Dentistry, University of Birmingham, İngiltere,

Grup içi çalışmaları ile bu tez çalışmasının yürütülmesine katkı sağlayan Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım Uzman Ayşegül Erdemir, Araş. Gör. Ebru Çayır, Araş. Gör. Özal Mutlu, Sinem Yakarsönmez, Belma Nural, Zeynep Büşra Bolat, Ekrem Akbulut, Zehra Ömeroğlu Ulu'ya,

Bölümde yer alan diğer yüksek lisans, doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisansım süresince desteklerini esirgemeyen ve her aşamada yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Aralık, 2013

Emrah SARIYER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Hastalıklar ile Mikroorganizmalar Arasındaki İlişki.....	1
1.1.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> ve İltihaplı Hastalıklar	2
1.1.3 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	2
1.1.3.1 <i>Fusobacterium nucleatum</i> 'un Genel Özellikleri, Taksonomisi ve Enerji Metabolizması.....	2
1.1.3.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> 'un İltihaplı Hastalıklar İle İlişkisi.....	5
1.1.4 Periodontitis	5
1.1.4.1 Periodontitis Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	6
1.1.4.2 Periodontitis Kontrol ve Tedavi Yöntemleri.....	9
1.1.4.3 <i>Fusobacterium nucleatum</i> 'un Periodontitis'deki Rolü	10
1.1.4.4 Biyofilm Oluşumu ve <i>Fusobacterium nucleatum</i>	11
1.1.5 Antibiyotik Duyarlılığı ve Dirençliliği.....	12
1.1.6 Metabolik Enzimlerin Yeni İlaç Hedefi Olarak Kullanımı	13
1.1.7 Laktat Dehidrogenaz Enzimi	15
1.2 Tezin Amacı	16
1.3 Hipotez.....	16
BÖLÜM 2.....	17

MATERYAL VE YÖNTEM	17
2.1 MATERYAL.....	17
2.1.1 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler	17
2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar	19
2.1.3 Genomik DNA	19
2.1.4 Klonlama ve İfade Vektörleri	20
2.1.5 Mikroorganizmaların Gelişimi İçin Gerekli Besiyerleri	21
2.1.6 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	23
2.1.7 Primerler	26
2.2 YÖNTEM	26
2.2.1 Genomik DNA'dan Amplifikasyon	27
2.2.2 Etidyum Bromür Agaroz Jel Elektroforezi.....	27
2.2.3 Kristal Viyole ile Boyanan Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.2.3.1 DNA'nın Jelden Geri Kazanılması	28
2.2.4 <i>FnLDH</i> Geninin Klonlama Vektörüne (pGEM-T) Aktarılması	28
2.2.4.1 Amplifiye Edilen PCR Ürününe Adenin Kuyruğu Eklenmesi.....	28
2.2.4.2 Ligasyon.....	29
2.2.4.3 Kalsiyum Klorür Muamelesi ile Kompetant <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerinin Hazırlanması	29
2.2.4.4 Rekombinant DNA Plazmidinin <i>E. coli</i> DH5α Hücrelerine Transformasyonu	29
2.2.4.5 Gen Klonlamasının PCR ile Kontrolü	30
2.2.5 <i>FnLDH</i> Geninin İfade Vektörüne (pKK223-3) Aktarılması.....	30
2.2.5.1 <i>FnLDH</i> Geninin Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu	30
2.2.5.2 <i>FnLDH</i> Geni ve pKK223-3 İfade Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz İle Kesimi.....	31
2.2.5.3 Ligasyon.....	32
2.2.5.4 Rekombinant DNA Plazmidinin <i>E. coli</i> JM109 Hücrelerine Transformasyonu	32
2.2.6 <i>FnLDH</i> Geninin İkinci İfade Vektörüne (pLATE31) Aktarılması	32
2.2.6.1 PCR Primerlerinin Tasarımı	32
2.2.6.2 <i>FnLDH</i> 'ın Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saflaştırılması.....	32
2.2.6.3 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant DNA Plazmidinin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu.....	33
2.2.6.4 Gen Klonlamasının koloni PCR ve dizileme ile kontrolü	34
2.2.7 <i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin Ekspresyonu Ve Saflaştırılması	35
2.2.8 <i>Fusobacterium nucleatum</i> Birinci İfade Vektörü (pKK223-3) Aracılığıyla <i>E. coli</i> 'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması	35
2.2.9 <i>Fusobacterium nucleatum</i> İkinci İfade Vektörü (pLATE31) Aracılığıyla <i>E. coli</i> 'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması.....	36
2.2.9.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	37
2.2.10 Protein Konsantrasyon Tayini	38
2.2.11 Spektrofotometrik Yöntemle Enzim Aktivitesi Tayini	38

2.3	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin Homoloji Modellemesi	39
BÖLÜM 3.....		40
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....		40
3.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin (<i>FnLDH</i>) pGEM-T Vektörüne Klonlanması.....	40
3.1.1	<i>FnLDH</i> Geninin Genomik DNA'dan Amplifikasyonu	40
3.1.2	<i>FnLDH</i> Genini İçeren Klonlama Vektörünün Kompetan Hücreye Transformasyonu	41
3.2	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Analizi.....	42
3.2.1	Nükleotid Düzeyinde Analiz.....	42
3.2.2	Restriksiyon Enzim Kesim Profiline Analizi	43
3.2.3	Aminoasit Düzeyinde	45
3.2.4	Filogenetik analiz	49
3.3	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyon Vektörüne (pKK223-3) Klonlanması	49
3.3.1	<i>FnLDH</i> Geninin Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu	49
3.3.2	<i>FnLDH</i> Genini İçeren Ekspresyon Vektörünün (pKK223-3) <i>E. coli</i> JM109 Kompetan Hücrelerine Transformasyonu	50
3.3.3	Gen Klonlanmasının Dizi Analizi İle Kontrolü	51
3.4	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İkinci Ekspresyon Vektörüne (pLATE31) Klonlanması.....	51
3.4.1	PCR Primerlerinin Tasarımı	52
3.4.2	<i>FnLDH</i> Geninin Klonlama Vektöründen (pGEM-T) Amplifikasyonu ..	52
3.4.3	<i>FnLDH</i> Genini İçeren Ekspresyon Vektörünün (pLATE31) <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Kompetan Hücreye Transformasyonu	53
3.4.4	Gen Klonlanmasının Dizi Analizi İle Kontrolü	54
3.5	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyonu (pKK223-3 ifade vektörü)	55
3.6	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyonu (pLATE31 ifade vektörü)	56
3.7	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Protein Miktar ve Aktivite Tayini	57
3.8	<i>Fusobacterium nucleatum</i> Laktat Dehidrogenaz Enziminin Homoloji Modellemesi	60
3.9	Protein-Ligand Etkileşimleri	64
3.10	Tartışma ve Öneriler	68
KAYNAKLAR.....		71
EK A		76
ÖZGEÇMİŞ.....		80

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
bç	Baz çifti
g	Gram
kDa	KiloDalton
l	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mA	Miliamper
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
ε	Molar absorbsiyon katsayısı
Mw	Moleküler ağırlık
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
OD	Optik dansite
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
EtBr	Etidyum bromür
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>FnLDH</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> laktat dehidrogenaz
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogaltopyranoside
LDH	Laktat Dehidrogenaz Enzimi
MgCl ₂	Magnezyum klorür
T _m	Melting temperature
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
mRNA	Mesajcı RNA
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
Ni-NTA	Nikel nitrilotriasetik asit agaroz
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleikasit
SAB	Sample Amplification Buffer
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilmit jel elektroforezi
Rpm	Revolution per minute
TAE	Tris-Asetat-EDTA
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1 <i>Fusobacterium nucleatum</i> elektron mikroskobu görüntüsü	3
Şekil 1. 2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> glikoz metabolizması	5
Şekil 1. 3 <i>Fusobacterium nucleatum</i> 'un antibiyotik duyarlılığı	13
Şekil 1. 4 Piruvatın laktata çift yönlü olarak çevrilme reaksiyonu	15
Şekil 2. 1 O'GeneRuler DNA Ladder Mix ve Lambda DNA Hind III Digest	18
Şekil 2. 2 Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	18
Şekil 2. 3 pGEM®-T Easy klonlama vektörü	20
Şekil 2. 4 pKK223-3 ifade vektörü	20
Şekil 2. 5 pLATE31 ifade vektörü	21
Şekil 3. 1 PCR sonrası EtBr agaroz jel görüntüsü	41
Şekil 3. 2 Plasmid DNA'dan amplifikasyon sonrası EtBr jel görüntüsü	42
Şekil 3. 3 <i>FnLDH</i> restriksiyon enzimi kesim haritası	43
Şekil 3. 4 Tez çalışmasında belirlenen dizileme sonucu (2.sıra) ile <i>FnLDH</i> geni NCBI referans dizisinin (1.sıra) karşılaştırılması	44
Şekil 3. 5 LDH enziminin aktif bölgesinin gösterilmesi	46
Şekil 3. 6 <i>FnLDH</i> ile diğer LDH'lar ile karşılaştırmalı analizi	47
Şekil 3. 7 <i>FnLDH</i> ile üç boyutlu yapısı bilinen insan kas ve kalp kası LDH'ları ile karşılaştırmalı analizi	48
Şekil 3. 8 Filogenetik analiz	49
Şekil 3. 9 <i>FnLDH</i> geninin plasmid DNA'dan amplifikasyonu sonrası EtBr jel görüntüsü	50
Şekil 3. 10 pKK223-3 ifade vektörüne klonlanan <i>FnLDH</i> geninin amplifikasyonu sonrası EtBr jel görüntüsü	51
Şekil 3. 11 <i>FnLDH</i> Geninin ekspresyon vektörüne (pKK223-3) klonlanması sonrası analizi	52
Şekil 3. 12 <i>FnLDH</i> geninin plasmid DNA (pGEM-T)'dan amplifikasyonu sonrası EtBr jel görüntüsü	53
Şekil 3. 13 <i>FnLDH</i> genini içeren pLATE31 ifade vektörünün <i>E. coli</i> BL21(DE3) kompetan hücreye transformasyonu sonrası amplifiye edilen <i>FnLDH</i> geninin EtBr jel görüntüsü sonucu	54
Şekil 3. 14 pLATE31 ekspresyon vektörüne klonlanan <i>FnLDH</i> geni analizi	55
Şekil 3. 15 <i>FnLDH</i> enziminin ekspresyonu sonrası SDS-Page jel görüntüsü	56
Şekil 3. 16 <i>FnLDH</i> geni ekspresyonunun SDS-page analizi	57

Şekil 3. 17	Ni-NTA ile histidin işaretli proteinin etkileşimi şematik diyagramı.....	58
Şekil 3. 18	Saflaştırma sonrası jel görüntüsü.....	59
Şekil 3. 19	Saflaştırma sonrası jel görüntüsü.....	59
Şekil 3. 20	<i>Fn</i> LDH ile 3-boyutlu yapısı bilinen enzimlerin karşılaştırılması.....	61
Şekil 3. 21	<i>Fn</i> LDH'ın PyMOL ile oluşturulan 3-Boyutlu yapısı	61
Şekil 3. 22	<i>Fn</i> LDH RAMPAGE ile oluşturulan ramahandran grafiği	62
Şekil 3. 23	ERRAT program çıktısı	63
Şekil 3. 24	ProSA program çıktısı	63
Şekil 3. 25	Aminoasit dizisi pozisyonlarının ProSA ile gösterilen enerji grafiği	64
Şekil 3. 26	Protein ligand etkileşimleri	65
Şekil 3. 27	Model proteinin aktif bölgelerinin DoGSitescorrer görüntüsü.....	66
Şekil 3. 28	Muhtemel ligand bağlanma bölgesi. Ligand turuncu, ligandın etkileşimde bulunduğu rezidüler mavi ile gösterilmiştir.	66
Şekil 3. 29	Protein ligand etkileşim bölgeleri	67
Şekil 3. 30	98-109 residüleri arası bölgenin konak organizma olan insan kas laktat dehidrogenaz enzimi ile karşılaştırılması	67

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	<i>Fusobacterium nucleatum</i> genomik DNA'dan laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin çoğaltılması, PCR bileşenleri
Çizelge 2. 2	Adenin kuyruğu ekleme reaksiyonu
Çizelge 2. 3	Ligasyon reaksiyonu
Çizelge 2. 4	<i>FnLDH</i> Geninin Klonlama Vektöründen PCR
Çizelge 2. 5	<i>FnLDH</i> Geni ve pKK223-3 ifade vektörünün restriksiyon koşulları
Çizelge 2. 6	<i>FnLDH</i> 'ın Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu
Çizelge 2. 7	pLATE31 ekspresyon vektörü ve <i>FnLDH</i> geni ligasyon reaksiyonu
Çizelge 2. 8	Koloni PCR
Çizelge 2. 9	<i>FnLDH</i> enzim aktivitesi tayini
Çizelge 3. 1	Klonlanmış olan <i>FnLDH</i> geninin nükleotit dizisi
Çizelge 3. 2	Saflaştırma sonucu enzim miktar ve aktivite tayini

***FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* LAKTAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİN İZOLASYONU, KLONLANMASI VE ANALİZİ**

Emrah SARIYER

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Birçok iltihaplı hastalıklara sebep olan *Fusobacterium nucleatum* fusobakteri ailesinden, gram negatif ve obligatif anaerob bakteridir. İnvaziv ve pro-inflamatuar etkiye sahip bu anaerobik bakteri kolorektal karsinoma, periodontal hastalıklar ve perikardit gibi birçok yumuşak doku hastalığına sebep olmaktadır. Dünya sağlık örgütünün raporlarında göre, *Fusobacterium nucleatum* kaynaklı kolorektal kanser vakalarında 610.000'e yakın ölüme neden olmaktadır. Bu sebeple bakteriyel enfeksiyonu baskılamak amacıyla *F. nucleatum*'un metabolizmasının bilinmesi gerekmektedir. Laktat dehidrogenaz enzimi anaerobik glikolizis ve hücre içi biyomoleküllerin üretiminde önemli rol oynamaktadır. Bu enzim yeni ilaç tasarım çalışmalarında muhtemel hedef molekül seçilmiştir. Bu tez çalışmasında laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen *Fusobacterium nucleatum* genomik DNA'sından izole edilmiş, PCR ile amplifiye edilmiştir ve literatürde ilk defa standart protokol uygulanarak pGEM-T easy vector sistemine klonlanmıştır. Klonlanan *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz (*FnLDH*) enzimini kodlayan gen nükleotit ve aminoasit düzeyinde analiz edilmiştir. *FnLDH* aminoasit dizisinin insandaki eşdeğeri olan LDH ile karşılaştırılması ile 98-109 residüleri arasındaki enzimin aktif bölgesi önemli farklılıklar göstermiştir.

Gen ifadesi için *FnLDH* geni ekspresyon vektörü olan pKK223-3 vektörüne alt-klonlama yapılmış ve *E. coli* JM109 hücresinde ifadesi yapılmıştır. Hücrelerin sonikasyonu sonrası supernatant kısmında az miktarda protein gözlemlenmiş ve enzimin çoğu pellet

kismında bulunmuştur. Uygun sistemlerde gen ifadesi sonrası aktif ve çözünebilir fazda protein üretimi, yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarında oldukça önemlidir. Yapılan SDS-PAGE analizi sonucu 34.697 Da moleküler ağırlıktaki protein gözlemlenmiştir fakat yeterli miktarda üretim ve aktif enzim olmadığından, aLICator *L/C* ekspresyon sisteminin avantajlarından yararlanmak amacıyla *FnLDH* geni pLATE31 vektörüne klonlanmıştır. Çözünebilir fraksiyonda başarılı bir şekilde ifade edilmiş ve Ni-NTA agaroz kolonu kullanılarak % 95 oranında saflaştırılabilmektedir. Saflaştırılan 34.697 Da molekül ağırlığındaki *FnLDH* SDS-PAGE’de analiz edilmiştir. Saflaştırılan *FnLDH* enziminin spesifik aktivitesi, NADH ve piruvat kullanılarak ölçülmüştür ve daha sonraki kinetik analizler için yeterli aktivite görülmüştür.

Çalışmamızda üç boyutlu kristal yapısı bilinen *Lactobacillus casei* L-laktat dehidrogenaz kalıp alınarak *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enzimi için bir model oluşturulmuştur. Bu iki enzim arasındaki benzerlik %41’dir. Proteinlerin üç boyutlu yapısını modellemek için karşılaştırmalı modelleme prensibine dayanan homoloji modelleme yöntemi kullanılmıştır. Oluşturulan 3D yapısı MODELLER programı kullanılarak yapılandırılmıştır. Bu program yapısı belirlenmek istenen yapı ile bilinen yapıları karşılaştırarak model oluşturur. 3D boyutlu yapı ile ilgili değerlendirmeler ve düzeltmeler web tabanlı ERRAT, PROSA, HYPERCHEM ve RAMPAGE kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proteindeki muhtemel ligand bağlanma bölgeleri web tabanlı SiteFinder, Pocket-Finder ve DoGSiteScorer programları kullanılarak belirlenmiştir. 98-109 arası residüler ligandın bağlanması için en uygun bölge olduğu ve bu bölgenin insan kas LDH’ında eşdeğer bölgesinden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Mevcut çalışma *Fusobacterium nucleatum*’un enerji metabolizmasında laktat dehidrogenaz enziminin rolünün ve yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarında kullanılabilir uygulamaların anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Fusobacterium nucleatum*, laktat dehidrogenaz enzimi, gen klonlama, homoloji modelleme, yapıya dayandırılmış ilaç tasarımı

**ISOLATION, CLONING AND ANALYSIS OF THE GENE ENCODING LACTATE
DEHYDROGENASE ENZYME FROM *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM***

Emrah SARIYER

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Fusobacterium nucleatum is a gram-negative and obligative anaerobic bacteria species of fusobacteria phylum. This bacterium is invasive, proinflammatory and related with bowel disease, periodontitis and pericarditis. It is also known that *F. nucleatum* could be associated with colorectal cancer that is responsible for 610,000 deaths per year worldwide, according to the World Health Organisation. *F. nucleatum* metabolism needs to be further studied with the ultimate aim of blocking bacterial infection. Lactate dehydrogenase enzyme has a key role in anaerobic glycolysis and producing intracellular biomolecules in the bacterium. The enzyme has been chosen as a possible target for new drug design studies. In this thesis study, the gene encoding lactate dehydrogenase from *F. nucleatum* (*FnLDH*) has been successfully isolated from the genomic DNA by PCR and then cloned into the pGEM-T easy vector system using the standard protocols for the first time in the literature. *FnLDH* was analyzed at the nucleotide and amino acid levels. It was determined that the gene was consisted of 957 base pairs. Alignment of amino acid sequence of *FnLDH* to its counterpart in human showed a distinct sequence difference in the active site of the enzyme that is located between residues 98-109.

FnLDH gene was then subcloned into expression vector pKK223-3 and expressed in *E. coli* JM109 cells. A decent amount of protein was observed in the supernatant fraction, but most of the protein was found to be present in the pellet fraction following the sonication. Production of the active and soluble protein following expression of the

enzyme in an appropriate system is essential for the structure based drug design studies. Therefore, in this present study, 34.697 Da protein was observed on SDS PAGE following the protein purification. Because satisfying production of *Fn*LDH protein was not observed by using this system, *Fn*LDH was then cloned into the pLATE 31 vector in order to use advantages of aLICator *LIC* expression system. Protein was successfully expressed in soluble fraction and purified with over 95% purity using Ni-NTA agarose by affinity chromatography. The purified 34.697 Da protein was analyzed by SDS-PAGE. Specific LDH activity of purified enzyme was measured using NADH and substrate pyruvate at 340 nm. The enzyme was made available for further kinetic characterizations.

Homology modeling based on comparative modeling of protein three dimensional structures was used to generate a model of *Fn*LDH using crystal structure of L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* Identity between two sequences were 41%. Constructed 3D structure was built by MODELLER that models 3D dimensional structures with known structures. ERRAT, ProSA, RAMPAGE and HYPERCHEM softwares were used for the purpose of evaluation and refinement of 3-dimensional structure. Probable ligand binding sites on the protein were determined using web based software, Q-SiteFinder, Pocket-Finder and DoGSiteScorer. The region located between residues 98 and 109 was determined as most favoured ligand binding site. Modelling study further showed the same region being distinct from the same region present in human muscle LDH.

Present study may help to understand role of lactate dehydrogenase enzyme in *Fusobacterium nucleatum* energy metabolism and enables application of further studies on structure based drug design.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*, lactate dehydrogenase, gene cloning, homology modelling, structure based drug design

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Hastalıklar ile Mikroorganizmalar Arasındaki İlişki

İnsan bedeni birçok mikroorganizma için, özellikle anaerob bakteriler için büyük bir yaşam alanıdır. Her bireyde yaklaşık 10^{14} mikrobiyal hücre bulunmaktadır ve bu sayı 2 kg civarı hücre ağırlığı, 1000 den fazla türün var olduğunu ifade etmektedir [1]. Normal memeli yapıları ve fonksiyonları bu mikroorganizmalar ile kommensal bir yaşam sürdürmektedir ve bu mikroorganizmalar vücudun birçok yerinde kolonileşmişlerdir [2]. Bu ortak yaşam denge halindedir ve bazen bir koşul insan için uygun olurken bir diğeri konak organizma için uygun olmaktadır. Hücrelerimizin iç ve dış etkenlere karşı verdiği cevap inflamasyon olarak bilinir ve eğer kısa süreli olur ise tedavi edici etkiye sahiptir fakat kronik ve uzun süreli olduğu takdirde doku hasarına ve diğer hastalıklara neden olabilmektedir. Kronik inflamasyonun sebep olduğu birçok hastalık vardır ve bunlar; periodontitis, kolorektal kanser, metabolik hastalıklar (kardiyovasküler hastalıklar, obezite, diabet), artrit, Alzheimer, otoimmün hastalıkları (alerji ve astım). İnsan organ dokularında sıklıkla rastlanan türlerden bazıları şöyledir; *Bacteroides fragilis*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium perfringens*'dir [3].

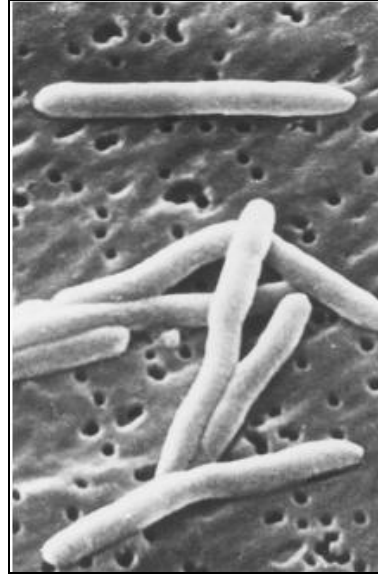
1.1.2 *Fusobacterium nucleatum* ve İltihaplı Hastalıklar

1.1.3 *Fusobacterium nucleatum*

Patojenik potansiyeli olan *Fusobacterium nucleatum* birçok yumuşak doku hastalıklarında önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda yapılan metagenomik çalışmalar sonucunda bu dokularda tespit edilmiştir. Bulunduğu dokudaki sayısı ve çoğalma hızı, dokuları tahriş edici maddeleri üretmesi, diğer bakteriler ile olan sinerjizmi, dokularda birikme kabiliyeti ve biyofilm oluşturma kabiliyeti gibi özelliklerinden dolayı patojenik potansiyele sahiptir [4], [5].

1.1.3.1 *Fusobacterium nucleatum*'un Genel Özellikleri, Taksonomisi ve Enerji Metabolizması

Fusobacterium nucleatum, *Bacteriaceae* ailesi ve *Fusobacterium* cinsi türlerindendir. *Fusobacterium*, *fusus* (spindle) kelimesinden ve *bacterion* (small rod) terimlerinden türetilmiştir. *Nucleatum* terimi ise ışık ve elektron mikroskobu altında çekirdekli görünüşünden dolayı türetilmiştir [4]. Bu cins mevcut 14 tür içermektedir ve genelde gram negatif, anaerobik özelliktedir ve memeli ağız dokusunda, sindirim sistemi dokularında görülmektedir. Bu türler; *F. canifelinum*; *F. equinum*; *F. genomosp. C1*; *F. genomosp. C2*; *F. gonidiaformans*; *F. mortiferum*; *F. naviforme*; *F. necrogenes*; *F. necrophorum*; *F. nucleatum*; *F. perfoetens*; *F. periodonticum*; *F. russii*; *F. simiae*; *F. ulcerans*; *F. varium* türleridir [4], [6]. Birçok çalışmada dişeti hastalıkları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu türlerden, yumuşak dokularda özellikle dişetinde *Fusobacterium nucleatum* türü ve alt-türleri izole edilmiştir. Bu türde *nucleatum*, *polymorphum*, *vincentii*, *animalis* and *fusiforme* olmak üzere 5 alt-tür bulunmaktadır [7], [8]. Spor oluşturmayan ve hareketsiz bir özelliğe sahip olan *Fusobacterium nucleatum* $2,4 \times 10^6$ bç genom büyüklüğüne ve genomda %27-28 civarında G+C içeriğine sahiptir. Birçok hücre 5 ile 10 µm uzunluğundadır ve oldukça keskin uçlu bir görünüme sahiptir. Koloni morfolojisi olarak bu türe ait spesifik bir yapı yoktur [4].



Şekil 1. 1 *Fusobacterium nucleatum* elektron mikroskobu görüntüsü [5]

Fusobacterium nucleatum, gram-negatif bakteri dış membran karakteristiğine sahiptir. Hücre zarı, peptidoglikan tabaka içeren periplasmik boşluk ile ayrılan iç ve dış membrandan oluşur. Genelde gram negatif bakterilerde iç membran simetrik fosfolipid tabakadan oluşur. Moleküler elek olarak işlev gören dış membran ise fosfolipidler, lipopolisakkaritler, lipoproteinleri ve proteinlerden oluşan asimetrik bir yapıya sahiptir. Dış membran kütesinin yaklaşık üçte biri proteinlerden oluşmaktadır [4].

Fusobacterium nucleatum karbonhidrat ve aminoasitlerinden enerjisini elde edebilir. Enerji eldesinde tercih edilen seçenek aminoasit katabolizması yoludur ve aminoasit varlığında karbonhidrat metabolizması inhibe olur. *Fusobacterium nucleatum* diğer anaerob bakterilere göre düşük düzeyde glikoz metabolizmasından faydalanır. Glikoz, galaktoz, fruktoz, N-asetilglukosamine, N-acetil-neuraminate, sitrat ve gliserol metabolize edilen şekerler arasındadır. Oluşan piruvat, piruvat-format liyaz ve L- ve D-lactat dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla format ya da laktata çevrilir. Piruvat, phosphoenolpiruvat karboksikinas enzimi ile oxaloasetat'a ve piruvat-flavodoksin oksidoreduktaz enzimi ile asetil koenzim A'ya çevrilir. Asetil-KoA anabolik amaçlar için (yağ asiti sentezi) kullanılabilir ya da asetat veya bütirata çevrilebilir [4], [9].

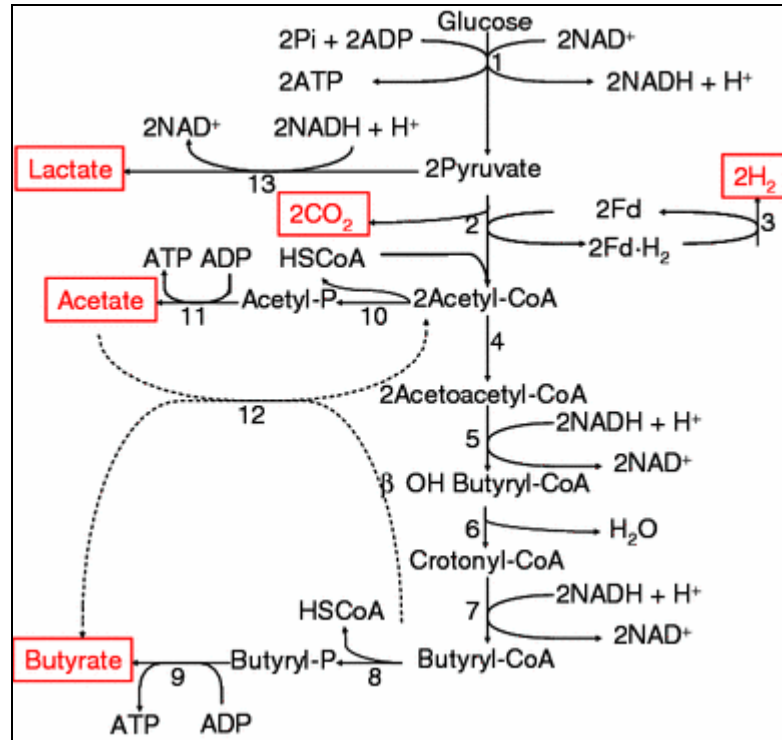
Fusobacterium nucleatum aminoasite bağlı karbonhidrat taşıma sistemine sahiptir ve anaerobik koşullar altında hücre içi polisakkarit üretimi vardır. Bu polisakkaritlerin

katabolize edilmesi de aynı enzimler ile kontrol edilmektedir ve bu polimerin katabolizasyonu sonucu oluşan ürünler bütirik, laktik, formik ve asetik asittir [4], [10].

Fusobacterium nucleatum karbonhidrat yokluğunda enerji kaynağı olarak aminoasitleri kullanarak gelişimini sürdürebilir. Histidine, glutamik asit, lisin ve serin enerji üretmek için kullandığı aminoasitler arasındadır ve büyük peptidler yerine di-peptidleri kullanmayı çoğunlukla tercih eder. Enerji metabolizmasında çoğunlukla peptid katabolizasyonu tercih etmesine rağmen bazı önemli endopeptidaz aktivitesinden yoksundur. Örnek olarak kazein ve albümin verilebilir [10].

Peptonların *Fusobacterium nucleatum* tarafından metabolizması sonucu (2-oxoglutarate yolağı) çoğunlukla ana ürün bütirik asittir fakat asetat, az miktarda propianat, suksinat, format ve kısa zincirli alkoller son ürün olarak görülebilir. Glutamat fermentasyonu 2-oxoglutarate yolağı ile glutamatın deaminasyonu ile başlar ve sonrasında 2-oxoglutarate indirgenmesi ile takip eder. Glikoz fermentasyonu metabolizması (Embden-Meyerhof-Parnas yolağı) sonucu piruvat, hidrojen ve asetil-KoA son ürün olarak görülür [9], [10].

Fusobacterium nucleatum aerobik ve anaerobik solunumu yapabilmektedir fakat aerobik solunum metabolizmasında önemli bazı protein komplekslerinden yoksundur. Aerobik solunum zincirindeki terminal sitokrome, quinol oksidaz ya da kompleks I, II, and III yapıları yoktur. Bu durumda bakteri normal oksijen konsantrasyonu altındaki büyümesi için NADH oksidazı kullanabilir. *Fusobacterium nucleatum* süper oksit dismutaz ya da katalaz enzimlerinin yokluğu yüzünden oksidatif stresleri biriktiremez ve bu sebeple NADH oksidaz peroksitlerin yok edilmesi mekanizmasında önemli rol oynar. Anaerobik koşullar altında elektron vericisi olarak arsenat redüktaz ve D- L- laktat dehidrogenaz görev alır [4], [9].



Şekil 1. 2 *Fusobacterium nucleatum* glikoz metabolizması [11]

1.1.3.2 *Fusobacterium nucleatum*'un İltihaplı Hastalıklar İle İlişkisi

Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, pepton ve karbonhidrat metabolizmasının ana ürünü bütiratır. Bütirat hücre fibroblast gelişimini engeller. Bu sebeple *Fusobacterium nucleatum* birçok hastalığın etiolojisinde önemli rol almaktadır [4], [12]. Epitel doku, mukozal koruma bariyerine sahiptir ve mukus doku yüzeyi üzerinde yarı geçirgen bir bariyer oluşturur [13]. Mukoz salınımını düzenleyen Muc2 genidir ve bu genin ekspresyonunu bütirat değiştirmektedir. Böylelikle mukozal denge bozularak immun cevabı kontrolsüz hale getirmektedir [14]. Ortamdaki bütirat histone deasetilaz aktivitesini engelleyerek, inflamasyonu ve immun cevabı başlatan NF-κB (nuclear factor κB) aktivitesini baskılar ve bunun sonucunda anti-inflamatuar etki oluşacaktır [15].

1.1.4 Periodontitis

Periodontitis; dişleri saran ve destekleyen doku olan diş eti dokusunun inflamasyonu olarak bilinir. Dişeti hastalıkları terimi periodontal dokudaki tüm patolojik koşulları kapsar ve periodontitis, gingivitis terimleri farklı anlamlar için kullanılmaktadır. Gingivitis, dişlerde aşırı plak oluşumundan kaynaklanan diş epitelinde görülen

inflamasyondur. Bu hastalıkta diş fırçalaması sonucu kolaylıkla diş etleri kanayabilmektedir. Periodontitis ise daha ileri düzeyde bir diş eti hastalığıdır. Belirtilerinde diş etlerinin dişin üstüne doğru çekilmesi, diş kavitesinde ve köklerinde bakterileri kolonileri gözlemlenmesi olarak sayılabilir. Bu belirtiler sonucunda gereken önlem alınmadığı takdirde diş kaybı ve sistemik hastalıklar yaşanabilmektedir [16].

Diş plağı yüzlerce farklı bakteri birikimi ile karmaşık bir mikrobiyal biyofilmdir. Dişeti epitelinde bakteriler yoğun bir şekilde kolonileşmektedir. Bunun sonucu olarak bu hücreler bakteri varlığına, antimikrobiyal peptidler ve sitokinler üreterek bir tepki vermektedir. Periodontal hastalık oluşan biyofilimde patojen bakteriler ile konak bağışıklık sistemi arasındaki dengenin bozulmasından ileri gelmektedir ve bu dişeti epiteli hücrelerinin enflamasyonu ile sonuçlanmaktadır. Savunma mekanizmasının bir parçası olarak, epitel dokuya zarar veren aşırı proteolitik enzim aktivitesinden korumak için dişeti epitel hücrelerinden spesifik endojenik serin proteaz inhibitörleri salgılanır [17].

Fiziksel ve anatomik bariyerler genellikle patojenlerin dokulara saldırısını önler. Diş epitel doku ilk savunma basamağıdır ve daha alttaki dokulara karşı koruma sağlar. Hücrelerin çevreyle ilişkili hücre sinyallerini düzenleyen mukozal epitel hücreler doğal bağışıklık sisteminde önemli rol oynamaktadır. Dişleri çevreleyen çok katmanlı bir diş eti epitel dokusu vardır ve bu doku diş plağında patojenik mikroorganizmalara karşı koruyucu bir bariyer olarak görev alır. Epitel hücrelerinin salgıladıkları antimikrobiyal peptidler hastalıklı ve sağlıklı durum arasındaki dengenin sürdürülmesinde önemli katkı sağlar [18] [19].

1.1.4.1 Periodontitis Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Epidemiyoloji; bir popülasyondaki hastalıklı ve sağlıklı bireylerde çeşitli biyolojik, demografik, çevresel ve hayat biçimi çalışmalarıdır. Bir çalışma metodu olarak epidemiyolojinin temel özellikleri, klinik araştırmalar ve vaka çalışmaları karşılaştırıldıklarında; çalışmalar bireylerden çok gruplara odaklıdır, hastalardan ziyade belirli bir hastalık grubuna dahil olan ve olmayan, tedavi gören ve görmeyen kişiler ile ilgilidir. Epidemiyolojik çalışmalar, popülasyonun sağlık durumunu tanımlamak, hastalık etiyojisini açıklamak, risk faktörlerini belirlemek, hastalığın görülme sıklığını tahmin

etmek, hastalığı önleme ve kontrol yöntemlerini belirlemeye yardımcı olmak gibi başlıkları içermektedir [20].

Dünya nüfusunda yaklaşık olarak % 30-50 arası sıklıkta periodontal hastalıklar görülmesine rağmen % 5-15 arası popülasyonda ileri düzeyde bu hastalık devam etmekte ve diş kaybına neden olmaktadır [21].

Periodontitis, dünyada en yaygın ikinci hastalık olarak bilinmektedir. Her yaş grubunda oluşmakla beraber yetişkin ve yaşlılarda daha sık rastlanmaktadır. Kronik periodontitis demografik yapıya göre çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilik bölgelerin mikrobiyal etiyolojisi ve oluşan risk faktörleri ile ilgilidir. Çocuklar arasında batı Avrupa'da ve kuzey Amerika'da düşük düzeydedir fakat Afrika'da ve Latin Amerika'da daha fazla gözlemlenmiştir. 11-15 yaş grubunda; Batı Avrupa'da % 1-3, Kuzey Amerika'da % 2-5, Güney Amerika'da % 4-8, Asya'da % 5-8 ve Afrika'da % 10-20 sıklığında bu hastalığın etkilendiği görülmüştür. Etnik gruba göre; % 1-3 Kafkas, % 5-8 Asyalı, % 5-8 İspanyol ve Latin Amerikan, % 8-20 afrikalı ve Amerikan afrikan ırklarını etkilemektedir. Ataşman kaybı (dişetinde çekilme) $\geq 4-5$ mm arasında olan yetişkinlerde (18-64 yaş) % 24-14, yaşlılarda (65 yaş ve üstü) % 68-52 sıklığında gözlemlenmiştir. Sondalama derinliği ise $\geq 4-5$ mm arasında olan yetişkinlerde (18-64 yaş) % 14-4, yaşlılarda (65 yaş ve üstü) % 22-8 sıklığında gözlemlenmiştir. Ayrıca yetişkinlerin %84'ünde, yaşlıların %89'unda diş taşı oluşumu tespit edilmiştir [21] [22].

Kronik periodontitis multifaktöriyel bir hastalıktır. Dental plaktaki mikrobiyal atıklar ve mikroorganizmalar, diş kaybından neden olan inflamasyonun başlamasından sorumlu temel etiyolojik faktörlerdir. Periodontal hastalığın etiyolojisinde 3 temel faktör olduğu öngörülmüştür. Bunlar; konak dokunun mikroorganizmaya duyarlılığı, patojenik türlerin varlığı ve yararlı mikroorganizmaların varlığı olarak tanımlanabilir. Sağlıklı diş etinde oluşan biyofilmde gram pozitif bakteriler (*Streptococcus spp.* ve *Actinomyces spp.*) çoğunluktadır. Ayrıca, zorunlu anaerob, gram negatif ve hareketli mikroorganizmalar hastalığın derecesi ile orantılı olarak sayıları artmaktadır. Diş eti altı mikrobiyal florasında ise patojenik türler yer almaktadır. Tespit edilen gram negatif türler şöyledir; *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga*

species, Campylobacter rectus. Bu mikroorganizmalar direkt olarak dokuya saldırarak veya dolaylı olarak bakteriyel enzimler ve toksinler ile hastalık oluşturabilir [23].

Risk faktörleri; sonradan oluşacak hastalıkların artış oranı ile ilişkilendirilen karakteristiği olarak tanımlanabilir. Risk faktörleri değiştirilebilir ve değiştirilemez olarak sınıflandırılabilir. Değiştirilebilir faktörler genellikle çevresel ve davranışsal etkenlerdir. Oysaki değiştirilemez faktörler genellikle bireye özgüdür ve kolaylıkla değiştirilemezler. Değiştirilebilir risk faktörleri sigara, diyabet, oral hijyen, spesifik mikroorganizmalar, fizyoloji faktörler, obezite, genetik faktörler, yaşlılık ve cinsiyettir [20], [20], [22].

Sigara; birçok çalışmada ataşman kaybı (diş eti çekilmesi) ile ilişkilendirilmiştir. Sigara içen grubunda kronik periodontal hastalığının oluşma oranı yüksektir. Yapılan çalışmalar sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre hastalığı 2 ile 7 kat arasında artırdığını göstermiştir. Diyabet gibi sistemik hastalıklar ataşman kaybını artırdığı bildirilmiştir. Diyabet tedavi edilememesine rağmen, kontrol altına alınabildiği için değiştirilebilir faktördür. Dental plak ve oral hijyen; dental plak büyümesi ve diş eti doku inflamasyonu popülasyonun yaşı, cinsiyeti ve ırkı ne olursa olsun ilişkisi birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Aynı zamanda popülasyonlar oral hijyen ile gingivitis arasında da doğrusal bir ilişki vardır. Oral hijyen ağızdaki mikrobiyal flora ekolojisini etkileyerek bu hastalığını başlamasını veya ilerlemesini direkt olarak etkilemektedir. Spesifik mikroorganizmalar; periodontal hastalıkların başlaması ve ilerlemesi için oral biyofilm birikmesi ve gelişimi olması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda bakteri türlerinin kolonileşmesi bu hastalıkların patogenezinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Fizyolojik faktörler; bireyler fizyolojik stres altındaki bireylerde ataşman ve alveolar kemik kaybının geliştiği klinik olarak ispatlanmıştır. Bu bağlamda artan fizyolojik stres IL-6 (Interleukin 6) üretimini tetiklemektedir. Obezite; modern toplumlarda yaygın olarak görülen obezite periodontal hastalıkların patogenizinde önemli bir faktör olduğu gözlemlenmiştir. Obeziteye bağlı hastalıkların (hipertansiyon ve diyabet) oluşması ile periodontal hastalıklar oluşmaktadır. Değiştirilemeyen risk faktörleri, genetik faktörler; periodontal hastalıklarda etiyolojik ajan olarak bakteriyel enfeksiyonlar olması ile birlikte konak dokudaki faktörlerde hastalığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Konakta var olan birkaç gen polimorfizmi ile periodontal hastalıkların ilişkili olduğu

bulunmuştur. IL-1 gen bölgesindeki polimorfizm bu hastalığın ilerlemesine neden olduğu tespit edilmiştir. Yaşlılık; yaş ile periodontal arasındaki ilişki direkt bağlantılı değildir. Fakat yaşam boyunca biriken hastalıklar ile hastalığın arttığı bildirilmiştir. Diş dokusunda gerçekleşen yıkım ve kayıplar ile ilerleyen yaşlarda periodontal hastalıkların gerçekleşme oranları arttığı gözlemlenmiştir. Cinsiyet; bazı çalışmalarda yetişkinlerde cinsiyet ile ataşman kaybının ilişkisi periodontal dokunun yıkımı erkeklerde daha fazla olduğu şeklinde belirtilmiştir. Cinsiyete bağlı genetik yatkınlık ve diğer davranışsal faktörler olarak bildirilmiştir [20], [21], [22], [23], [24].

1.1.4.2 Periodontitis Kontrol ve Tedavi Yöntemleri

Periodontal hastalıklar insanda çok yaygın kronik bir rahatsızlıktır ve birincil etiyolojik faktörü immun cevap oluşturan mikrobiyal dental plaklıdır. Toplumun % 10-60 görülme sıklığı olan periodontal hastalıklar diş dokusunun yıkımına ve sonrasında diş kaybına neden olabilmektedir. Bu hastalığın, kolaylıkla tedavi edilebilen türünden çok şiddetli geri dönüşü olmayan çok şiddetli türüne kadar çok çeşitli evreleri ve durumları vardır. Periodontal hastalıklara sebep olan tüm durumlar bir önceki bölümde açıklanmıştır ve buna ek olarak konak antibakteriyel savunma mekanizmasını tetikleyen medikal koşullar söylenebilir. Nötrofil bozuklukları ve HIV virüs enfeksiyonu örnek verilebilir [25].

Periodontal hastalıkların tanısı için, sondalama derinliği (probing depth) hastalığın ne kadar ilerlediği hakkında en iyi bilgiyi vermektedir. Sağlıklı bir diş eti dokusunda diş etinden herhangi bir çekilmenin olmaması ve sondalama derinliğinin en fazla 1-3 mm arası olması gerekmektedir. Sondalama derinliğini 4 mm fazla olan hastalar için periodontitis ve 6 mm den fazla olan hastalar için ise şiddetli ve ilerlemiş periodontitis tanısı konmaktadır [22].

Erken tanı birçok periodontal hastalıklar için önem taşımaktadır ve başarılı bir tedavi ile sonlanmaktadır. Tedavi edici hedefler bakterileri ve diğer risk faktörlerini ortadan kaldırmaktır ve hastalığın yenilenmemesi için bu faktörleri kontrol altında tutmaktır. Çok şiddetli durumlarda diş eti dokusunun yenilenmesi zorunlu hale gelmektedir. Cerrahi olmayan tedaviler özel temizleme teknikleri ile olmaktadır. Destekleyici tedavi araçları olarak antiseptik ağız temizleme suları, iyileşme sürecine yardımcı olan ve

inflamasyonu baskılayıcı ya da enfeksiyonu daha ileri düzey kontrol yöntemleri sayılabilir. Bu tedavilerde daha çok antibiyotiklere başvurulmaktadır. Daha çok kullanılan tetrasiklin, amoksisilin, metronidazol antibiyotikleridir [25].

1.1.4.3 *Fusobacterium nucleatum*'un Periodontitis'deki Rolü

Fusobacterium nucleatum periodontal patojen olma potansiyeli yüksek anaerob bakteri türlerindendir ve bu bakterinin en önemli özelliklerinden biri toksik metabolitler üretmesidir. Üretilen bu toksik metabolitler konak organizmanın diş eti epitelinde direkt olarak hastalığa sebep olmaktadır. *Fusobacterium nucleatum* tarafından üretilen bütirat, propionat ve amonyum iyonları insan diş eti fibroblast oluşumunu engeller ve dokuya penetre olarak koloni oluşumuna neden olur. Toksik metabolitlerin yanı sıra *Fusobacterium nucleatum* konak dokuya bağlanır ve konak dokunun membranını yıkabilir [4].

Epitel hücreler bakterilere karşı şu yollar ile cevap verirler; monosit ve nötrofilleri aktive eden kemokinler olarak bilinen antimikrobiyal peptidler üreterek immun sistemi harekete geçirirler. Antimikrobiyal peptidler sağlıklı ve hastalıklı durum arasındaki dengeyi sağlamada katkı sağlarlar. Epitelde salgılanan α -defensin ve nötrofilde salgılanan katelisidin LL-37 tükürükte var olan antimikrobiyal peptidlerdir. Periodontal hastalıklarda en fazla çalışılan bakterilerden olan *Fusobacterium nucleatum* periodontal epitelde dominant bakteridir. Diş eti epiteli bakteriyel biyofilme maruz kaldığında periodontal sağlığın korunması için bazı antimikrobiyal peptidlerin önemi vardır. Bu peptidler arasında defensinler oral epitelde ilk tanımlanan antimikrobiyal peptidlerdir ve doğal bağışıklığın temelini oluştururlar. Defensinler, dentritik ve hafıza T hücrelerini uyaran ve sonradan kazanılan immun sistemine de katılırlar. h β D-2 geni nükleer transkripsiyon faktörü NF-kB 'ne cevap verir ve lipopolisakkaritleri ve proinflamatuvar sitokinleri (Tumor nekroz faktör alfa (TNF α) interleokin 1 β (IL-1 β)) aktive eder. β -defensinler doğal ve sonradan kazanılan bağışıklık arasında bağ oluşturmaktadır. Bu peptidler 41-50 aminoasitten oluşur ve 3 disülfid bağı ile üç boyutlu yapısını kazanırlar. β -defensinler insanda 4 farklı tip olarak yer almaktadır (h β D 1-4). Yapılan çalışmalarda, erken koloni oluşumunda bakteriler bu peptidlere karşı duyarlıdır. İn vitro çalışmalarda, h β D-2 ve h β D-3 peptidlerine, anaerob bakterilere göre

aerob bakteriler daha duyarlıdır. Fakat *Fusobacterium nucleatum* bazı türlerinin h β D-3 antimikrobiyal peptidine aşırı duyarlı olduğu tespit edilmiştir [19].

Fusobacterium nucleatum proinflamatuvar mediatörleri üretimini tetikler. Bunlar; interlökin (IL)-1, IL-6, IL-8 tümör nekroz faktör alfa (TNF α) dır. Bu bakteriyi konak organizmalar Toll benzeri reseptörler ((TLRs)-2-4) ile tanımlayabilmektedir. İn vitro çalışmalarda, TLR-2 aktivasyonu antimikrobiyal peptid olan β -defensinler-2 ve 3 ü salınımını artırdığı gözlemlenmiştir [26].

1.1.4.4 Biyofilm Oluşumu ve *Fusobacterium nucleatum*

Ağız mikroflorasında 500 den fazla mikroorganizma taksonu tanımlanmıştır ve çoğunluğu anaerobik gram-negatif türleridir. Erken kolonileşmede diş yüzeyi gram pozitif, non-patojenik bakteriler olan *Treptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguis* ve *Streptococcus oralis* türlerinden oluşan bir biofilm vardır. Bu başlangıç kolonileşmesi gram negatif anaerob (*Fusobacterium nucleatum* ve *Porphyromonas gingivalis*) bakterilerin daha etkin bir şekilde kolonileşmesine yardımcı olur. Konak organizmanın savunma mekanizmalarına dayanıklı olan anaerobik bakteriler dokulara bağlanarak kolonileşmeye neden olmaktadır. Periodontal hastalıkların ilerlemesinde en önemli etken bu kolonileşmedir [17], [27].

Biofilm oluştuktan sonra mikroorganizmalar konak organizmanın savunma sistemini karşı dirençli olmakla birlikte antimikrobiyal ajanlara karşı da dirençli hale gelirler. Konak bağışıklık sisteminin bakterilere olan cevabı enflamasyon ve çevre dokunun yıkımı ile sonuçlanır. Bu yıkım sonucu bakteriler periapikal (diş kökü) bölgeyi infekte eder ve burada biofilm oluştururlar. Buradaki biofilmi yok etmek zorlaşır ve tedavilere cevapsız kalmaktadır. Periapikal lezyonlarda tespit edilen *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, ve *Streptococcus spp* anaerob bakterileri bu mikroorganizmalarından bazılarıdır. *Fusobacterium nucleatum* bu türler arasında köprü organizma olarak adlandırılır. Özellikle *Fusobacterium nucleatum* ve *Porphyromonas gingivalis* arasında spesifik bir ilişki vardır [9] [28].

Kolonileşme, bakterilerin yüzey proteinlerinden olan adhesin proteini tarafından kontrol edilir ve kolonileşmenin ilk basamağıdır. Karbonhidrat bağlayan lektinler bu yüzey proteinlerindendir. *Fusobacterium nucleatum* hemaglutinasyon aktivitesi göstererek kümeleşir ve oral epitele bağlanırlar. Bağlandıkları dokuda sonrasında hemolitik etki gösterirler [4]. *Fusobacterium nucleatum* ve *Porphyromonas gingivalis* kolonileşmesi laktöz bağlayan adhesinler ile kontrol edilir [9].

1.1.5 Antibiyotik Duyarlılığı ve Dirençliliği

Fusobacterium nucleatum yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe duyarlılığı vardır fakat bazı antibiyotiklere karşı duyarlılık azdır yada dirençlidir. Bu antibiyotikler vankomisin, neomisin, eritromisin, amoksilin, amfisilin ve fenoksimetilpenisilin. *Fusobacterium nucleatum* bazı soyları penisilaz ve β -laktamaz üretirler. Biapenem, imipenem ve trospektomisin *Fusobacterium nucleatum*'a karşı aktif olarak kullanılabilirler fakat yaygın olarak kullanılan kloramfenikol ve metronidazol.

Antimikrobiyal ajanlar, periodontal tedavide tek başına yada gelenekler tedavi yöntemleri ile beraber kullanılabilirler. Tedaviye yardımcı olarak en yaygın kullanılan ajan geniş spektrumlu bakterilerde protein sentezini inhibe eden tetrasiklin antibiyotığıdır. Uzun dönemli kullanımlarda bu antibiyotiğe karşı dirençlilik oluşmaktadır. Periodontal hastalardan alınan örneklerde tetrasikline dirençli *Fusobacterium nucleatum* soyları bulunmuştur ve bu soylar tetrasikline karşı ribosomları koruyan proteini kodlayan *tetM* geni taşırlar. *Fusobacterium nucleatum* dış membran proteinleri β -laktam grubu, tetrasiklin, kloramfenikol ve hidrofilik kuinolonlar gibi antibiyotiklerin hücre içine girişini düzenlerler [4], [9].

Klorheksidin dental plak oluşumunu engellediği kısa ve uzun dönemli klinik çalışmalarda gösterilmiştir ve *Fusobacterium nucleatum*'a efektif olarak kullanılabilir olduğu ifade edilmiştir [4], [29].

Sadece belirli dokularda oluşan bakterilerde tetrasiklin gibi bakteriyostatik antibiyotiklerin kullanımı periodontal hastalıklara karşı önerilmemiştir. Çünkü antibiyotiğe karşı dirençli soyların gelişimi artma olasılığı vardır [4], [9].

Fusobacterium nucleatum heterojenik bir türdür ve β -laktamaz üreten türleri ve üretmeyen türleri aynı komensal florada bulunabilir. Yapılan çalışmaların sonucunda, çocuklarda yaygın olarak kullanılan penisilin antibiyotiği bu tedavide kullanıldığında, β -laktamaz üreten soyları gelişecektir ve antibiyotik tedavisi sonuçsuz kalacaktır [30] [31].

Periodontitis hastalıklı köpek ağzında izole edilen *Fusobacterium nucleatum* hücrelerine eritromisin (8mg/mL) ve klaritromisin (8mg/mL) antibiyotikleri muamele edilerek yapılan çalışmada bu antibiyotiklere karşı *Fusobacterium nucleatum* dirençlilik gösterdiği belirlenmiştir [32].

Antibiyotikler	% Dirençlilik
Amoksilin	0
Amfisilin	3,8
Amoksilin/klavunat	0
Sefoksitin	0
Klaritromisin	%96
Klindamisin	0
Eritromisin	%96
Metronidazol	0
Penisilin	0
Tetrasiklin	0

Şekil 1. 3 *Fusobacterium nucleatum*'un antibiyotik duyarlılığı [32]

1.1.6 Metabolik Enzimlerin Yeni İlaç Hedefi Olarak Kullanımı

Geleneksel olarak, yeni ilaç adayları doğal ürünlerin biyolojik etkilerinin kazara gözlemlenmesi sonucu oluşmaktadır. Yani, ilaç araştırmalarında daha çok tesadüfler ön planda olmaktadır. Daha sonraki aşamada endojen efektör molekül yapıları, yeni reseptör agonistleri ve antogonistlerinin dizaynı için şablon olarak alınır. 1973 lerde ilk olarak protein ligandlarının yapıya dayandırılmış dizaynları denenmiştir. Yapılan çalışmada 2,3 difosfogliserat (2,3-DPG) hemoglobin kompleksinde yararlanılmış ve allosterik bir molekül olan 2,3-DPG molekülünün fonksiyonlarını taklit eden basit bir aromatik dialdehit türetilmiştir. Moleküler temelli ilaç tasarımıındaki ilk başarılı deneme

antihipertansiyon ilacı anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörü olan captopril molekülüdür [33], [34].

3-boyutlu yapısı bilinen proteinlerin sayısı günümüzde hızla artmaktadır. Bu artış protein kimyası, gen teknolojileri ve yapı belirleme tekniklerinin gelişmesi ile paralel gerçekleşmektedir. Bu metodolojik gelişmeler ile istenilen proteinlerin yapılarının belirlenmesini yada homoloji modellemesi çok kısa zaman içinde yapılabilmektedir. Bu çalışmalar hastalık tedavilerinde yeni potansiyel hedefler oluşturmaktadır. Günümüz çalışmalarında proteinlerin dizi-yapı-fonksiyon çalışmaları hız kazanmıştır ve 3-boyutlu yapısı bilinen yapıların sayısını arttıracaktır. İnsan genom projesinin sonlanması ile proteomik ve yapısal genomik çalışmaları hız kazanmıştır ve bilgi teknolojilerindeki gelişim moleküler hedefli ilaç dizaynı çalışmalarına ivme kazandırmıştır. Bu gelişmeler ile beraber, bu hedef için genler hızlı bir şekilde klonlanabilmekte, protein ekspresyonu ve saflaştırması yapılabilmektedir. Ayrıca kristalografideki tüm basamaklardaki otomasyon, daha yoğun senkrotron radyosunu ve faz belirlemedeki yeni gelişmeler gibi ilerlemeler yapı tayininindeki süreyi kısaltmıştır. Yapı tayininde kullanılan nükleer manyetik rezonans (NMR) metodundaki gelişmeler ise daha büyük yapıları tayin etmede yardımcı olmaktadır [35], [36].

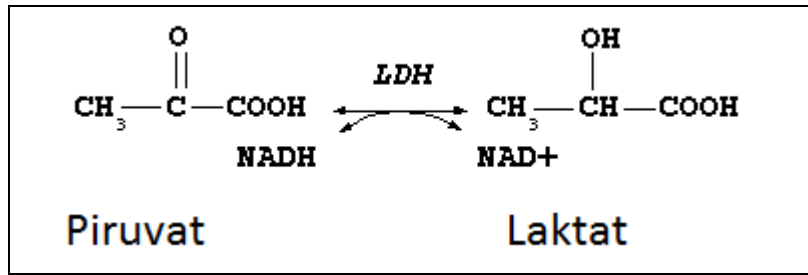
Moleküler hedefli ilaç tasarımındaki basamaklar; klonlama, ekspresyon, saflaştırma ve hedef proteinin yapısını belirleme şeklindedir. Yapı tayininde üç temel metod vardır ve bunlar kristalografi, NMR ve homoloji modellemesidir. Bilgisayar algoritmaları kullanarak, bir databazdan alınan bileşiklerin yapının seçilen bölgesinde konumlanması sağlanır. Bu bileşikler, onların sterik ve hedef bölge ile elektrostatik etkileşimler temel alınarak sınıflandırılır ve en iyi bileşik biyokimyasal yöntemler ile test edilir. İkinci olarak; ilk basamakta elde edilen şablon yapının yapısının belirlenmesi ve in vitro koşullarda en az bir inhibisyon belirlenmektedir. Ek olarak bu yapıların optimizasyonu yapılması gerekmektedir [35].

Bu çalışmalar sonucu protein-ligand komplekslerinde moleküler tanıma prensipleri anlaşılmış olur. En hızlı yol olan homoloji modelleme ile belirlenen 3-boyutlu yapı kullanılarak yeni ligandlar tasarlanır. Ligand ile hedef moleküldeki bağlanma bölgesi arasında geometrik olarak mükemmel bir uyum olması, moleküler elektrostatik

potensiyel uyumluluğu, fonksiyonel gruplar arasındaki ve lipofilik yüzeyler arasındaki hidrofobik etkileşimler hidrojen bağ formasyonu gibi özelliklerin olması gerekmektedir. Hidrofobik etkileşimler bağlanma afinitelerini daima artırır iken, hidrojen bağlarının toplam serbest enerjiye katkısı yeni oluşan hidrojen bağlarının enerjilerine bağlıdır [33], [36].

1.1.7 Laktat Dehidrogenaz Enzimi

Laktat dehidrogenaz glikoliz sonucu oluşan piruvatı laktata çift yönlü katalizleyen bir enzimdir. Bu reaksiyon ile glikoliz sonrası oluşan NADH NAD⁺a yükseltgenerek anaerobik glikolizin devamlılığı sağlanmaktadır (Şekil 1.4). Bu reaksiyon *Plasmodium*'ların temel enerji yolağıdır ve yaşam döngüsünde hayati bir öneme sahiptir. Bu nedenle ilaç tasarım çalışmalarında bu enzim hedef olarak seçilmiştir [37], [38].



Şekil 1. 4 Piruvatın laktata çift yönlü olarak çevrilme reaksiyonu

Bu çalışmalarda parazitin LDH enzimi ile konak LDH'ı arasındaki farklılıkların analizi gerçekleştirilmiştir. *Plasmodium falciparum* için yapılan analizde serin-108 ve arjinin-109 arasında ilave 5 aminoasitin enzimin katalitik halkasına yakın yüzeyinde çok belirgin bir yarık oluşturduğu ve fakat konak organizma insandaki eşdeğeri olan LDH'da ise aynı bölgede hiçbir ilave amino asit olmadığı tespit edilmiştir [39]. Bu farklılıktan faydalanılarak gossipol türevi olan gossilik nitril-1,1' diasetat'ın (GNDA) malarial LDH'ın belirlenen bu açıklık ile etkileşebileceği fakat konak organizma olan insan LDH'larında bu açıklık bulunmadığı için bu inhibitörün LDH ile etkileşemeyeceği belirlenmiştir [40]. Bu inhibitör kullanılarak konak organizma için laktat dehidrogenaz piruvatı katalizleyerek laktata çift yönlü olarak dönüşümü ile NAD⁺ rejenerasyonu devam ederken *Plasmodium falciparum* gelişimi baskılanmış olmaktadır [40].

Bir diğerk çalışma olarak, inhibitör molekül olarak azol bazlı bileşikler *Plasmodium falciparum* laktat dehidrogenaz enziminin NAD⁺ kofaktörünün nikotinamid halkasını hedef alarak enzimin aktif bölgesine yerleştiğı kristalografik çalışmalar ile gösterilmiştir. Invitro çalışmada, azol bazlı bileşiklerin *Plasmodium falciparum* laktat dehidrogenaz enzimini inhibe ettiğı gösterilmiştir fakat konak organizma olan insan laktat dehidrogenaz enzimini inhibe etmesi için yaklaşık 100 kat konsatrasyonda azol bazlı bileşikler ile muamele edilmesi gerekmektedir [41], [42].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, ürettiğı metabolitler ile dokularda inflamatuvar etkisi olan *Fusobacterium nucleatum*'un neden olduğı hastalıklardan periodontal hastalıklara karşı yeni alternatif tedaviler için aday olabilecek öneriler sunmaktır. Aday molekül olan laktat dehidrogenaz geninin klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması, aktivite tayini yapılmış ve 3 boyutlu yapısı homoloji modelleme yöntemleri ile tanımlanmıştır. 3-boyutlu yapısı belirlenen *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgeleri ve konak organizmadan farklılıkları belirtilmiştir. Bu bilgilerden yararlanılarak ileriki çalışmalarda yapıya dayandırılmış ilaç tasarımlarında bir modelin oluşturulması için öncül bir çalışması olması hedeflenmektedir.

1.3 Hipotez

Bu çalışma ile laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen *Fusobacterium nucleatum*'dan izole edilerek dizi analizinin yapılması sonucunda yeni bir ilaç tasarımına yönelik hedeflerin belirlenmesi için yaklaşımlar sunabileceğı öngörülmektedir. Bu çalışmada önerilen 3-boyutlu yapı temel alınarak enzim inhibisyon çalışmalarının yapılabileceğı ve bu inhibitörlerin *in vitro* çalışmalarda test edilip, *Fusobacterium nucleatum* neden olduğı periodontal hastalıklar için bir ilaç tasarımının önünü açacağı tahmin edilmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

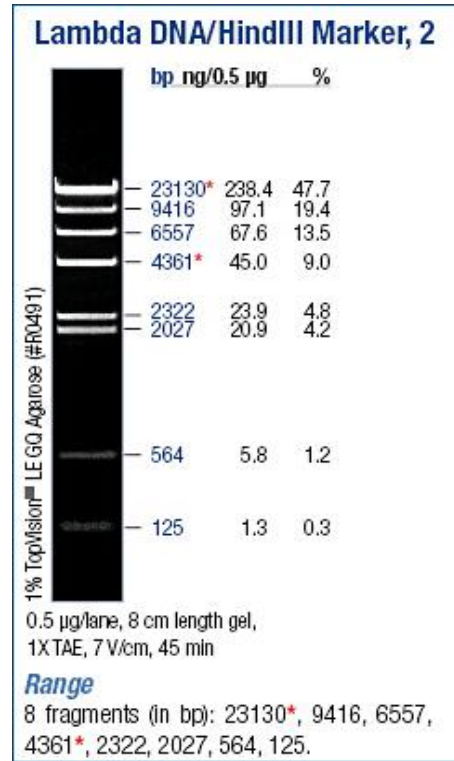
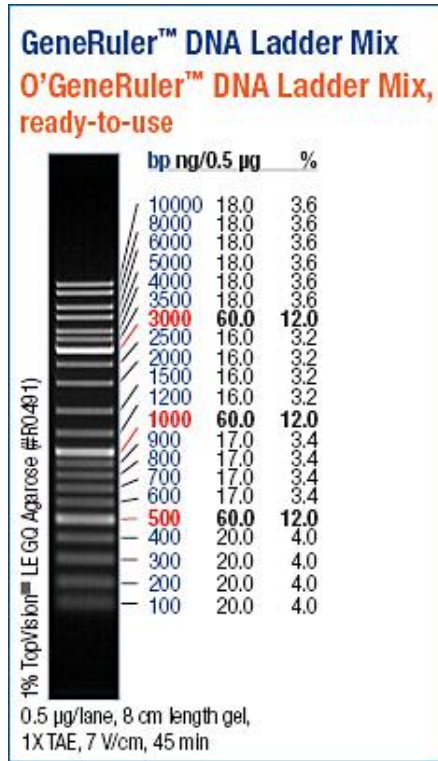
2.1 MATERYAL

2.1.1 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler

Plazmid DNA izolasyonunda QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), PCR ürünlerinin jelde yürütüldükten sonra saflaştırılmasında Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan dNTP (deoksi nükleotid trifosfat), primerler, Pfu DNA Polimeraz enzimi (Fermentas), *Taq* DNA polimeraz, ligasyon için kullanılan T4 DNA Ligaz enzimi (Promega) ve bu enzimler için tampon çözeltiler, MgCl₂, MgSO₄.

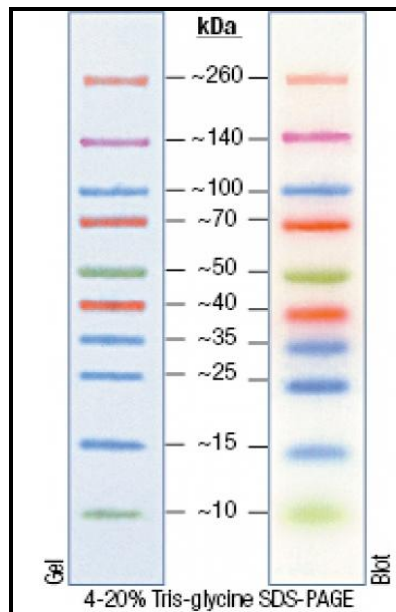
Agaroz jel elektroforezi metodunda DNA marker olarak O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas), DNA konsantrasyonu tayininde kullanılan Lambda DNA Hind III Digest (Amersham Pharmacia Biotech) kullanılmıştır (Şekil 2. 1). SDS-PAGE sonrası analizde protein ladder olarak Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific) kullanılmıştır (Şekil 2. 2).



Şekil 2. 1 O'GeneRuler DNA Ladder Mix ve Lambda DNA Hind III Digest

Proteinin saflaştırılmasında kullanılan nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) Agaroz QIAGEN kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar BDH, Sigma, Bio-Rad, Roche ve Merck'ten sağlamıştır.



Şekil 2. 2 Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder

2.1.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

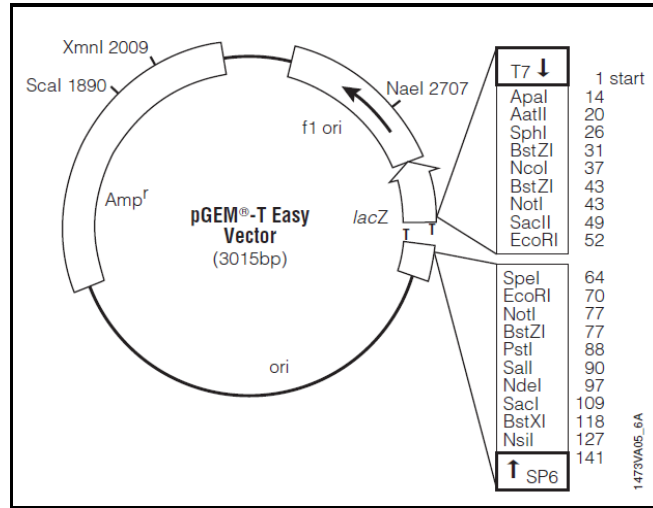
Cihaz	Marka
Jel Görüntüleme sistemi	Biorad
Saf Su Cihazı	GFL
Termal Döndürücü	Eppendorf
Şarjlı Pipet Ünitesi	Hirschmann
Hassas Terazi	Ohaus
Dikey Elektroforez Sistemi	Biorad
Sonikatör	Bandelin
pH Metre	Eutech
Su Banyosu	Kerman
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Yatay Elektroforez Sistemi	Biorad
PCR Çalışma Kabini	Esco
Jel Kurutma Ünitesi	Biorad
Mikrosantrifüj	Sigma
UV Visible Spectrophotometre	Thermo
Otoklav	Systec
Çalkalamalı İnkübatör	GFL
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Etüv	Binder
Vorteks	Heidolph

2.1.3 Genomik DNA

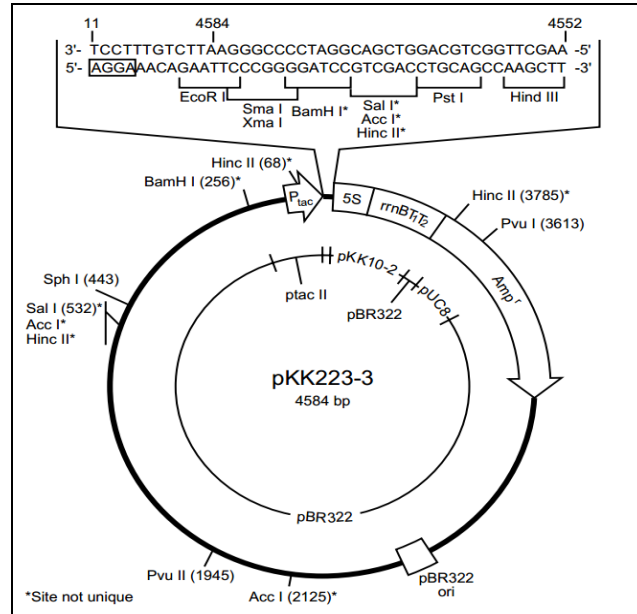
Fusobacterium nucleatum genomik DNA'sı; Dr. Mike Milward ve Dr. Paul R. Cooper tarafından The School of Dentistry, University of Birmingham, Birmingham, İngiltere'den temin edilmiştir.

2.1.4 Klonlama ve İfade Vektörleri

pGEM®-T Easy klonlama vektör sistemi, her iki ucunda da 3'-terminal timidin içeren ve PCR ürünlerinin klonlanmasında elverişli lineer bir vektördür (Şekil 2. 3). Klonlama bölgesindeki T-kuyruğu, vektör ile polimeraz enzimleriyle üretilmiş uyumlu kuyruğa sahip PCR ürününün ligasyon veriminin artırmaktadır ve yeniden sirküler hale gelmesini engellemektedir (Promega) [43].

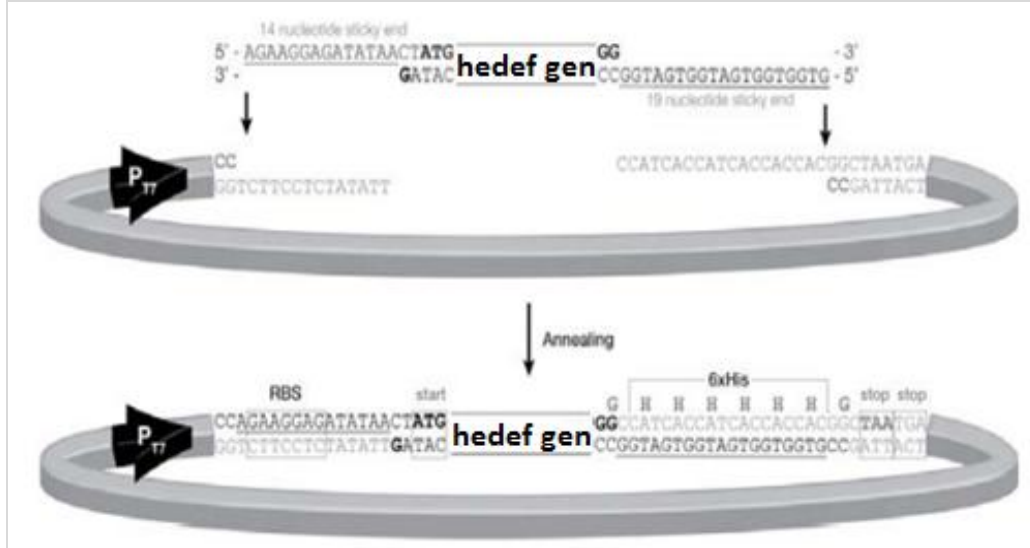


Şekil 2. 3 pGEM®-T Easy klonlama vektörü



Şekil 2. 4 pKK223-3 ifade vektörü

Protein ekspresyonu için pKK223-3 PharmaciaLKB Biotechnology (İsveç) vektörü (Şekil 2. 4) ve aLICator™ LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) sistemi ile birlikte kullanılan pLATE31 vektörü(Thermo Scientific) kullanılmıştır (Şekil 2. 5) [44], [45].



Şekil 2. 5 pLATE31 ifade vektörü

2.1.5 Mikroorganizmaların Gelişimi İçin Gerekli Besiyerleri

LB (Luria-Bertani) Buyyon

Maya Ekstraktı	0,5 g/100 ml
Tripton	1 g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözündükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

LB (Luria-Bertani) Agar

Maya Ekstraktı	0,5 g/100 ml
Tripton	1 g g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml
Agar	1,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözündükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

Mavi-Beyaz seçim için LB agar (Amp/X-gal/IPTG)

Amfisilin (100 mg/ml)	100 µl
X-gal (20 mg/ml)	160 µl
IPTG (20 mg/ml)	160 µl

Belirtilen miktarlar 100 ml LB agar içine eklenir.

Çift Kuvvetli Yeast-Tripton (2xYT) Agar

Maya Ekstraktı	1 g/100 ml
Tripton	1,6 g g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml
Agar	1,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözüldükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

Çift Kuvvetli Yeast-Tripton (2xYT) Buyyon

Maya Ekstraktı	1 g/100 ml
Tripton	1,6 g/100 ml
NaCl	0,5 g/100 ml

Bileşenler 100 ml dH₂O içinde çözüldükten sonra 121 °C de otoklavlanır.

SOC Buyyon (10 ml için)

Maya Ekstraktı	50 mg
Tripton	0,2 g
1 M NaCl stok solüsyonundan	0,1 ml
1 M KCl stok solüsyonundan	25 µl
2 M Mg ⁺² stok solüsyonundan (Filtre ile sterilize edilir)	0,1 ml
2 M Glikoz stok solüsyonundan (Filtre ile sterilize edilir)	0,1 ml

Tripton, maya ekstraktı, 1 M NaCl ve 1 M KCl solüsyonlarından gerekli miktarlar eklenerek distile su ile 9 ml'ye tamamlanır. Karışımın pH'sı 7,0 olarak ayarlanır. Otoklavda sterilize edilir. Oda sıcaklığına getirilir. 2 M Mg^{+2} ve 2 M Glikoz solüsyonları son konsantrasyonları 20 mM olacak şekilde karışıma ilave edilir. Son hacim steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

2.1.6 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Agaroz Jel İçin Örnek Uygulama Tamponu (EtBr-SAB, Sample Application Buffer)

Sükroz	4 g/10 ml
2 M Tris HCl	0,5 ml/10 ml
0,5 M EDTA	2 ml/10 ml
Bromfenol mavisi	4 mg/10 ml

Kristal Viyole (CV) Stok Solüsyonu

dH₂O ile 5 mg/ml stok solüsyonu hazırlanır. Karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

Kristal Viyole Jel İçin Örnek Uygulama Tamponu (Cv-SAB)

Gliserol	500 µl/ml
1xTAE	500 µl/ml
Kristal viyole (stok 5 mg/ml)	10 µl/ml

Karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

50x TAE Tampon Çözeltisi (Tris-Asetat-EDTA)

Trizma Base	24,2 g/100 ml
Asetik Asit	5,71 ml/100 ml
0,5 M EDTA (pH:8.0)	10 ml/100 ml

CaCl₂ Solüsyonu

100 mM CaCl ₂ .6H ₂ O	2,19 g/100 ml
5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	102 mg/100 ml

5 mM Tris-HCl (pH:7.6) 1 ml/100 ml (0,5 M pH'sı 7,6 olan stok Tris-HCl çözeltisinden)

Solüsyon hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

Amfisilin

100 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

IPTG (Isopropyl-B-D-thiogaltopyranoside)

20 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve filtre ile sterilize edilir.

X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside)

20 mg/ml konsantrasyonu ayarlamak için 0,02 g X-Gal tartılır, N,N-dimetilformamid (DMF) ile 1 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

Mg²⁺ Stok Solüsyonu (10 ml)

MgCl₂.6H₂O 2,03 g

MgSO₄·7H₂O 2,465 g

Distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. Filtre ile sterilize edilir.

SDS-PAGE İçin Örnek Uygulama Tamponu (SDS-SAB)

%10 SDS 1 g/10 ml

0,5 M Tris HCl (pH: 6.8) 0,6 g/10 ml

% 5 Gliserol	0,5 ml/10 ml
--------------	--------------

% 25 β-Merkaptoethanol	0,25 ml/10 ml
------------------------	---------------

% 0,05 Bromfenol mavisi	0,005 g/10 ml
-------------------------	---------------

5x SDS-PAGE Tank Tamponu

0,025 M Trizma Base 1,5 g/100 ml

0,192 M Glisin 7,2 g/100 ml

% 0,1 SDS 0,5 g/100 ml

Jel yürütme aşamasında dH₂O ile 1x'e seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanabilir.

% 30 Akrlamid/Bis-akrlamid Solüsyonu

Akrlamid 29 gr/100 ml

N, N'-Metilen-Bis-Akrlamid 1 gr/100 ml

Protein Boyama Solüsyonu

Coomassie Brilliant Mavisi 280 mg /100ml

Metanol 45,2 ml/100 ml

Glasiyal Asetik Asit 9,2 ml /100 ml

Belirtilen bileşenler eklendikten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

Boya Uzaklaştırıcı Solüsyon

Metanol 75 ml / litre dH₂O

Asetik Asit 50 ml / litre dH₂O

Tris-KCl (pH: 7.5) Tampon Çözeltisi

50 mM Trisma Base

50 mM KCl

Bu bu bileşikler eklendikten sonra HCl ile pH ayarlanır.

Ni-NTA Saflaştırma için tamponlar**Lizis tamponu (1 litre)**

50 mM NaH₂PO₄ 6,90 g NaH₂PO₄·H₂O (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

10 mM imidazole 0,68 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Yıkama tamponu (1 litre)

50 mM NaH₂PO₄ 6,90 g NaH₂PO₄·H₂O (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

20 mM imidazole 1,36 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Elüsyon Tamponu (1 litre)

50 mM NaH₂PO₄ 6,90 g NaH₂PO₄·H₂O (MW 137.99 g/mol)

300 mM NaCl 17,54 g NaCl

250 mM imidazole 17,00 g imidazole

NaOH kullanılarak pH : 8,0'a ayarlanır.

Enzim aktivite tayini için stok bileşenler

50 mM NADH (MW : 709,4 g/mol)

0,5 M Piruvat (MW : 110,04 g/mol)

2.1.7 Primerler

Fusobacterium nucleatum Laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin DNA'dan çoğaltılması ve dizileme için kullanılan aşağıda verilen 7 adet spesifik primer tasarlanmıştır.

Fn1: 5' ATGTTACAAACAAGAAAAGTTGG 3'	T_m: 53.5 °C
Fn2: 5' TACTATTTTATAAGATTTTCC 3'	T_m: 46.2 °C
Fn3: 5' CGACCCGGAATTCATGTTACAAACAAG 3'	T_m: 63.4 °C
Fn4: 5' TTTTCTGCAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGTACTATTTTATAAGA 3'	T_m: 68.5 °C
Fn5: 5' GCAGGATTTAATG 3'	T_m: 36.0 °C
Fn6: 5' AGAAGGAGATATAACTATGTTACAAACAAG 3'	T_m: 57,9 °C
Fn7: 5' GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTACTATTTTATAAGA 3'	T_m: 65,49 °C

2.2 YÖNTEM

Tüm yöntemler Sambrook, J. ve Russell, D.W. moleküler klonlama laboratuvar metotlarına uygun olarak tasarlanmıştır [46]. Aksi belirtilmediği takdirde başka bir metot uygulanmamıştır.

2.2.1 Genomik DNA'dan Amplifikasyon

Fusobacterium nucleatum genomik DNA'dan laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin çoğaltılması PCR koşulları şöyledir; 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 44 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ile 45 döngü ve 72 °C'de 10 dakika son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. PCR bileşenleri ise Çizelge 2. 1 deki gibidir.

Çizelge 2. 1 *Fusobacterium nucleatum* genomik DNA'dan laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan genin çoğaltılması, PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
<i>Fn1</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>Fn2</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

2.2.2 Etidyum Bromür Agaroz Jel Elektroforezi

% 1'lik agaroz jel hazırlanışı basamaklar halinde şöyledir;

1x TAE tampon çözeltisi ile agaroz karıştırılıp kaynatılmaktadır. Agaroz tamamen çözündükten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. Tepsie dökülmeden önce EtBr eklenir ve agaroz jel tepsie dökülür. Tepsie taraklar yerleştirildikten sonra jelleşme için 30 dk kadar beklenmektedir. Jel oluştuktan sonra taraklar çıkarılarak tepsi tankın içerisine yerleştirilir. İstenilen miktarda örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 40-60 mA'de cihaz çalıştırılır ve örneklerin jelde yürümesi beklenir. Son aşamada ise baz sayısına göre ayrılan örneklerimiz UV ışık altında görüntülenir [46].

2.2.3 Kristal Viyole ile Boyanan AgaroZ Jel Elektroforezi

% 1'lik agaroz jel için 1x TAE tampon çözeltisi ile agaroz karıştırılarak mikrodalga fırında kaynatılır. AgaroZ tamamen çözündükten sonra oda sıcaklığında soğuması için beklenir ve son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde kristal viyole (CV) ilave edilir. Jel tepsiye döküldükten sonra taraklar yerleştirilir ve jelleşmesi için 30 dk kadar beklenir. Jel tepsi 2 µg/ml kristal viyole içeren 1x TAE tampon çözeltisi bulunan elektroforez tankına yerleştirilir. Uygun şekilde taraklar çıkarıldıktan sonra oluşan kuyucuklara örnekler yüklendikten sonra 30-40 mA de cihaz çalıştırılır ve örneklerimizin yürümesi beklenir. Elektroforez sonrası jel beyaz ışık altında görüntülenir.

2.2.3.1 DNA'nın Jelden Geri Kazanılması

Elektroforez sonrasında istenilen bant bisturi yardımıyla jelden kesilerek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve DNA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak geri kazanılır.

2.2.4 *FnLDH* Geninin Klonlama Vektörüne (pGEM-T) Aktarılması

2.2.4.1 Amplifiye Edilen PCR Ürününe Adenin Kuyruğu Eklenmesi

Fusobacterium nucleatum genomik DNA dan *FnLDH* geni amplifiye edildikten sonra adenin kuyruğu eklenmektedir. Çizelge 2. 2 belirtilen bileşenler eklenerek 70 °C de 30 dk. inkübe edilerek adenin kuyruğu eklenmiştir.

Çizelge 2. 2 Adenin kuyruğu ekleme reaksiyonu

Bileşenler	Miktar
10X <i>Taq</i> tamponu	1 µl
dATP	2 µl (1mM stok/son kons. 0,2 mM)
PCR ürünü	5,2 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	1 µl
MgCl ₂	0,8 µl
Toplam hacim	10 µl

2.2.4.2 Ligasyon

Adenin kuyruğu eklenen PCR ürünümüz ile klonlama vektörü olan pGEM-T vektörü ile ligasyon Çizelge 2. 3 deki gibi reaksiyon gece boyu +4 °C inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 3 Ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	Miktar
2X rapid ligation buffer	5 µl
pGEM-T easy vektör	1 µl
PCR ürünü (A-tailing)	3 µl
T4 DNA ligaz	1 µl
Toplam hacim	10 µl

2.2.4.3 Kalsiyum Klorür Muamelesi ile Kompetant *E. coli* DH5α Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetan hücre hazırlamak için -80 °C'deki *E. coli* DH5α soyu hücre stoğundan sürme ekim yöntemi ile LB agara ekimi yapılır ve gece boyu 37 °C' de inkübe edilir. Gelişen kolonilerden tek koloni seçimi yapılarak 5 ml LB buyyona aktarılır ve bir gece 37 °C 120 rpm de inkübe edilir. Gelişen kültürden 500 µl alınarak 50 ml buyyona aktarılır ve 37 °C, 120 rpm'de OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,3–0,4 arasında bir değere ulaşıncaya kadar inkübe edilir. İstenilen hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra 25 ml'lik iki tüpe bölünür ve +4 °C ve 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücrelerin toplanması sağlanır. Supernatant kısmı atıldıktan sonra, pellet 25 ml CaCl₂ ile yavaşça çözülür ve sonrasında 30 dk buzda bekletilir. 5000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilir ve supernatant dökülür ve her bir tüpteki pelet 1ml CaCl₂ solüsyonunda yavaşça çözülür. Tüpler 2 saat buzda bekletildikten sonra hücrelerimiz kompetan hale gelmiş olur. [46].

2.2.4.4 Rekombinant DNA Plazmidinin *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu

Vektör ile amplifiye edilen DNA'nın ligasyonu yapıldıktan sonra örneğin üzerine 200 µl kompetant *E. coli* DH5α hücrelerinden aktarılır ve hafifçe karıştırılır ve sonrasında 30 dk buzda bekletilir. Bu bekleme aşamasından sonra 42 °C'deki su banyosunda 90 saniye boyunca ısı şokuna maruz bırakılır. Isı şokundan sonra hücreleri sarsmada 2 dk buzda

bekletilir ve peşi sıra 100 µl/ml amfisilin içeren SOC buyyondan 800 µl ilave edilir. Tüpler hafifçe sarsmadan karıştırılır ve 37 °C de 45 dakika etüvde bekletilir. İnkübasyon sonrası 100 µl/ml amfisilin, 20mg/ml X-gal ve 20 mg/ml IPTG içeren BSA LB-agara 100 µl, 200 µl , 200 µl ve 500 µl örnek olacak şekilde ekim yapılır ve 37 °C'deki etüvde bir gece inkübe edilir.

2.2.4.5 Gen Klonlamasının PCR ile Kontrolü

BSA-LB petrisine yayma ekim yöntemi ile ekimi yapılan transformasyon sonrası örneklerimiz mavi-beyaz koloni seçimi ile tek koloniler seçilmiş ve 5 ml amfisilin içeren LB buyyona ekim işlemi yapılmıştır ve gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Gece boyu inkübe edilen kültürden plasmid DNA izolasyonu DNA QIAprep®Miniprep (QIAGEN) kit yardımı ile yapılmıştır. İzole edilen plasmid DNA'dan *FnLDH* geni Çizelge 2. 1 deki PCR koşulları ve bileşenleri ile amplifiye edilmiştir. Klonlama işleminin başarısının kontrolü 2.2.2 de belirtilen agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapılmıştır.

2.2.5 *FnLDH* Geninin İfade Vektörüne (pKK223-3) Aktarılması

2.2.5.1 *FnLDH* Geninin Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu

FnLDH geninin ifadesi için ilk seçilen ifade vektörü pKK223-3 vektörüdür. Genin seçilen vektöre uygun şekilde aktarılabilmesi için restriksiyon analizi yapılmış, geni ve vektörü kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlenerek uygun primerler tasarlanmıştır. Bu amaçla *EcoRI* enzim kesim bölgesini içeren 5' *Fn3* ve *PstI* enzim kesim bölgesini içeren 3' *Fn4* primerleri sentezlenmiştir. Klonlama işleminin ardından protein ürününün saflaştırılması amacıyla 3' primerine histidin amino asitine ait 6 adet kodon (6 His-tag) sentez sırasında eklenmiştir. Sentezlenen bu primerler ile *FnLDH* geni Çizelge 2. 4 bileşenler ve 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 44 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ile 45 döngü ve 72 °C'de 10 dakika son uzama PCR koşullarında amplifiye edilmiştir.

Çizelge 2. 4 *Fn*LDH Geninin Klonlama Vektöründen PCR

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
<i>Fn3</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>Fn4</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

2.2.5.2 *Fn*LDH Geni ve pKK223-3 İfade Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz İle Kesimi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen ürün Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak jelde koşturulmaksızın doğrudan saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürün ve plazmid izolasyonu yapılan vektör *Eco*RI ve *Pst*I restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmiş ve yapışkan uçlar elde edilmiştir (Çizelge 2. 5).

Çizelge 2. 5 *Fn*LDH Geni ve pKK223-3 ifade vektörünün restriksiyon koşulları

Bileşenler	<i>Fn</i> LDH	pKK223-3
DNA	20 µl	20 µl
10x Tampon O	3 µl	3 µl
<i>Pst</i> I	2 µl	2 µl
<i>Eco</i> RI	2 µl	2 µl
Steril dH ₂ O	3 µl	3 µl
Toplam	30 µl	30 µl

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA'nın kesilmesi işlemi 37°C'de 2 saatte gerçekleştirilir. Kesim sonrası örnekler, kristal viyole ile boyanmış agaroz jelde koşturulur ve DNA örnekleri Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılarak jelden geri kazanılır.

2.2.5.3 Ligasyon

Kesim sonrası elde edilen PCR ürünü ve ifade vektörünün konsantrasyonlarını belirlemek için örnekler (1 µl) agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Konsantrasyonlar belirlendikten sonra ligasyon şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Bileşenler	1:1 oranı
10x Ligasyon Tamponu	2 µl
İnsert (<i>Fn</i> LDH)	10 µl
Vektör (pKK223-3)	3,2 µl
T4 DNA ligaz (3U/µl)	2 µl
Steril dH ₂ O	2,8 µl
Toplam	20 µl

2.2.5.4 Rekombinant DNA Plazmidinin *E. coli* JM109 Hücrelerine Transformasyonu

2.2.4.4 deki yöntem ile rekombinant DNA örneğimiz 2.2.4.3 deki metot kullanılarak hazırlanan kompetan hücrelere transforme edilmiştir.

2.2.6 *Fn*LDH Geninin İkinci İfade Vektörüne (pLATE31) Aktarılması

2.2.6.1 PCR Primerlerinin Tasarımı

aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) klonlama protokolünde belirtilen primer tasarımında 5' ucu primeri pLATE31 vektörüne spesifik diziler içermekte ve ilgili gen ile çakışan yeterli bir 3' ucu içermektedir. Altı çizili olan bazlar pLATE31 vektörüne spesifik yapışkan uçlar oluşturmaktadır. Protein saflaştırması için olması gereken 6 his-taq kuyruğu pLATE31 vektöründe yer almaktadır. Tasarlanan primerler *Fn*6 ve *Fn*7'dir.

2.2.6.2 *Fn*LDH'in Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu ve PCR Ürününün Saflaştırılması

Kalıp DNA olarak *Fn*LDH genini klonladığımız pGEM-T vektörü alınarak, 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 44 °C'de 2 dakika

bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ile 45 döngü ve 72 °C'de 10 dakika son uzama PCR koşullarında amplifiye edilmiştir (Çizelge 2. 6). Elde edilen PCR ürünü Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kullanılarak jelde koşturulmaksızın doğrudan saflaştırılmıştır.

Çizelge 2. 6 *Fn*LDH'ın Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu

Bileşenler	Miktar
10X <i>Pfu</i> tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
<i>Fn6</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>Fn7</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	33 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

2.2.6.3 LIC Reaksiyonu ve Rekombinant DNA Plazmidinin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonu

aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) protokolünde verilen, gen büyüklüğüne göre reaksiyona girmesi gereken insert DNA miktarı hesaplama tablosu esas alınarak 957 bç'lik *Fn*LDH saflaştırılmış ürünün konsantrasyonu 65 ng olarak ayarlanması gerekmektedir.

Vektör ile saflaştırılmış PCR ürününün ligasyonu için oda sıcaklığında reaksiyonu hazırlanmıştır (Çizelge 2. 7). Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmektedir. Reaksiyonu durdurmak için 0,6 µl 0,5 M EDTA ile iyice karıştırılır. Vektör ile birleşme aşamasında ise lineer pLATE31 vektöründen 1 µl (60 ng) ve T4 DNA polimeraz ile muamele edilmiş PCR ürünü hafifçe vortekslenir ve 3-5 saniye santrifüj edilir. Birleştirme karışımı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Birleştirilen karışım transformasyona uygun hale gelmiştir. *E. coli* BL21(DE3) hücreleri kompetan hale getirildikten sonra (2.2.4.3) ve transformasyon gerçekleştirilir.

Çizelge 2. 7 pLATE31 ekspresyon vektörü ve *FnLDH* geni ligasyon reaksiyonu

Bileşenler	Hacim
5X LIC tamponu	2 µl
Saf PCR ürünü	1 µl (65 ng)
Steril distile su	6 µl
T4 DNA polimeraz	1 µl (1 U/ µl stoktan)
Toplam	10 µl

2.2.6.4 Gen Klonlamasının koloni PCR ve dizileme ile kontrolü

FnLDH geni pLATE31 ekspresyon vektörü ile ligasyonu yapıp *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon sonrası LB agar besi yerine ekilen hücrelerimizden 10 tane pozitif koloni seçilmiştir. Seçilen bu koloniler 5 ml (amp'li) LB buyyona ekilmiştir. *FnLDH* geni koloni PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. Bu yöntemde; besi yerinden 100 µl alınarak 7 dk 12000 rpm de santrifüje edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Pellet 100 µl ile çözüldükten sonra 10 dk kaynatılmıştır. Sonrasında 15 dk 12000 rpm de santrifüjlenerek süpernatant kısmı alınarak kalıp olarak kullanılmıştır. 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94°C'de 1,5 dakika denatürasyon, 44 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama ile 45 döngü ve 72 °C'de 10 dakika son uzama PCR koşullarında amplifiye edilmiştir (Çizelge 2. 8). Amplifikasyonu gerçekleştirilen gen ürününün tamamı EtBr ile boyanan agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gen klonlamasının ön kontrolü yapılmıştır ve PCR sonucu pozitif olarak görülen örnekler dizilenerek dizinin doğruluğu kontrol edilmiştir.

Çizelge 2. 8 Koloni PCR

Bileşenler	Miktar
10X <i>Taq</i> tamponu	5 µl
dNTP karışımı	5 µl (Her bir nükleotid için 2mM içeren stoktan)
<i>Fn6</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
<i>Fn7</i> primeri	2,5 µl (20 µM stoktan)
Kalıp DNA	10 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	1 µl (2,5 U/µl stoktan)
Steril dH ₂ O	24 µl (Son hacim 50 µl olacak şekilde)
Toplam hacim	50 µl

2.2.7 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Ekspresyonu Ve Saflaştırılması

2.2.8 *Fusobacterium nucleatum* Birinci İfade Vektörü (pKK223-3) Aracılığıyla *E. coli*'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması

FnLDH geni ekspresyon vektörü olan pKK223-3 vektörüne aktarılıp *E. coli* JM109 hücrelerine transforme edildikten sonra genin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için *FnLDH* genini içeren *E. coli* JM109 hücreleri 100 µg/ml amfisilin içeren 5ml LB buyyona ekilmiştir. 37 °C'de ve 180 rpm'de gece boyu inkübe edilmiştir. Aynı kültür *FnLDH* genini içermeyen *E. coli* JM109 hücreleri içinde yapılmıştır. 5 ml'lik besiyerinden 500 µl alınıp 100 ml lik amfisilinli LB besiyerine aktarılmıştır. 37 °C'de inkübe edilmeye devam edilip, OD₆₀₀'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşıncaya kadar inkübe edilir. Hücre yoğunluğu istenilen miktara ulaştıktan sonra, 100 ml kültür ikiye bölünerek 50 ml'lik kültür son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde IPTG ile hücreler indüklenir. Diğer 50 ml ise indüklenmeden inkübe edilmeye devam edilir. Aynı işlemler *FnLDH* genini içermeyen *E. coli* JM109 hücreleri içinde yapılmıştır. Devam eden inkübasyon süresince 3 saat, 5 saat ve gece boyu inkübasyonda sonra 3 ml'lik örnekler alınmıştır. Bu örnekler 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant kısımları atılarak pellet -20 °C saklanabilir. Pellet üzerine 500 µl Tris-KCl (pH 7,5) eklenir ve pellet çözünür. Hücre tamamen homojen hale geldikten sonra sonikasyon ile hücrelerimiz parçalanır. % 20

güç, 10 sn sonikasyon ve 20 sn bekleme olmak üzere sonikatör ayarlandıktan sonra 6 döngü halinde hücreler parçalanır. Tüm basamaklar buzun içinde yapılması gerekmektedir. Sonikasyondan sonra hücreler 14.000 rpm'de 20 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant kısımları alınarak temiz bir tüpe aktarılır. Pelletler ise distile su ile çözülerek SDS-PAGE de koşturulmak için hazırlanır.

SDS-PAGE sonucuna göre karar verilen en iyi ekspresyon örneğimizin koşullarını uygulayarak saflaştırma işlemine geçilecektir. pKK223-3 vektöründe genin ifadesini istenilen düzeyde olmadığı gözlemlendiği için bir diğer ifade vektörü olan pLATE31 ile devam edilmiştir.

2.2.9 *Fusobacterium nucleatum* İkinci İfade Vektörü (pLATE31) Aracılığıyla *E. coli*'de Ekspresyonu ve Enzimin Saflaştırılması

FnLDH geni ekspresyon vektörü olan pLATE31 vektörüne aktarılıp *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine transforme edildikten sonra genin ekspresyonu için 2.2.8 deki gibi basamaklar aynı şekilde uygulanmıştır.

SDS-PAGE sonucu gece boyu inkübe edilen örneğimizde ekspresyonun en iyi düzeyde olduğu gözlemlendiğinden saflaştırma işleminde bu örneğimizin koşulları ile devam edilecektir. İzlenen basamaklar şöyledir; 5 ml *FnLDH* genini içeren *E. coli* BL21(DE3) kültürden 500 µl alınarak 100 ml LB buyyona aktarılmıştır ve OD600'deki hücre yoğunluğu 0,6'ya ulaşıncaya kadar inkübe edilmiştir. İstenilen yoğunluğa gelindikten sonra son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde IPTG ile hücreler indüklenmiştir. 30 °C'de ve 180 rpm'de gece boyu inkübe edilmiştir. Gece boyu inkübe edilen örnek 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant kısımları atılarak pellet -20 OC saklanabilir. Pellet 3 ml lizis buffer ile çözüldükten sonra % 20 güç, 10 sn sonikasyon ve 20 sn bekleme olmak üzere sonikatör ayarlandıktan sonra 6 döngü halinde hücreler parçalanır. Tüm basamaklar buzun içinde yapılması gerekmektedir. Sonikasyon sonrası 14.000 rpm'de 20 dk 4 °C'de santrifüj edilir. Supernatant kısımları alınarak temiz bir tüpe aktarılır. Saflaştırmaya geçilmeden önce SDS-PAGE de yürütmek için 1 ml hücre lizatı alınır. Saflaştırma işleminde ilk olarak 1 ml His-tag ilaveli eklenmiş *FnLDH* ile Ni-NTA agarozun etkileşimini sağlamak için, elde edilen süpernatant 1 ml Ni-NTA agaroz ile 1 saat boyunca +4 °C'de 120 rpm hızla karıştırılır. Karışım kolona eklenmeden önce

kolon ve tüpler distile su ile yıkanır. 1 saat sonunda bu karışım kolona aktarılarak ilk süzüntü (flow-through) alınır. İlk süzüntü alındıktan sonra 8 ml yıkama solüsyonumuz ile yıkanır ve 3 tane 1 ml'lik örnekler alınır. Yıkama işlemi bittikten sonra 5 ml elüsyon solüsyonumuz kolona aktarılır. Kolondan 10 tane 0,5 ml'lik saflaştırılmış örnekler toplanır.

2.2.9.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Toplanan örnekler ve saflaştırdığımız enzim SDS-PAGE de analiz edilmiştir. BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılmıştır. Jel aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Ayırma jeli (% 12)

dH ₂ O	3,35ml
1,5 M Tris HCl (pH:8.8)	2,5ml
% 10 SDS	100µl
% 30 Akrilamid/ Bis	4ml
% 10 Amonyum persülfat	75µl
TEMED	15 µl

Yükleme jeli (% 4)

dH ₂ O	6,1ml
0.5 M Tris HCl (pH:6.8)	2,5ml
%10 SDS	100µl
%30 Akrilamid/ Bis	1,3ml
% 10 Amonyum persülfat	60µl
TEMED	12 µl

Örnekler jele yüklenmeden önce yükleme çözeltisi ile karıştırılarak 5 dk kaynatılır ve kuyucuklara yüklenir. Yürütme tamponu elektroforez tankına eklenerek 80 mA de yürütülmeye başlanır. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra boyama çözeltisi ile jel gece boyu boyandıktan boya çıkarıcı çözeltiye alınır ve bantlar belirginleşinceye kadar bekletilir.

2.2.10 Protein Konsantrasyon Tayini

Saflaştırılan örnekler 50 kat seyreltilerek A_{280} deki absorbans değeri okunmuştur. Okunan bu değer ile Beer-Lambert formülüne göre protein konsantrasyonu bulunmuştur. Bu formüldeki molar absorpsiyon katsayısı (ϵ ; Extinction Coefficient) ve moleküler ağırlığı web tabanlı programlar (Peptide Property Calculator) yardımıyla bulunabilir. Formüldeki L ise ışık yolu uzunluğudur ve standart spektrofotometreler 1 cm genişliğinde örnek küvetlerinin kullanımı için uygun olduğundan L değeri genellikle 1 cm'dir. Bulunan değer seyreltme katsayısı ile çarpılarak mg/ml olarak bulunmaktadır.

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{280} \times MW}{\epsilon} \times L \quad \text{denklem 2. 1}$$

2.2.11 Spektrofotometrik Yöntemle Enzim Aktivitesi Tayini

*Fn*LDH enziminin aktivitesi 340 nm deki NADH'ın NAD⁺'a yükseltgenmesi ile oluşan absorbans değer farkı ile tespit edilmiştir. Reaksiyon hacmi 1 ml ve süresi 1 dk olacak şekilde tasarlanmıştır ve bileşenler optimize edilmiştir [37].

Çizelge 2. 9 *Fn*LDH enzim aktivitesi tayini

Bileşen	Miktar
Tris-KCl (pH 7,5)	966 μ l
NADH (stok 50 mM)	4 μ l (son konsantrasyon 200 mM)
Piruvat (stok 0,5 M)	20 μ l (son konsantrasyon 10 mM)
<i>Fn</i> LDH	10 μ l
Toplam hacim	1 ml

2.3 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Homoloji

Modellemesi

Saflaştırılan ve enzim aktivitesi tayini yapılan *Fn*LDH enziminin 3-boyutlu yapısı, karşılaştırmalı modelleme prensibine dayanan homoloji modelleme yöntemi ile oluşturulmuştur. MODELLER programı 3-boyutlu yapısı bilinen ve bilinmeyen proteinler ile karşılaştırma yaparak tahmini olarak bir model oluşturur [47]. Kalıp yapının belirlenmesi 3-boyutlu yapısı bilinen proteinler ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Benzer yapıları belirlemek için web tabanlı program olarak PROTEIN BLAST kullanılmıştır. Oluşturulan 3-boyutlu yapının doğruluğu, HYPERCHEM programı ile enerji minimizasyonu yapıldıktan sonra web tabanlı programlar yardımıyla değerlendirilmektedir. RAMPAGE yardımıyla ramahandran grafiği çizilmiştir, ERRAT ve PROSA programları ile yapının doğruluğu değerlendirilmiştir. Enzimin aktif bölgelerine muhtemel bağlanacak olan ligandları Q-site Finder, Pocket-Finder ve DoG-Site Scorer web tabanlı programlar ile tespit edilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

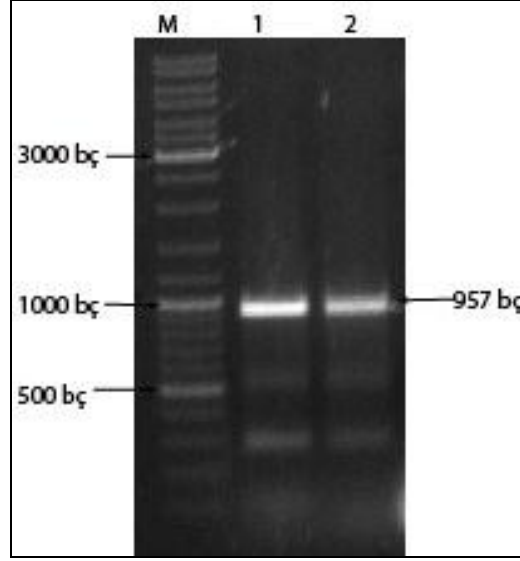
3.1 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin (*FnLDH*) pGEM-T Vektörüne Klonlanması

3.1.1 *FnLDH* Geninin Genomik DNA'dan Amplifikasyonu

Genomik DNA'dan amplifikasyon için 23 bp uzunluğundaki *Fn1* ve 21 bp uzunluğundaki *Fn2* primerleri NCBI (The National Center for Biotechnology Information) kayıtlarından alınan *FnLDH* dizisi temel alınarak tasarlanmıştır (2.1.7).

Fusobacterium nucleatum genomik DNA'sından Çizelge 2. 1 deki koşullar sağlanarak amplifiye edilen laktat dehidrogenaz geni EtBr agaroz jelde yürütülmüş ve baz çifti uzunluğu kontrol edilmiştir (Şekil 3. 1).

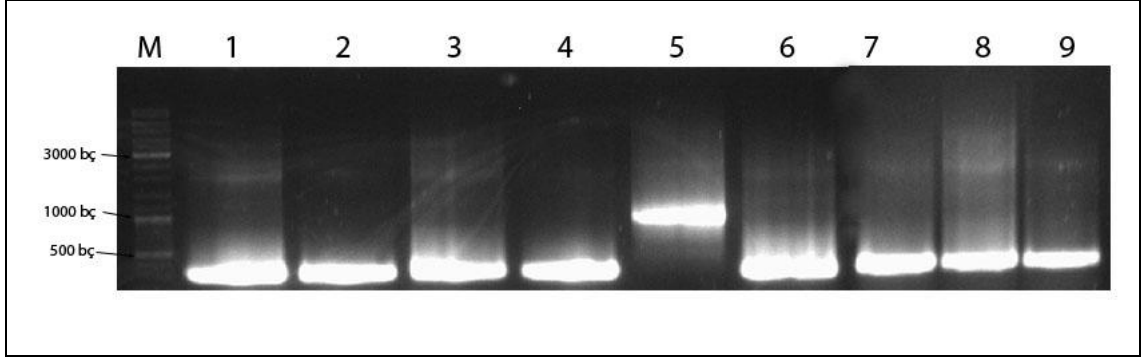
Elektroforez sonucu elde edilen jel görüntüsünde amplifiye ettiğimiz *FnLDH* 1000 bp bant hizasında bulunmaktadır. NCBI (The National Center for Biotechnology Information) kayıtlarından alınan bilgilerde *FnLDH* baz büyüklüğü 957 bp olarak görülmektedir (NCBI Reference Sequence: NZ_CM000440.1) .



Şekil 3. 1 PCR sonrası EtBr agaroz jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Marker, Hat 1 ve 2: PCR ürünü

3.1.2 *Fn*LDH Genini İçeren Klonlama Vektörünün Kompetan Hücreye Transformasyonu

Amplifiye edilen *Fn*LDH genine Adenin kuyruğu eklendikten (Çizelge 2. 2) sonra klonlama vektörüne (pGEM-T) ligasyonu (Çizelge 2. 3) sağlanmıştır. *Fn*LDH genini içeren pGEM-T vektörü 2.2.4.4 protokolü ile *E. coli* Dh5 α kompetan hücrelerine transforme edilmektedir. LB agar besiyeri yerine ekim yapıldıktan sonra oluşan mavi-beyaz kolonilerden pozitif koloni olan mavi koloniden seçilip 5 ml amfisilinle besiyeri yerine ekilmiştir. Gece boyu inkübe edilen kültürden plazmid DNA izolasyonu DNA QIAprep®Miniprep (QIAGEN) ile yapılmış ve Çizelge 2. 1 de belirtilen koşullar ile plazmid DNA'dan *Fn*1 ve *Fn*2 primerleri kullanılarak *Fn*LDH geni amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonrası PCR ürünleri EtBr jelde yürütülmüş ve 5. örneğin pozitif sonuç olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3. 2). Bu örneğin pozitif klon içerdiği DNA dizilemesi ile doğrulanmıştır.



Şekil 3. 2 Plasmid DNA'dan amplifikasyon sonrası EtBr jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Marker, Hat 1,2,3,4,6,7,8 ve 9: Negatif PCR sonucu, Hat 5: Pozitif PCR sonucu

3.2 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin

Analizi

3.2.1 Nükleotid Düzeyinde Analiz

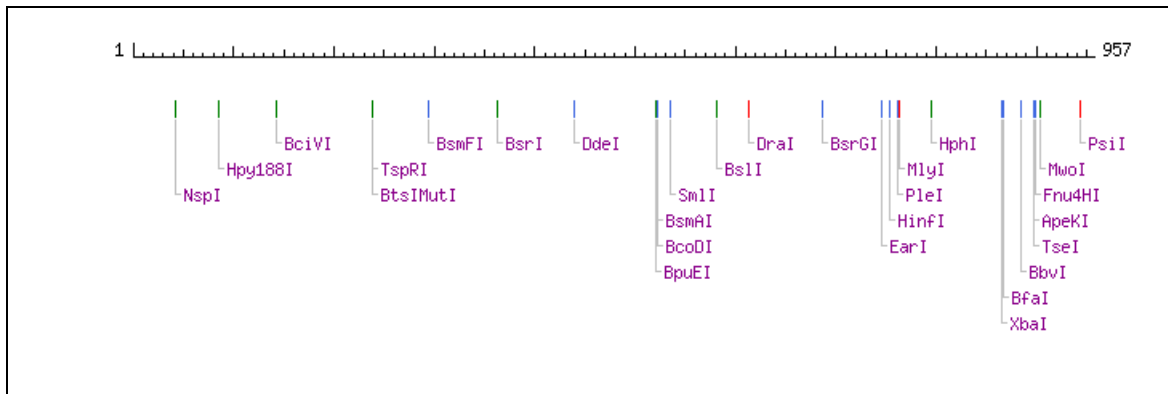
Elde edilen dizileme sonuçları analiz edildiği zaman *FnLDH*'ı kodlayan genin klonlandığı ve tek bir açık okuma çerçevesi içeren genin 957 baz çiftinden oluştuğu tespit edilmiştir (Çizelge 3. 1). Dizileme sonuçlarına ait kromatogram verilen dizinin doğruluğunu desteklemektedir (EK A). Bu tezde klonlanan *FnLDH* dizisi, NCBI'daki eşdeğer referans dizisi ile karşılaştırıldığı zaman her iki dizinin tamamen aynı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3. 4).

Çizelge 3. 1 Klonlanmış olan *FnLDH* geninin nükleotit dizisi

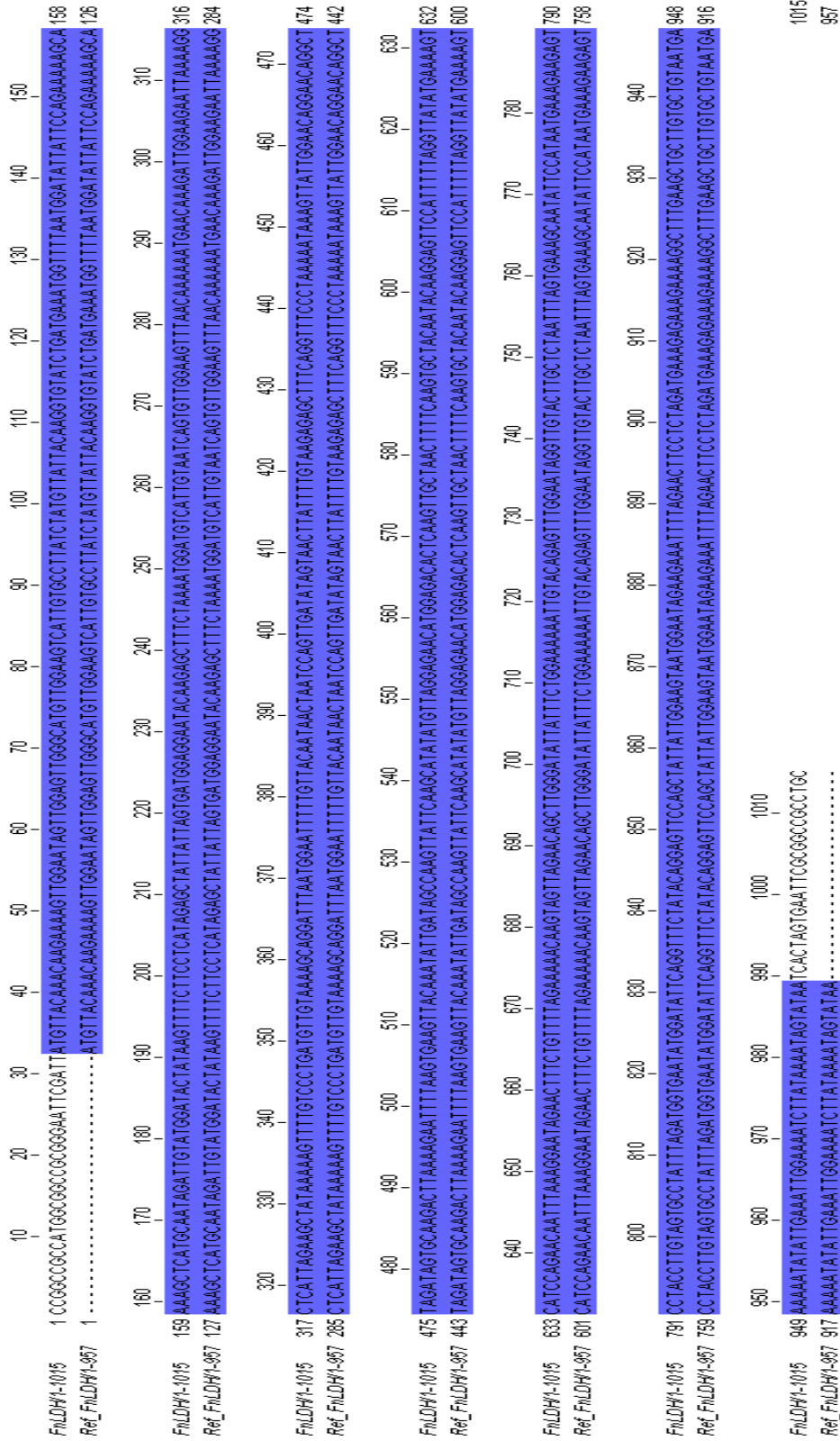
1	atgttacaaa	caagaaaagt	tggaaatagtt	ggagttgggc	atgttgggaag	tcattgtgccc
61	ttatctatgt	tattacaagg	tgtatctgat	gaaatgggttt	taatggatat	tattccagaa
121	aaagcaaaag	ctcatgcaat	agattgtatg	gatactataa	gttttcttcc	tcataagagct
181	attattagtg	atggaggaat	acaagagctt	tctaaaatgg	atgtcattgt	aatcagtgtt
241	ggaagttaa	caaaaaatga	acaaagattg	gaagaattaa	aaggctcatt	agaagctata
301	aaaagttttg	tccctgatgt	tgtaaaagca	ggatttaatg	gaatttttgt	tacaataact
361	aatccagttg	atatagtaac	ttatttttgta	agagagcttt	caggtttccc	taaaaataaa
421	gttattggaa	caggaacagg	cttagatagt	gcaagactta	aaagaatttt	aagtgaagtt
481	acaaatattg	atagccaagt	tattcaagca	tatatgttag	gagaacatgg	agacactcaa
541	gttgctaact	tttcaagtgc	tacaatacaa	ggagttccat	ttttagggtta	tatgaaaagt
601	catccagaac	aatttaaagg	aatagaactt	tctgttttag	aaaaacaagt	agttagaaca
661	gcttgggata	ttattttctgg	aaaaaattgt	acagagtttg	gaatagggttg	tacttgctct
721	aatttagtga	aagcaatatt	ccataatgaa	agaagagtcc	taccttgtag	tgccatttta
781	gatggtgaat	atggatattc	aggtttctat	acaggagttc	cagctattat	tggaaagtaat
841	ggaatagaag	aaattttaga	acttcctcta	gatgaaagag	aaagaaaagg	ctttgaagct
901	gcttggtgctg	taatgaaaaa	atatattgaa	attggaaaaa	cttataaaat	agtataa

3.2.2 Restriksiyon Enzim Kesim Profilinin Analizi

*Fn*LDH geni restriksiyon haritası web tabanlı bir program kullanılarak tanımlanmıştır. Belirtilen restriksiyon haritasına göre geni iç bölgeden kesmeyen restriksiyon enzimleri klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere tespit edilmiştir. Geni içten kesmeyen restriksiyon endonükleazlar; AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AcylI, AflII, AflIII, AgeI, AjuI, AlfI, AlolI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ArsI, AscI, AsuII, Aval, Avall, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BbvCI, Bcgl, BclI, BdaI, BfiI, BglI, BglII, BpII, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BsaXI, BseMII, BsePI, BseRI, BseSI, BseYI, BsgI, BsmI, BspHI, BspMI, BsrBI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtrI, BtsI, CfrI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco31I, Eco47III, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, Esp3I, Fall, Faul, FseI, FspAI, GsuI, HaeII, HaeIV, HgaI, Hin4I, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MslI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, Nrul, OliI, PacI, PaeI, PflMI, PfoI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PI-PspI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, SapI, Scal, PI-Scel, SduI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, StuI, StyI, SwaI, TaqII, Taul, TfiI, Tsp45I, TspGWI, TstI, Tth111I, VspI, XcmI, XhoI, XhoII, XmnI enzimleridir. *Fn*LDH genini iç bölgeden kesen restriksiyon enzimlerinin haritası ise Şekil 3. 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 3 *Fn*LDH restriksiyon enzimi kesim haritası



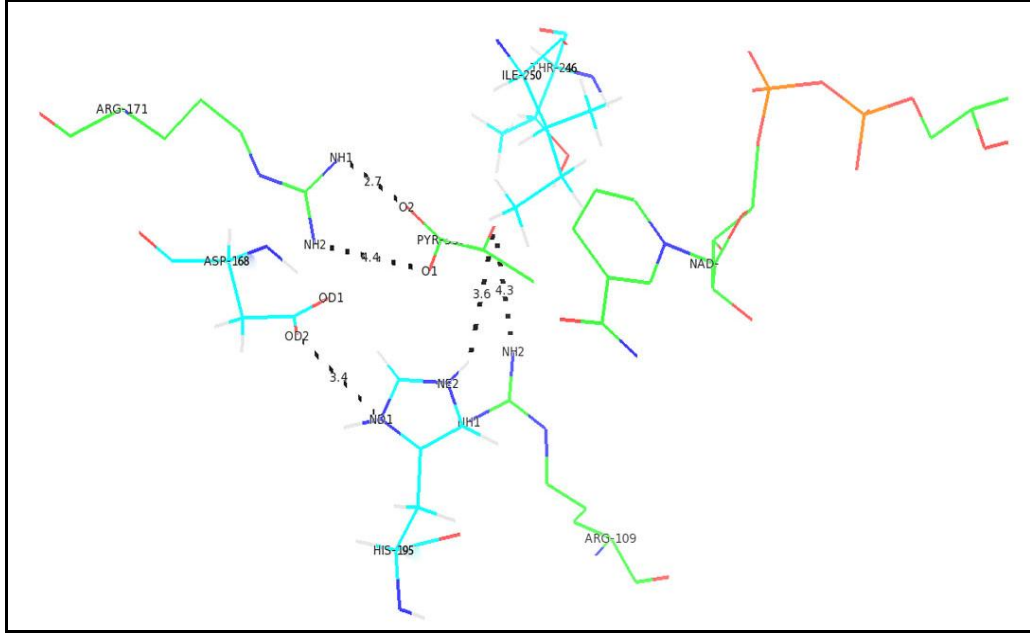
Şekil 3. 4 Tez çalışmasında belirlenen dizileme sonucu (2.sıra) ile *FnLDH* geni NCBI referans dizisinin (1.sıra) karşılaştırılması

3.2.3 Aminoasit Düzeyinde

Karşılaştırmalı dizi analizleri klasik tedavi yöntemlerine alternatif olarak yapıya dayandırılmış ilaç tasarımlarında çok önemli rol oynamaktadır. Bu karşılaştırmalar ile sadece primer yapıya bakılarak aktif bölge, koenzim bağlanma ve substrat bağlanma bölgesi hakkında fikir edinilebilir.

Bu amaçla; bu tezde klonlanmış olan *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enziminin aminoasit dizisi web tabanlı NCBI blastp programı kullanılarak insan human LDHA (pdbank erişim kodu: 1I10) ve LDHB (pdbank kodu:1I0Z), *Bacillus stearothermophilus* (pdbank kodu:1LDB), *Staphylococcus aureus* (pdbank kodu:3D00), *Tannerella forsythia* (NCBI erişim kodu: WP_014223968.1), *Prevotella intermedia* (NCBI erişim kodu: WP_014709500.1) ve *Porphyromonas gingivalis* (NCBI erişim kodu: WP_021679623.1) laktat dehidrogenaz enzimi ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3. 6).

Laktat dehidrogenazın katalitik bölgesi substratların (piruvat ya da laktat) bağlandığı ve kofaktörlerin bağlandığı (NADH ya da NAD⁺) bölge olmak üzere iki domainden oluşmaktadır. Substrat bağlanmasını katalizleyen residueeler Arg-171, Arg-109, His-195, Asp-168, Thr-246 aminoasitleridir [48], [49]. Yapılan karşılaştırmada verilen tüm türler için bu residülerin korunduğu belirlenmiştir (Şekil 3. 6). Aktif bölgedeki Arg-109 keto-asitlerin karbonil bağlarını polarize eder ve karbona hidrid transferi, oksijene proton transfer edilmesini sağlar. Arg-171 ise karboksillenmiş substrat ile iki önemli etkileşim noktası oluşturur ve substratın yönlendirilmesini sağlar. Ayrıca Ile-250 hidrofobik ortam oluşturarak Arg-171 ile substrat etkileşimi güçlendirir ve NADH NAD⁺ çevrimini stabilize eder. His-195 aktif bölgede proton alıcı verici olarak davranır ve substratı yönlendirir ve substrat enzime bağlandığı zaman Asp-168 His-195 ile etkileşime girerek protonlanmış formunu stabilize eder [50]. Glu-102 ve Thr-246 residüleri substratın ayrılmasından sorumludurlar. Katalitik bölgedeki piruvat, NADH enzim etkileşimi görsel olarak gösterilmiştir (Şekil 3. 5).



Şekil 3. 5 LDH enziminin aktif bölgesinin gösterilmesi (Arg-171, Arg-109, His-195, Asp-168, Thr-246, piruvat ve NADH gösterilmiştir)

Thr-246 *FnLDH*, human LDHA ve LDHB, *Bacillus stearothermophilus* *Staphylococcus aureus* türlerinde korunmuştur. Glu-102 ise *FnLDH* human LDHA ve LDHB ye göre kıyaslandığında Glu-102 aminoasiti Leu olarak değişmiştir. Aktif bölgedeki aminoasit farklılıklarını belirtmek için *FnLDH*, human LDHA ve LDHB karşılaştırılarak analiz edilmiştir (Şekil 3. 7). *FnLDH* human LDHA ve LDHB ye göre kıyaslandığında Gly-61 Ala, Glu-102 Thr, Tyr-237 Asp aminoasitlerine dönüşmüştür. Katalitik bölge olan 163-173 aminoasitleri arasında bir insersiyon, diğer katalitik bölge olan 98-109 aminoasitleri arasında baz değişimleri gerçekleşmiştir (Şekil 3. 7 bu bölgeler kare içine alınarak gösterilmiştir).

	27	29	32	48	53	61	65	72	76	85
1	ATLKDQLIYNL	LKEEQTPQNKI	TVVGV	GAVGMACAISILMKDLAD	ELALVDVIEDKLKGE	MDLQCHSL	ELRTPKIVSGKDYNTANSKLVI			
man-m										
man-h										
<u>FnLDH</u>										
B-stearo										
<u>S.aureus</u>										
<u>P.gingiv</u>										
<u>B.forsyt</u>										
<u>P.interm</u>										
98	109110	116	140	143	156	163	168171	173		
man-m										
man-h										
<u>FnLDH</u>										
B-stearo										
<u>S.aureus</u>										
<u>P.gingiv</u>										
<u>B.forsyt</u>										
<u>P.interm</u>										
188	195	204	237	243246	250	270				
man-m										
man-h										
<u>FnLDH</u>										
B-stearo										
<u>S.aureus</u>										
<u>P.gingiv</u>										
<u>B.forsyt</u>										
<u>P.interm</u>										
280	290	311	318	322						
man-m										
man-h										
<u>FnLDH</u>										
B-stearo										
<u>S.aureus</u>										
<u>P.gingiv</u>										
<u>B.forsyt</u>										
<u>P.interm</u>										

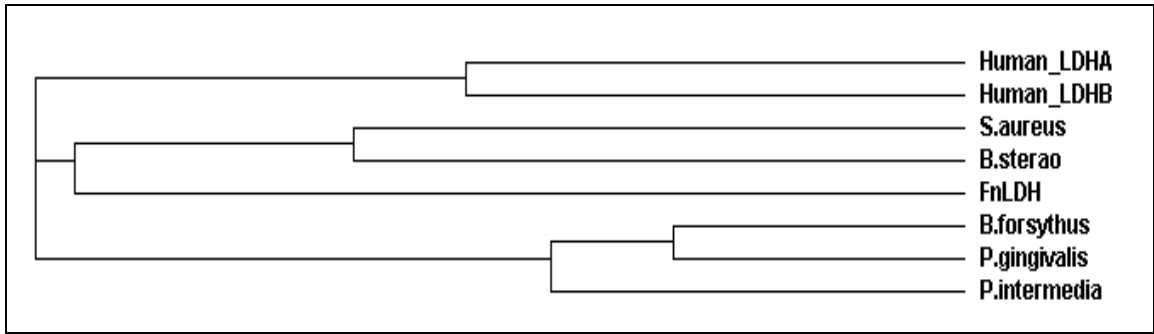
Şekil 3. 6 *FnLDH* ile diğer LDH'lar ile karşılaştırmalı analizi

1		2729	32	48	53	61	65	72	76	85
man-m	ATLKDQLIYNL.LKEEQTPQNKITVVGVGAVGMACAISILMKDLADELALVDVIEDKLGEMMDLQHGSLEFLRTPKIVSGKDYNTANSKLVI									
man-h	ATLKEKLIAPVAEEEEATVPNNKITVVGVGQVGMACAISILKSLADELALVDVLEDKLGEMMDLQHGSLEFLQTPKIVADKDYNTANSKIVV									
FnLDH	MLQTRKVGIVGVGHVGHSHCALSMLLQGVSDVM LD IIPEKAKAH AID CM DTIS FLPHRAIIISDGGIQELS KMD VIV									
98	109	110	116	140	143	156	163	168	171	173
man-m	ITAGARQOGE SRL NLVORNNVNI FKFI IPNVVKYSPNCKLLIVS NPVD ILTYVAWKISGF PKNR VIGSGCN LD SARF.RYLMGERLGVHP									
man-h	VTA GVR QOGE SRL NLVORNNVNI FKFI IPQIVKYSPDCIIIVS NPVD ILTYVTWKLSGLPKHRVIGSGCN LD SARF.RYLM AEK LGIHP									
FnLDH	ISV GSL TKN.EQ R LEELK ESI EAIKSFVPDVVKAGENGIFVTIT NPVD IVTYFVRELSGFPKNKVI GTGTGLD SAR KFI LS.EVTNIDS									
188	195	204		237	243	246	250			270
man-m	LSCHGWVLGE HGD SSVPVW SGM NVAGVS.LKTLHPDLGTDKDKQWKEVHKQV VESAYE VIK KG YTSWAIGLSVADLAESIMKNLRRVHPVSTM									
man-h	SSCHGWILGE HGD SSVAVW SGV NVAGVS.LQELNPEMGTDNDSENWKEVHKM VVESAYE VIK KG YTNWAIGLSVADLIESMLKNLSRIHPVSTM									
FnLDH	QVIQAYMLGE HGD TQVANF SSAT IQGV PFL GYMKSHPEQFKGIELSVLEKQV VRTAW FI ISGKNC TE FGIGCTCSNLVKAIFHNERRVLP CSAY									
280	290	311	318	322						
man-m	IKGLYGIKDDVFLSVPCILQNGISDLVKVTLTSEEEARLKK SADTI WGIQELQF....									
man-h	VKMGYGIENEVFLSLPCILNARGLT SVINQ KLDD VEA QLK SADTI WDIQDKLDL...									
FnLDH	LDGEYGYSGFYTG FI AIISNGIEEILELPLDERERKGF EAC AVMKKYI.EIGKSYKIV									

Şekil 3. 7 FnLDH ile üç boyutlu yapısı bilinen insan kas ve kalp kası LDH'ları ile karşılaştırmalı analizi

3.2.4 Filogenetik analiz

Yapılan filogenetik analiz sonucunda, diş florasında patojen olarak bilinen *Staphylococcus aureus*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* ve *Porphyromonas gingivalis* türlerinin *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz ile farklı grupta olduğu belirlenmiştir. *Bacillus stearothermophilus* ve *Staphylococcus aureus* ile *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz evrimsel köken olarak diğerk türlere göre daha yakındır (Şekil 3. 8).



3.3 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyon Vektörüne (pKK223-3) Klonlanması

3.3.1 *FnLDH* Geninin Klonlama Vektöründen Amplifikasyonu

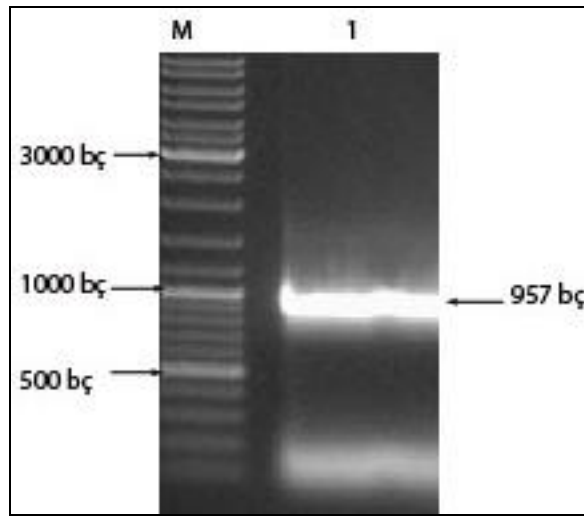
pKK223-3 ifade vektörüne aktarım öncesi ligasyona uygun *FnLDH* geninin çoğaltılması gerekmektedir. Bu amaçla forward *Fn3* ve reverse *Fn4* primerleri tasarlanmıştır. pKK223-3 ifade vektörünün klonlama bölgesinde vektörü kesen restriksiyon enzimleri gösterilmiştir (Şekil 2. 4). Vektördeki bu bölgeler ile *FnLDH* enzim kesim bölgelerini (3.2.2) karşılaştırdığımızda *EcoRI* ve *PstI* restriksiyon enzimlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu iki enzim *FnLDH* enzimin iç bölgeden kesmemekte ve vektörün klonlama bölgesinde kesim bölgeleri bulunmaktadır. *Fn3* primeri için yeşil ile gösterilen enzimin bağlanma olasılığı artıran bazlar ve sarı ile gösterilen bazlar enzim kesim bölgesini (*EcoRI*) ifade etmektedir. *Fn4* primeri için yeşil ile gösterilen bölge enzimin bağlanma olasılığı artıran, sarı ile gösterilen bazlar enzim kesim bölgesini (*PstI*), turkuaz sonlanma

kodonunu ve pembe ile gösterilen bazlar ekspresyon sonrası saflaştırma için 6-histag içeren bölgeyi ifade etmektedir.

Fn3: 5' **CGACCCGGAATT**CATGTTACAAACAAG 3'

Fn4: 5' **TTTTCTGCAGTTAGTGATGGTGATGGTGATG**TACTATTTTATAAGA 3'

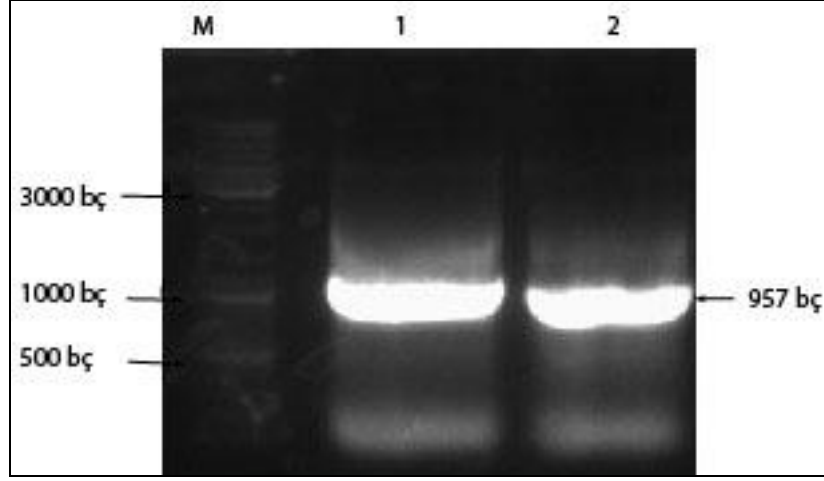
FnLDH geni, ifade vektörüne aktarılmak üzere (pKK223-3) rekombinant pGEM-T vektöründen Çizelge 2. 4 deki koşullar göz önüne alınarak amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucu PCR ürünü EtBr jelde koşturulmuş ve 957 baz çiftlik ürünün doğru bir şekilde amplifiye edildiği görülmüştür (Şekil 3. 9).



Şekil 3. 9 *FnLDH* geninin plasmid DNA'dan amplifikasyonu sonrası EtBr jel görüntüsü.
Hat M: GeneRuler DNA Marker, Hat 1: PCR ürünü

3.3.2 *FnLDH* Genini İçeren Ekspresyon Vektörünün (pKK223-3) *E. coli* JM109 Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

İfade vektörü (pKK223-3) ile *FnLDH* geninin ligasyonu gerçekleştirildikten sonra *E. coli* JM109 kompetan hücrelerine aktarılmıştır ve LB agar besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu inkübasyon sonucu petrilere pozitif olduğu düşünülen 2 tane koloni seçilmiştir. Bu koloniler 5 ml (amfisilinli) LB buyyona alınmış ve gece boyu inkübasyondan sonra plasmid DNA izolasyonu DNA QIAprep® Miniprep (QIAGEN) ile yapılmıştır. Çizelge 2. 4 de belirtilen koşullar ile amplifikasyon sonrasında PCR ürünü EtBr jelde yürütülmüştür ve jel görüntüsüne göre 2 kolonide pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 3. 10).



Şekil 3. 10 pKK233-3 ifade vektörüne klonlanan *FnLDH* geninin amplifikasyonu sonrası EtBr jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Marker, Hat 1 ve 2: PCR ürünü

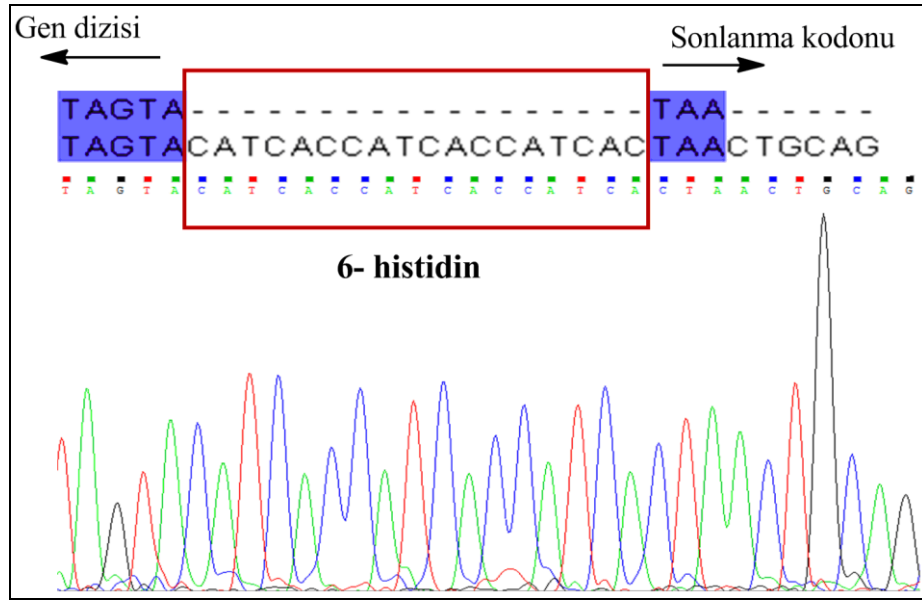
3.3.3 Gen Klonlanmasının Dizi Analizi İle Kontrolü

Klonlamanın pozitif sonuç olduğu tahmin edilen örneklerin dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi için 13 bp uzunluğundaki *Fn5* primeri tasarlanmıştır. Bu dizileme sonucu ile ekspresyon sonrası saflaştırma için gerekli olan 6-histaq bölgesi gösterilmiştir (Şekil 3. 11).

Bir sonraki basamak olarak ekspresyon aşamasından sonra *FnLDH* enzimi Ni-NTA kolonu ile saflaştırılacaktır. Bu saflaştırma basamağında histidin aminoasiti Ni-NTA matriksine affinite gösterip kolonda tutunacağı için klonlamanın bu basamağı kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple yapılan dizileme sonucu klonlanan *FnLDH* geninin sonuna 6-histidin başarı ile eklendiği gösterilmiştir.

3.4 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İkinci Ekspresyon Vektörüne (pLATE31) Klonlanması

pKK223-3 ekspresyon vektörüne klonlanan *FnLDH* geninin ifadesi yapıldıktan sonra enzim aktive sonuçlarına ve SDS-PAGE sonuçlarına bakıldığında ifadenin gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Bu sebeple diğer bir ifade vektörü olan pLATE31 vektörüne klonlanmıştır.



Şekil 3. 11 *FnLDH* Geninin ekspresyon vektörüne (pKK223-3) klonlanması sonrası analizi

3.4.1 PCR Primerlerinin Tasarımı

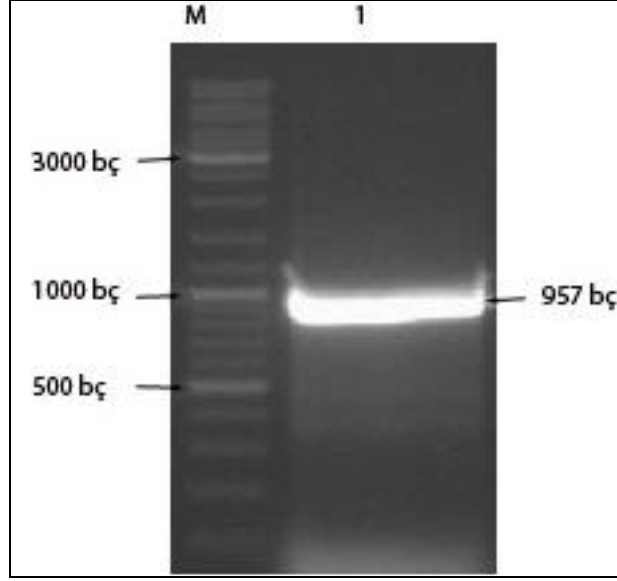
aLICator LIC Klonlama ve Ekspresyon Kit 3 (C-terminal His-tag) kitapçığında belirtilen primer tasarımı protokolüne göre forward *Fn6* ve reverse *Fn7* primerleri tasarlanmıştır. Genin 5' ve 3' ucu dizileri dikkate alınarak, tasarlanan primerlerin 5' ucuna pLATE31 vektörüne komplementer spesifik bazlar eklenmiştir. *Fn6* primerinde yeşil ile gösterilen vektöre komplementer bölgeyi ve *Fn7* primerindeki turkuaz ile gösterilen bölge 6-Histaq bölgesine ifade etmektedir. 6-histidin ekspresyon sonrası saflaştırma için önemli olduğundan primer tasarımında bu kısma önem gösterilmiştir.

***Fn6*:** 5' AGAAGGAGATATAACTATGTTACAAACAAG 3'

***Fn7*:** 5' GTGGTGGTGATGGTGATGGCTACTATTTATAAGA 3'

3.4.2 *FnLDH* Geninin Klonlama Vektöründen (pGEM-T) Amplifikasyonu

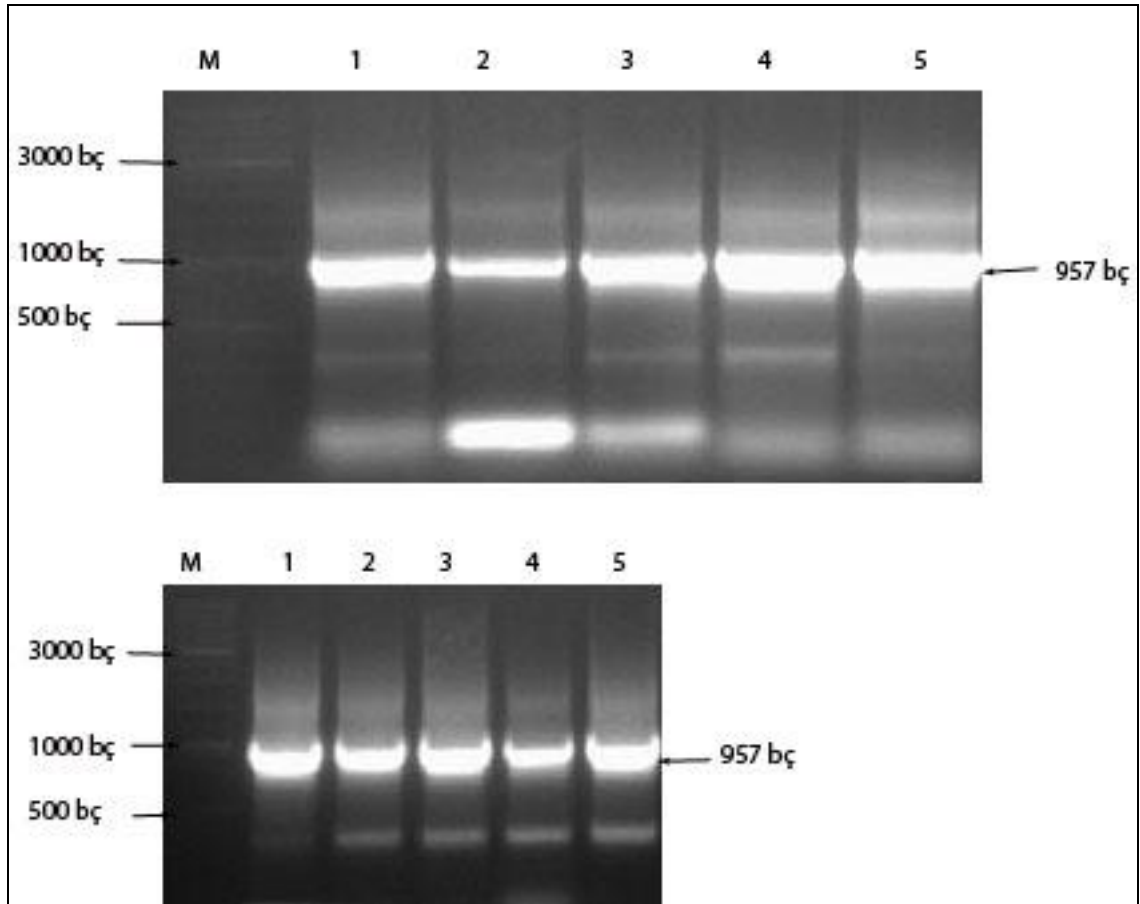
FnLDH geni pLATE31 vektörü ile ligasyonu öncesi Çizelge 2. 6 daki koşullar ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünü EtBr jelde yürütülmüş ve jel görüntüsüne göre *FnLDH* geni *Fn6* ve *Fn7* primerleri ile amplifiye edilebilmiştir (Şekil 3. 12).



Şekil 3. 12 *FnLDH* geninin plasmid DNA (pGEM-T)'dan amplifikasyonu sonrası EtBr jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Marker, Hat 1: PCR ürünü

3.4.3 *FnLDH* Genini İçeren Ekspresyon Vektörünün (pLATE31) *E. coli* BL21 (DE3) Kompetan Hücreye Transformasyonu

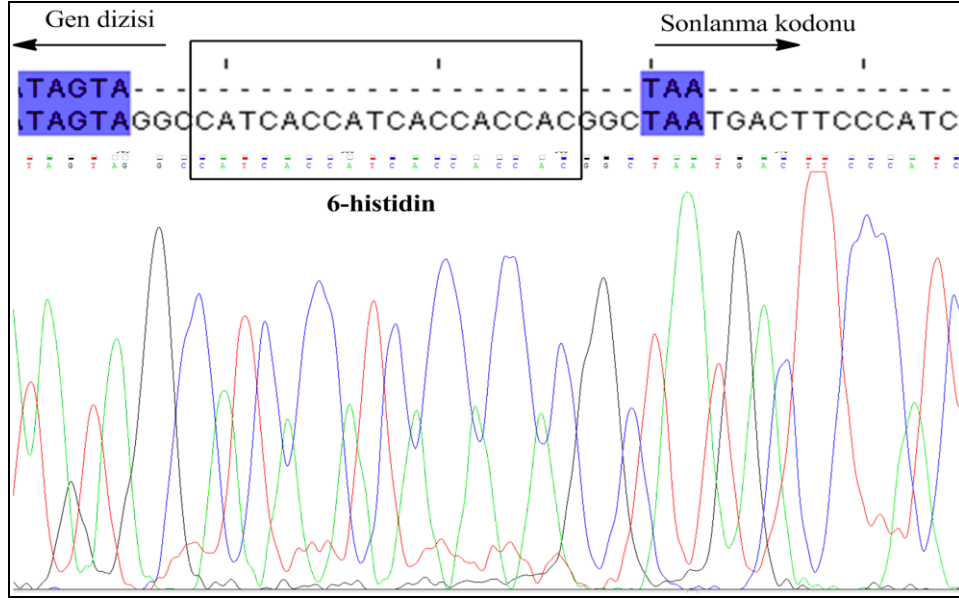
Elde edilen PCR ürünü PCR ürünü Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kullanılarak doğrudan saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası pLATE31 ifade vektörü ile *FnLDH* Çizelge 2. 7 deki reaksiyon ile ligasyonu gerçekleştirilmiş ve 2.2.6.3 de belirtilen protokol ile *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilmiş ve LB agar besiyerine ekilmiştir. Gece boyu inkübasyon sonrası gelişen kolonilerden 10 tane alınıp 5 ml LB buyyon (amfisilinli) besi yerine aktarılmıştır. Gece boyu inkübe edilen kültürlerden plasmid DNA izolasyonu DNA QIAprep®Miniprep (QIAGEN) ile yapılmış ve Çizelge 2. 8 deki koşullar sağlanarak *FnLDH* geni amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünü EtBr jelde yürütülmüş ve 10 örneğin doğru baz büyüklüğünü gösteren bant hizasında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3. 13).



Şekil 3. 13 *FnLDH* genini içeren pLATE31 ifade vektörünün *E. coli* BL21(DE3) kompetan hücreye transformasyonu sonrası amplifiye edilen *FnLDH* geninin EtBr jel görüntüsü. Hat M: GeneRuler DNA Marker, Hat 1,2,3,4,5,6,7,8,9 ve 10: Pozitif PCR Sonucu

3.4.4 Gen Klonlanmasının Dizi Analizi İle Kontrolü

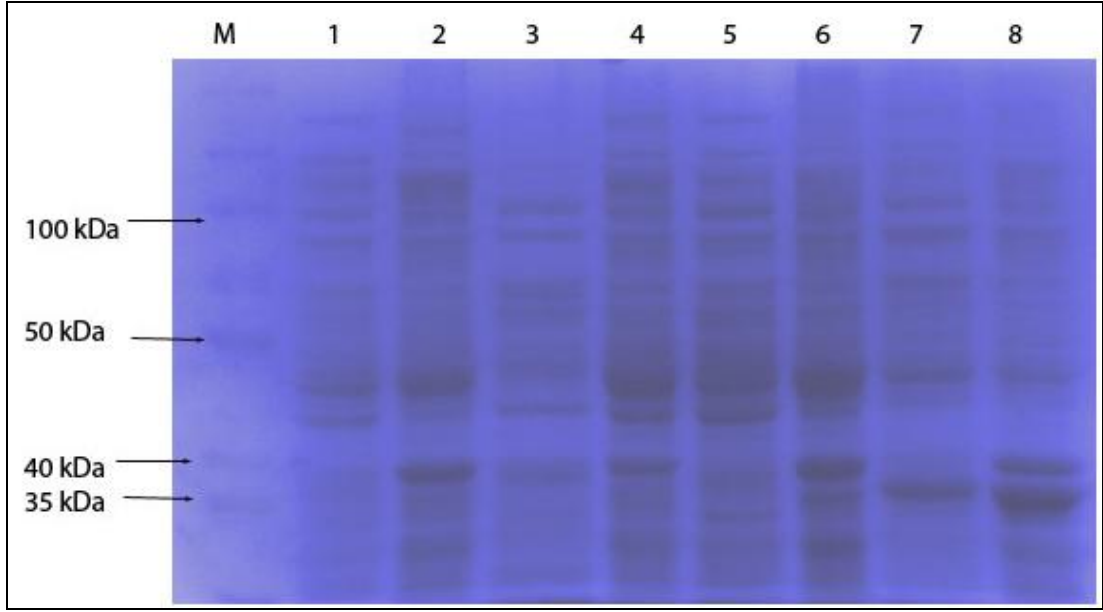
FnLDH genini içeren pLATE31 ifade vektörü *Fn6* primeri kullanılarak dizilenmiştir. Dizileme sonucu 3' ucunda 6-histidin olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3. 14)



Şekil 3. 14 pLATE31 ekspresyon vektörüne klonlanan *FnLDH* geni analizi

3.5 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyonu (pKK223-3 ifade vektörü)

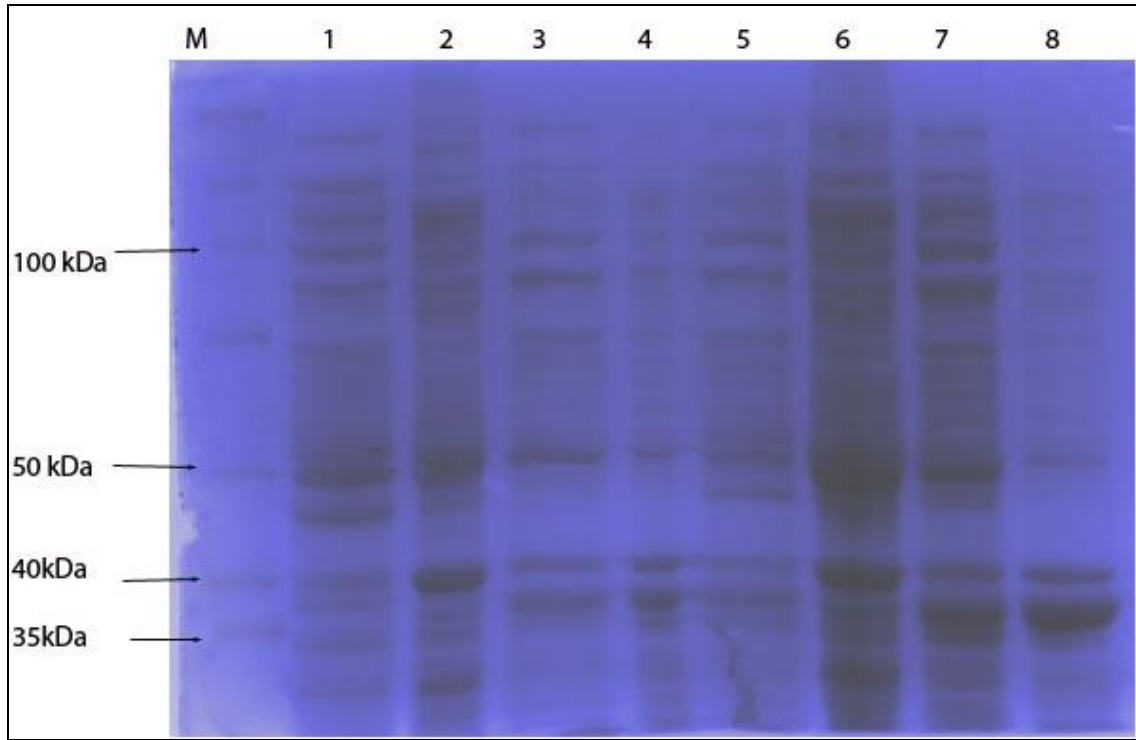
Belirtilen enzim kesim bölgelerini içeren primerler ile amplifiye edilip pKK223-3 ifade vektörüne klonlanan *FnLDH* geni için ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. 0,1 mM IPTG indüklemesi ile gerçekleştirilen ekspresyon sonrası gece boyu, 5 ve 3 saat inkübasyon sonrası alınan örneklerin SDS-PAGE analizinde yeterli enziminin ifade edilemediği gözlemlenmiştir (Şekil 3. 15). Rekombinant olmayan ve olan *E. coli* JM109 örneklerinin kıyasladığımızda bir farklılık görülememektedir. Bu sebeple aLICator™ LIC Klonlama ve Ekspresyon kitinin avantajlarından yararlanmak için, bu sistem ile beraber kullanılan pLATE31 ifade vektörüne klonlama yapılmıştır.



Şekil 3. 15 *FnlDH* enziminin ekspresyonu sonrası SDS-Page jel görüntüsü. Hat M: Protein Marker, Hat 1: *FnlDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* JM109 hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası supernatant, Hat 2: *FnlDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* JM109 hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası pellet, Hat 3: *FnlDH* geni içeren *E. coli* JM109 hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası supernatant, Hat 4: *FnlDH* geni içeren *E. coli* JM109 hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası pellet, Hat 5: *FnlDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* JM109 hücresi gece boyu inkübasyon sonrası supernatant, Hat 6: *FnlDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* JM109 hücresi gece boyu inkübasyon sonrası pellet, Hat 7: *FnlDH* geni içeren *E. coli* JM109 hücresi gece boyu inkübasyon sonrası supernatant, Hat 8: *FnlDH* geni içeren *E. coli* JM109 hücresi gece boyu inkübasyon sonrası pellet

3.6 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyonu (pLATE31 ifade vektörü)

Fn6 ve *Fn7* primerleri ile *FnlDH* geni içeren pGEM-T vektöründen amplifiye edilen gen Çizelge 2. 7 deki koşullar sağlanarak pLATE31 vektörüne klonlanmıştır. 0,5 mM IPTG ile indüklenen rekombinant hücrelerden geceboyu, 3 ve 5 saat sonra alınan örnekler SDS-page ile analiz edilmiştir (Şekil 3. 16). 34,5 kDa moleküler ağırlığı olan *FnlDH* enziminin ekspresyonu kontrol edilmiştir.



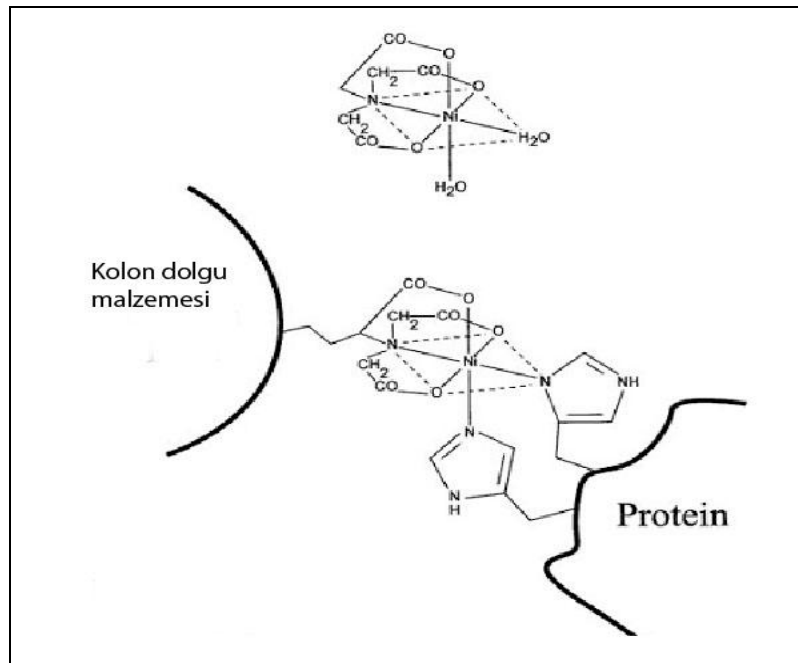
Şekil 3. 16 *FnLDH* geni ekspresyonunun SDS-page analizi. Hat M: Protein Marker, Hat 1: *FnLDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* BL21(DE3) hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası supernatant, Hat 2: *FnLDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* BL21(DE3) hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası pellet, Hat 3: *FnLDH* geni içeren *E. coli* BL21(DE3) hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası supernatant Hat 4: *FnLDH* geni içeren *E. coli* BL21(DE3) hücresi 5 saatlik inkübasyon sonrası pellet, Hat 5: *FnLDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* BL21(DE3) hücresi gece boyu inkübasyon sonrası supernatant, Hat 6: *FnLDH* geni içermeyen indüklenmiş *E. coli* BL21(DE3) hücresi gece boyu inkübasyon sonrası pellet, Hat 7: *FnLDH* geni içeren *E. coli* BL21(DE3) hücresi gece boyu inkübasyon sonrası supernatant, Hat 8: *FnLDH* geni içeren *E. coli* BL21(DE3) hücresi gece boyu inkübasyon sonrası pellet

3.7 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Protein Miktar ve Aktivite Tayini

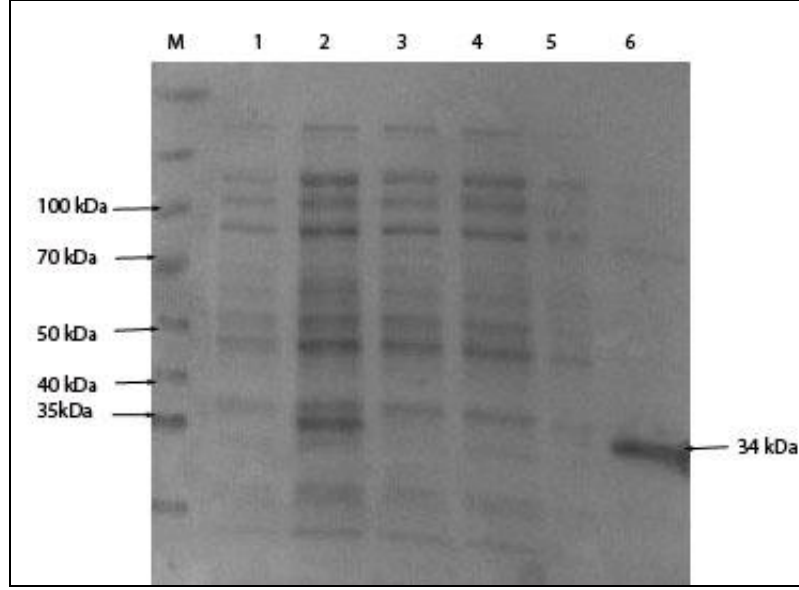
E. coli BL21(DE3)'te ekspresyonu sağlanan *FnLDH* enziminin saflaştırılması Ni-NTA agaroz kolonu kullanılarak yapılmıştır. Saflaştırma öncesi SDS-page analizi ve aktivite tayini için sonikasyon sonrası hücre lizatı örneği alınmıştır. Saflaştırma sırasında ise ilk süzöntü (flow-through), yıkama ve elüsyon örnekleri alınmıştır ve örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3. 19). Analiz sonucu saflaştırma sonrası saf protein 4. elüsyondan sonra toplanabildiği için ilk 3 elüsyonda bant gözlemlenememiştir. Saflaştırılan örnekler protein marker ve kontrol örneklerine göre kıyaslandığında

başarılı bir şekilde saflaştırıldığı görülmektedir ve 35 kDa bant hizasındadır. Diğer jelde ise 35 kDa bant hizasında hücre lizatında bant gözükmemekte, ilk süzöntüde ve yıkama örneklerinde ise bant gözükmemektedir. Bu karşılaştırmalara göre histidin ile işaretli rekombinant enzim olan *FnLDH* ile Ni-NTA agaroz etkileşime girdiği (Şekil 3. 17) ve kolonda tutunduğu, kolon yıkama aşamalarında diğer proteinlerin elimine edildiği ve sonrasında elüsyon aşamasında ise rekombinant enzimin kolondan saflaştırıldığı söylenebilir.

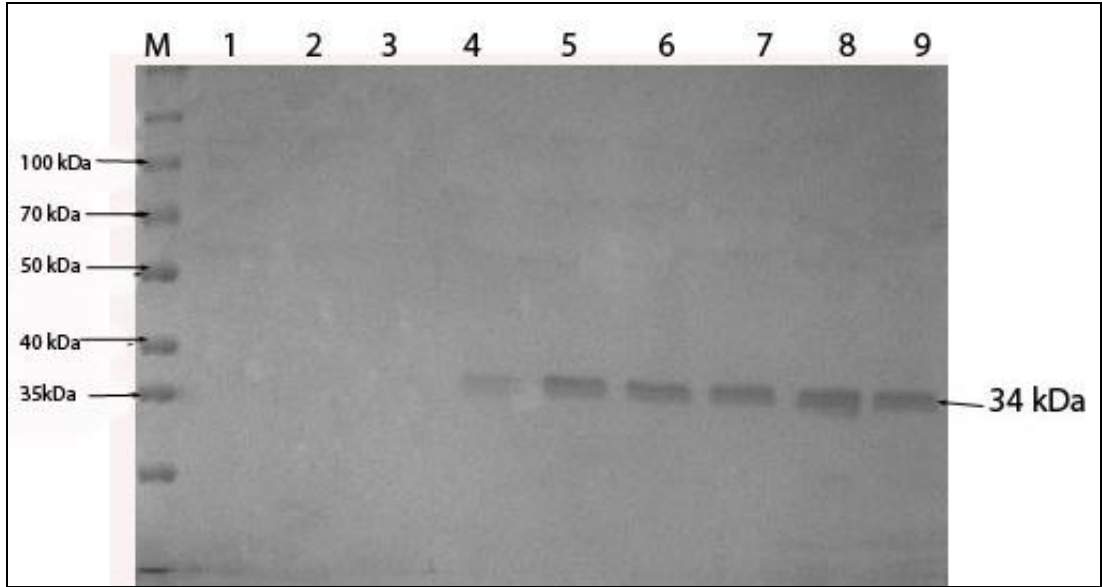
Ni-NTA ile histidine çok zayıf bir bağ oluşturur ve aynı şekilde imidazol ile de bağlanabilir ortama imidazol eklendiğinde histidin ile imidazol kolon ile etkileşim için yarışır. Eğer yüksek konsantrasyonda imidazol eklenirse Ni-NTA kolona tamamen imidazol bağlanacaktır ve histidin işaretli protein elüsyon çözeltisi ile kolondan alınabilecektir [51].



Şekil 3. 17 Ni-NTA ile histidin işaretli proteinin etkileşimi şematik diyagramı [51]



Şekil 3. 18 Saflaştırma sonrası jel görüntüsü. Hat M: Protein Marker, Hat 1: İlk süzüntü, Hat 2: Hücre lizati, Hat 3,4 ve 5: Yıkama örnekleri, Hat 6: Kontrol protein örneği



Şekil 3. 19 Saflaştırma sonrası jel görüntüsü. Hat M: Protein Marker, Hat 1,2,3,4,5,6,7 ve 8: Elüsyon örnekleri, Hat 9: Kontrol protein örneği (34 kDa)

2.2.10 protein konsantrasyon tayini yöntemine göre elüsyon örneklerimiz için kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Web tabanlı program kullanılarak *F_n*LDH ekstinsiyon katsayısı $18050 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ve moleküler ağırlığı 34697 Da olarak bulunmuştur. ΔA_{280} nm de elüsyonların verdiği absorbans değeri ölçülmüştür ve konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Saflaştırılan örnekler ve hücre lizati için

Çizelge 2. 9 daki koşullar sağlanarak spektrofotometrik yöntemle enzim aktivitesi ölçülmüştür (Çizelge 3. 2). Elde edilen bu sonuçlara göre *Fn*LDH enziminin <%95 saflıkta elde edilmesi sağlanmış ve protein ile ilgili olarak yapılacak olan ileriki deneysel analizlerin yapılmasının önü açılmıştır.

Çizelge 3. 2 Saflaştırma sonucu enzim miktar ve aktivite tayini (ΔA_{280} miktar ve ΔA_{340} aktivite tayini yapılmıştır. HL: hücre lizati, E1-10: elüsyonlar)

Örnek Adı	ΔA_{280}	Konsantrasyon (mg/ml)	$\Delta A_{340}/dk$ değeri
HL	-	-	0,281
E1	0,002	0,192	0,001
E2	0,002	0,192	0,001
E3	0,002	0,192	0,001
E4	0,005	0,480	0,072
E5	0,010	0,960	0,186
E6	0,015	1,440	0,163
E7	0,017	1,632	0,151
E8	0,012	1,152	0,198

3.8 *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enziminin Homoloji Modellemesi

*Fn*LDH aminoasit dizisi ile 3-boyutlu yapısı bilinen proteinleri PROTEIN BLAST yardımıyla karşılaştırılmıştır ve yapılan sorguya göre *Lactobacillus casei* L-lactate dehydrogenase %41 aminoasit benzerliği, toplam dizi çakıştırma skoru 243, E değeri ise $2e-77$ dir. E değeri iki dizinin çakıştırılmasındaki anlamlılık değerini ifade etmektedir bu değer ne kadar küçük olursa o kadar iki dizi benzerdir denebilir. Bu sonuçlara göre en fazla benzerlik 2ZQY pdb kodlu *Lactobacillus casei* L-lactate dehydrogenase enzimidir (Şekil 3. 20). MODELLER programı ile homoloji modellemede kalıp yapı olarak alınarak *Fn*LDH için tahmini bir 3-boyutlu yapı oluşturulmuştur ve bu yapı PyMOL pdb görüntüleyicisi ile çizilmiştir (Şekil 3. 21).

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Chain A, Penta Mutant Of Lactobacillus Casei Lactate Dehydrogenase	243	243	95%	1e-77	41%	3VKU_A
Chain A, T-State Structure Of Allosteric L-Lactate Dehydrogenase From	243	243	95%	2e-77	41%	2ZQY_A
Chain A, Structure Determination Of The Allosteric L-Lactate Dehydrog	239	239	95%	7e-76	40%	1LLC_A
Chain A, Crystal Structure Of Non-Allosteric L-Lactate Dehydrogenase	231	231	98%	1e-72	40%	1EZ4_A
Chain A, Crystal Structure Of L-Lactate Dehydrogenase From Bacillus	220	220	96%	1e-68	38%	3PQD_A
Chain A, Crystal Structure Of L-Lactate Dehydrogenase From Bacillus	219	219	96%	5e-68	38%	3PQE_A
Chain A, Crystal Structure Of Lactate Dehydrogenase From Staphyloco	207	207	94%	2e-63	37%	3D0O_A
Chain A, Crystal Structure Of Lactate Dehydrogenase Mutant (A85r) Frc	206	206	94%	2e-63	37%	3H3J_A

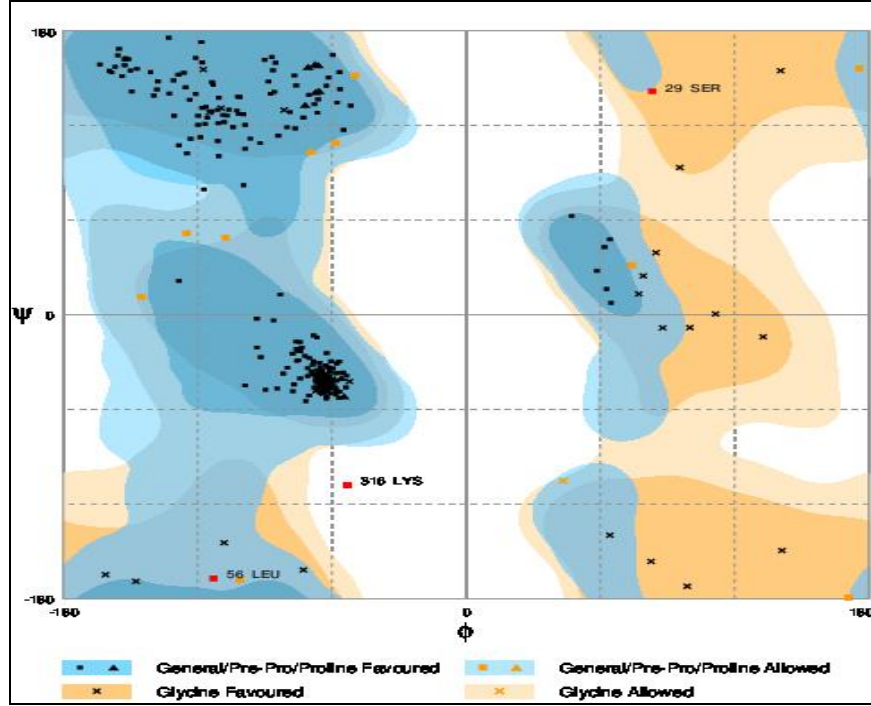
Şekil 3. 20 *Fn*LDH ile 3-boyutlu yapısı bilinen enzimlerin karşılaştırılması



Şekil 3. 21 *Fn*LDH'nin PyMOL ile oluşturulan 3-Boyutlu yapısı

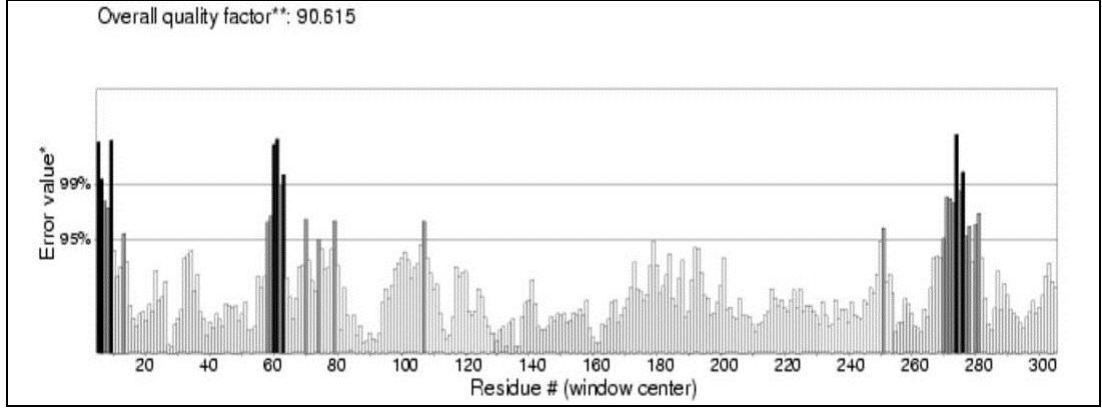
Oluşturulan bu yapının enerji minimizasyonu HYPERCHEM programı ile yapılmıştır ve ramahandran grafiği RAMPAGE ile oluşturulmuştur. Programın verdiği çıktılarına göre aminoasit dizisinin % 95,6 (302 rezidü) tercih edilen bölgede, % 3,5 (11 rezidü) izin verilen bölgede ve %0,9 (3 rezidü) dış bölgede yer almaktadır. Bir polipeptitde ana

zincirde N-C alfa ile C-C alfa nispeten serbest olarak dönebilirler. Bu dönmeler yapıdaki tüm residüler için phi-psi (ψ - ϕ) itme açılarını (dihedral) gösterir. Her bir konformasyon için yapı, atomlar arasındaki yakın etkileşimler için test edilmektedir. İdeal olarak, eğer %90 residue izin verilen bölgede ise yapının stereokimyasal kalitesi yüksek olduğu söylenebilir [52].



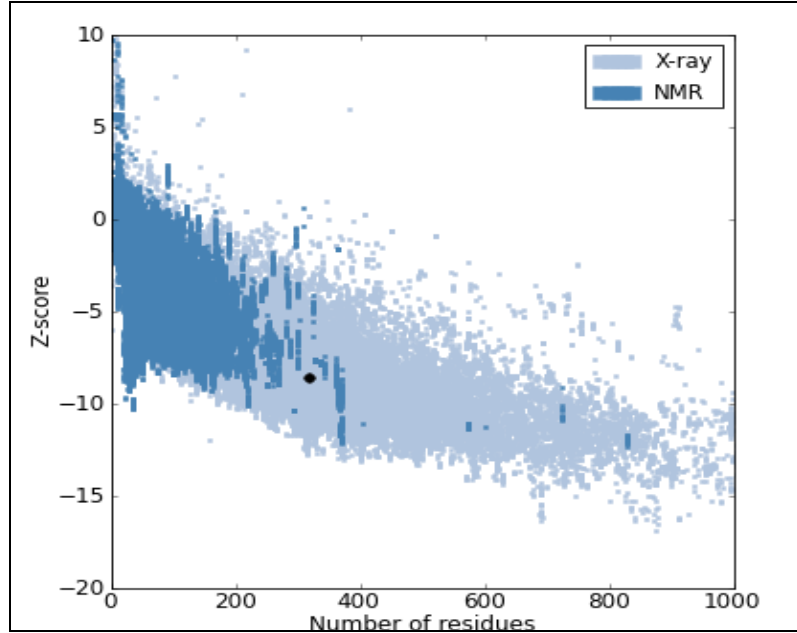
Şekil 3. 22 *FnLDH* RAMPAGE ile oluşturulan ramahandran grafiği

Web tabanlı ERRAT programı yardımıyla homoloji modelleme ile oluşturulan 3-boyutlu yapının güvenilirliği test edilmiştir. Bu program bağ yapmamış atomlar arasındaki etkileşim istatistiklerini analiz eder ve güvenilir yüksek çözünürlükteki protein yapıları ile karşılaştırır [53]. ERRAT programı yardımıyla elde edilen çıktıda oluşturulan yapının doğruluğu % 90,615 olarak verilmiştir (Şekil 3. 23). Alınan bu çıktıya göre değer güvenilebilir sınırlar (%90 ve üzeri) içerisinde.

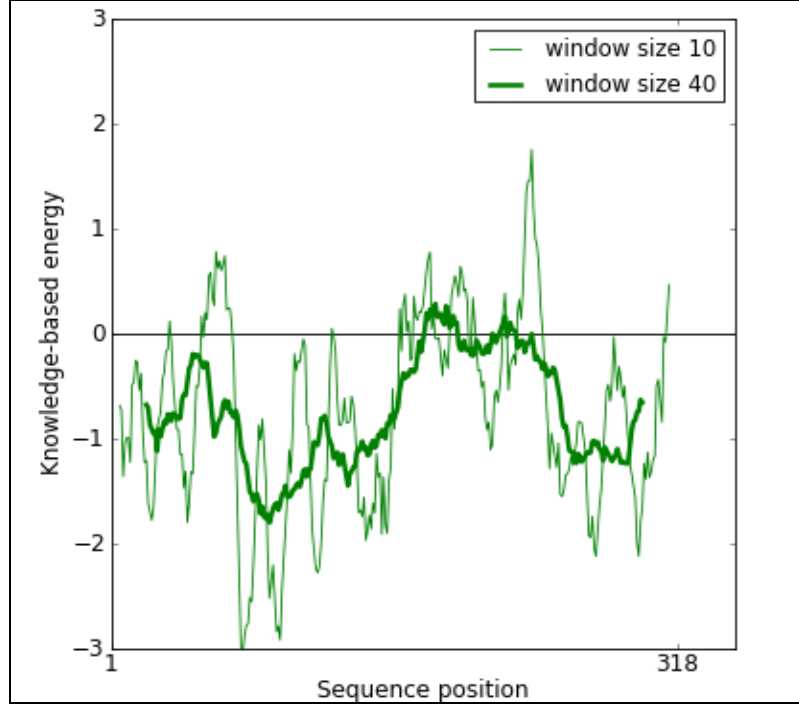


Şekil 3. 23 ERRAT program çıktısı

Web tabanlı ProSA programı ile 3-boyutlu yapının doğruluğu değerlendirilmiştir. Bu program teorik ve deneysel olarak tanımlanan yapıları karşılaştıran bir programdır. Düşük çözünürlükteki yapılar ile yüksek çözünürlükteki yapılar ile karşılaştırarak elde edilen 3-boyutlu yapının hızlı bir şekilde potansiyel hataları belirlenir [54]. Elde edilen çıktıya göre çalışmamızdaki *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enzimi X-ray kristalografi ile yapısı tanımlanan yapılara benzemektedir (Şekil 3. 24). Enerji grafiğinde pozitif değerler o modelin problemli ve hatalı bir model olduğu yönünde fikir verir. Verilen enerji grafiğinde oluşturulan 3- boyutlu yapının güvenilir yapı olduğu söylenebilmektedir (Şekil 3. 25).



Şekil 3. 24 ProSA program çıktısı



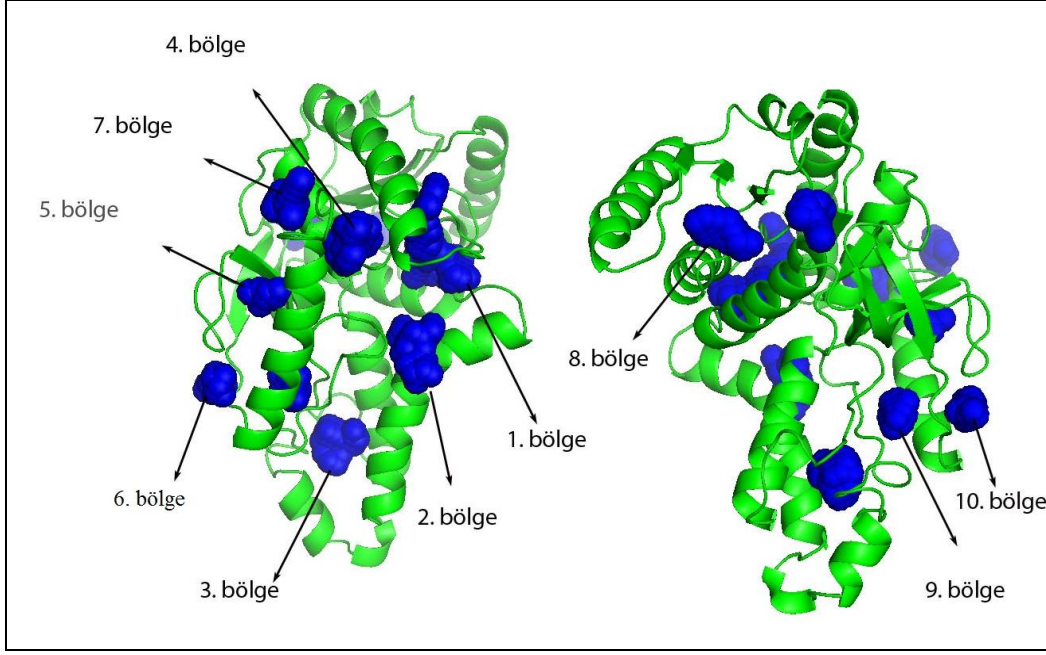
Şekil 3. 25 Aminoasit dizisi pozisyonlarının ProSA ile gösterilen enerji grafiği

3.9 Protein-Ligand Etkileşimleri

Bir protein üzerinde ligand bağlanma bölgelerinin tanımlanması, moleküler docking (yanaştırma/yerleştirme) çalışmaları ve *de novo* ilaç tasarımı için önem taşımaktadır. Proteinlerin fonksiyonu proteinlerin diğer ligandlar ile nasıl etkileştiği belirler. Ayrıca fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi yapıya dayandırılmış ilaç tasarım çalışmalarında spesifik bölgelerin hedeflenmesi için önemlidir ve tedavi edici yöntemlerin gelişimine yardımcı olmaktadır [55] [56].

Genelde ligand bağlanma bölgeleri tahmin metotları protein yüzeylerini analiz eder. Çalışmamızda ligand bağlanma bölgelerinin tahmini için web tabanlı Q-SiteFinder ve Pocket-Finder yazılımları kullanılmıştır. Bu yazılım proteinler ile basit van der Waals problemleri arasındaki etkileşimleri kullanır ve enerji olarak favori bölgelerini belirler [55] [56].

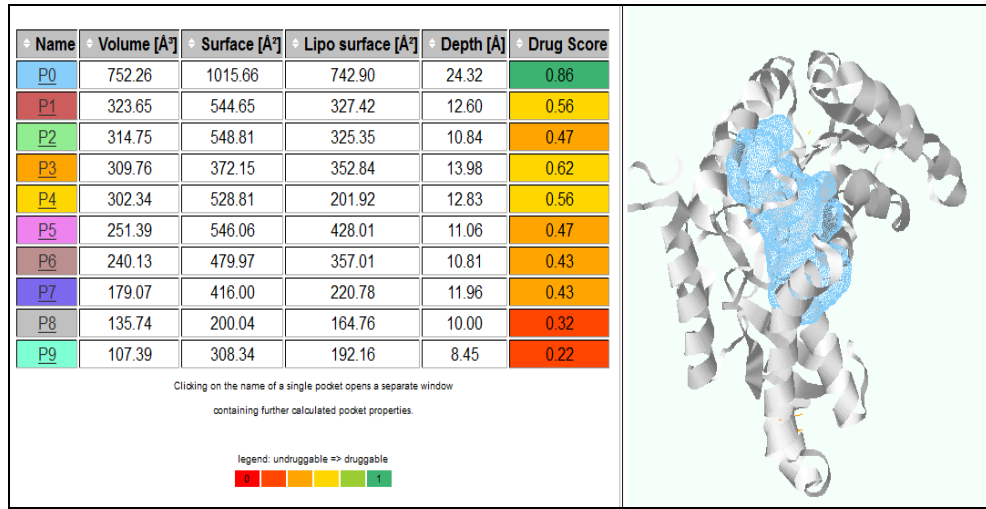
Homoloji modellemesi ile 3 boyutlu yapısı oluşturulan *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enzimi için muhtemel ligand bağlanma bölgeleri Q-SiteFinder yazılımı ile 10 bölge bulunmuştur (Şekil 3. 26) .



Şekil 3. 26 Protein ligand etkileşimleri. Bu şekilde liganlar mavi ile gösterilmiştir. 8, 9 ve 10. bölgelerin gösterimi için model kendi ekseninde 180 ° döndürülmüştür.

Bu bölgeler ligand bağlanma bölgelerinin olasılık derecelerine göre sıralanmıştır. 1. Bölge daha ayrıntılı incelendiğinde, Şekil 3. 29 de liganın etkileştiği rezidüler ve Şekil 3. 28 da ise liganın etkileştiği bölge ve ligan gösterilmiştir. Belirtilen bu bölgelerin insan kas ve kalp kası laktat dehidrogenaz enzimlerinin aktif bölgesi ile uyumaktadır. 98-109. rezidüleri arasındaki bölge konak organizma olan insandan çok farklılık göstermektedir. Bu farklılığa rağmen ligand bağlanma bölgesinde farklılık göstermediği görülmüştür.

Q-SiteFinder yazılımının yanı sıra DoGSiteScorer programı ile paralel olarak aynı işlemler yapılmıştır. Bu programın verdiği çıktılarda 10 bölge belirlenmiştir, bu bölgeler ligand bağlanma olasılıkları sıralanmıştır ve en yüksek skorun 1. Bölge olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3. 27). Belirlenen bölgenin ilaç skoru 1'e yakın olduğu ve bu nedenle model proteinin cep bölgelerinin ilaç tasarımına uygun olduğu görülmektedir [57].



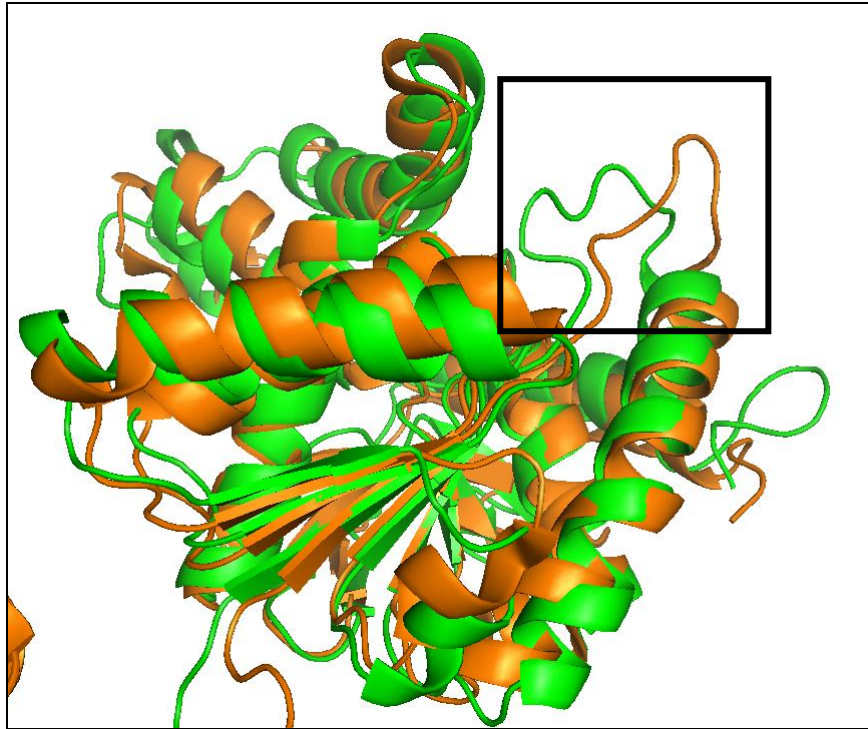
Şekil 3. 27 Model proteinin aktif bölgelerinin DoGSitescorrer görüntüsü



Şekil 3. 28 Muhtemel ligand bağlanma bölgesi. Ligand turuncu, ligandın etkileşimde bulunduğu rezidüler mavi ile gösterilmiştir.

	1	2729	32	48	53	61	65	72	76	85				
man-m	ATLKDQLIYNL.LKEEQTPQNKITV	VGVGAV	GMACAISILMKDLADELALVDVIEDKLKGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNTANSKLVI											
man-h	ATLKEKLIAPVAEEEEATVPNNKITV	VGVGQV	GMACAISILGKSLADELALVDVLEDKLKGEMMDLQHGSLFLQTPKIVADKDYSVTANSKIVV											
FnLDH	MLQTRKVG	VGVGHV	GSHCALSMLLQGVSD	EMVLMDI	PEKAKAHAI	DCMDTIS	FLPHRAIISDGGIQLSKMDVIV							
	98	109	110	116	140	143	156	163	168	171	173			
man-m	ITAGARQQEGE	SRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPNCKLL	VSNP	V	DILTYVAVKISGFPKNRVIGSG	CNLD	SARF	RYLMGERLG	VHP					
man-h	VTAGVRQQEGE	SRLNLVQRNVNVFKFIIPQIVKYSPDCIIV	VSNP	V	DILTYVTWKL	SGLPKHRVIGSG	CNLD	SARF	RYLMAEKLGIHP					
FnLDH	ISVGS	LTKN	IQRL	EELKGSLEA	IKSFVPD	VVKAGFNGIFV	ITNP	V	DIVTYFVREL	S	GFPKNVIGTG	GLDSARLKR	LS	EVTNIDS
	188	195	204		237	243	246	250		270				
man-m	LSCHEWVLGE	HGDSS	VPVW	SGMNVAGVS.LKTLHPDLGTDKDKQWKEVHKQV	VESAYEVIK	LKGYT	SWAIGLSVADLAESIMKNLRRVHPVSTM							
man-h	SSCHEWILGE	HGDSS	VAVW	SGVNVAGVS.LQELNPEMGTDNDSENWKEVHKM	VESAYEVIK	LKGYTN	WAIGLSVADLIESMLKNLSRIHPVSTM							
FnLDH	QVIO	YMLGEHGD	TQ	VANFSSATI	QGV	PFLGYMKSHPEQFKGIELSVLEKQV	RTAWD.IIS	GKNCTEF	GIGCTCSNLVKAIFHNERRVLPCSAY					
	280	290		311	318	322								
man-m	IKGLYGIKDDVFLSVPCILGQNGISDLVKVTLTSEEEARLKK	SADTLWGIQKELQF...												
man-h	VKMGYGIENEVFLSLPCILNARGLTSVINQKLKDD	EVAQLKK	SADTLWDIQKDLKDL...											
FnLDH	LDGEYGYSGFFYTG	V	PAIGSNGIEEILEPLDERERKGFEAACAVMKKYI	EIGKSYKIV										

Şekil 3. 29 Protein ligand etkileşim bölgeleri



Şekil 3. 30 98-109 residüleri arası bölgenin konak organizma olan insan kas laktat dehidrogenaz enzimi ile karşılaştırılması (Yeşil: FnLDH Turuncu: İnsan kas LDH)

3.10 Tartışma ve Öneriler

Birçok inflamasyonda çevresel faktörler, fiziksel ve kimyasal stres, yiyecek faktörleri ve mikroorganizmalar önemli rol oynamaktadır. Bu etkenler ile tedavi edilebilir akut ve patolojik kronik inflamasyon oluşmaktadır. Diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, artrit, otoimmün ve periodontal inflamasyonlar patolojik hastalıklardandır [3].

Bu çalışmada periodontal dokuda oluşan inflamasyon etiyolojisinde önemli faktörlerden olan *Fusobacterium nucleatum* çalışılmıştır. Bu tür hastalıklı ya da sağlıklı periodontal dokuda metagenomik çalışmalar ile tespit edilmiştir ve periodontal hastalıklarda dominant tür olduğu belirlenmiştir [58].

Fusobacterium nucleatum dokularda hızlı bir şekilde kolonileşme özelliğine sahiptir ve bu özelliği ile periodontal biyofilm oluşumunda köprü mikroorganizma olarak ifade edilmektedir. Bu bakteri dinlenme halinde enerjisini glikoz metabolizması ile sağlamaktadır ve bu metabolizma sonucu laktat, bütirat ve format kısa zincirli yağ asitleri oluşmaktadır. Oluşan bu metabolitler dokularda inflamasyona ve kokuya sebep olmaktadır. Daha önceki çalışmalarda *Fusobacterium nucleatum* ürettiği metabolitler ile konak organizmanın NF- κ B (nuclear factor κ B) gen ekspresyon ve nötrofil transkripsiyon düzeyi belirlenmiştir [15], [26].

Periodontal hastalıkların günümüzdeki tedavisinde konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Dental plak oluşumunu ortadan kaldırmak için geniş spektrumlu antibiyotik tedavileri uygulanmaktadır. Bu tedavide kullanılan antibiyotikler β -laktam grubudur ve bu antibiyotiklere karşı duyarlılık test çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalarda Amoksilin, Amfisilin, Amoksilin/klavunat, Sefoksitin, Klaritromisin, Klindamisin, Eritromisin, Metronidazol, Penisilin, Tetrasiklin antibiyotikleri test edilmiştir. Eritromisin ve Klaritromisin antibiyotiklerine karşı % 98 ve Amfisilin'e karşı % 3,8 oranında dirençli olduğu belirtilmiştir. Eritromisin ve klaritromisin bakterinin protein sentezine müdahale ederek, amfisilin ise hücre membran gelişimini durdurarak bakterinin gelişimi durdurduğu bilinmektedir. Fakat bazı çalışmalarda *Fusobacterium nucleatum* alt türlerinin β -laktamaz üreterek bu gruptaki antibiyotiklere dirençli hale geldiği belirtilmektedir [32].

Periodontal hastalıklarda kullanılan bu yöntemlerin inflamasyona özgü olmadığı ve çoğu kez yetersiz kaldığı bilinmektedir. Kullanılan antibiyotığın tüm bakterilere etki ettiği düşünüldüğünde vücuttaki mikroorganizma-konak arasındaki kommensal yaşam dengesine etki edeceği de tahmin edilmektedir. Bu sebeple yapıya dayandırılmış ilaç tasarımına yol gösterecek çalışmalara ihtiyacı duyulmaktadır. İlaç tasarımında hedef mikroorganizmanın metabolik yolları hedef alınarak çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda *Plasmodium falciparum* glikolitik enzimi laktat dehidrogenaz enziminin konak organizmadan aktif bölgedeki farklı rezidülerin olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıktan faydalanılarak bu bölge hedef olarak kullanılmıştır [37], [39], [59].

Bu tezde glikoz metabolizmasında piruvatın laktata çevrilmesini katalizleyen laktat dehidrogenaz enzim ile çalışılmış ve gen ilk defa bu tez çalışmasında klonlanarak analiz edilmiştir. Laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan 957 bp uzunluğundaki gen *Fusobacterium nucleatum*'dan amplifiye edilmiştir. Beklenen büyüklükte doğru bant elde edilmiştir ve daha sonra DNA saflaştırılarak hedef parça pGEM-T Easy vektör sistemine klonlanmıştır. Hedef genin ekspresyonu için pLATE31 ifade vektörüne klonlanmış ve ifadesi sağlanmıştır. 34697 Da molekül ağırlığındaki *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enzimi Ni-NTA kolonu kullanılarak % 95 saflıkta başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır ve aktivite tayini yapılmıştır.

İleri çalışmalar olarak protein 3-boyutlu yapısı homoloji modelleme ile oluşturularak enzim katalitik bölgesi, konak organizma enziminden farklılıkları belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre, konak organizmada aktif bölgede yer alan 98-109 arası rezidüler *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enziminde tamamen farklılaşmıştır ve diğer bölgeler ise çoğunlukla korunduğu belirlenmiştir (Şekil 3. 29). Bu farklılık ilaç tasarım çalışmalarında hedef bölge olarak gösterilebilmektedir.

Bir protein üzerinde ilaç bağlanabilir bölgeler web tabanlı araçlar ile bulunmuş ve bölüm 3.9 da belirlenmiştir. Belirtilen bölgeler aminoasit düzeyindeki analizler ile örtüşmektedir ve bu bölgelerden 1. Bölge bir ligandın bağlanması için enerjisi en düşük bölge olduğu gösterilmiştir. Bu bölgenin enzim katalitik bölgesi olduğu deneysel çalışmalar ile belirlenmiştir [48].

İleriki çalışmalarda *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enzimi ifadesinin optimizasyonunun yapılması öngörülmektedir. Bu amaçla gen ekspresyonunu maksimum değere ulaştıracak optimum IPTG konsantrasyonunun, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi öngörülmektedir.

Bu çalışmada konak organizma ile *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enziminin aktif bölgeleri karşılaştırılmış ve farklılıklar belirlenmiştir. İleriki çalışmalarda bu farklılıklardan faydalanarak belirlenmiş olan hedef bölgenin yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ile analiz edilip enzim aktivitesi üzerindeki öneminin belirlenmesi öngörülmektedir.

Bu farklılıklardan faydalanarak enzim inhibisyonu çalışmaları yapılması hedeflenmektedir. Bu çalışmalarda homoloji modelleme yöntemi ile 3-boyutlu yapısı tahmin edilen protein ile moleküler docking çalışmaları ve devamında tespit edilen inhibitörler ile *in vitro* çalışmalarının yapılması öngörülmektedir.

Yapılan bu çalışmalar ile birçok dokuda, biyofilm oluşumunda köprü mikroorganizma olan ve inflamasyona sebep olan *Fusobacterium nucleatum*'un gelişimi baskılanabilecektir. Özellikle periodontal hastalıklarda salgıladığı hücre dışı proteolitik enzimler ile doku hasarına sebep olan *Porphyromonas gingivalis* bakterisinin dokuda kolonileşmesinde birincil rol oynamaktadır [28]. *Fusobacterium nucleatum*'un gelişiminin baskılanması ile periodontal hastalıklar için, konvansiyonel tedavi olan antibiyotik tedavisine alternatif olarak, hedefe yönelik ve moleküler temelli bir tedavi yöntemi tanımlanabilecektir. Bu tedavide *Fusobacterium nucleatum*'un sebep olduğu kolorektal karsinoma, endokartidis, artrit, beyin, karaciğer ve deri apseleri gibi hastalıklarında tedavisinde hastalara yeni yöntemler sunulabilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] de Vos, W. Engstrand, L. Drago, L. Reid, G. Schaubert, J. Hay, R. Mendling, W. Schaller, M. Spiller, R. ve Gahan, C., (2012). "Human Microbiota in Health and Disease", *SelfCare Journal*, 3: 1-68.
- [2] Blumberg, R. ve Powrie, F., (2012). "Microbiota, Disease, and Back to Health: A Metastable Journey", *Science Translational Medicine*, 4.
- [3] Aggarwal, B.B. Shishodia, S. Sandur, S.K. Pandey, M.K. ve Sethi, G., (2006). "Inflammation and cancer: How hot is the link?", *Biochemical Pharmacology*, 72: 1605-1621.
- [4] Bolstad, A.I. Jensen, H.B. ve Bakken, V., (1996). "Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*", *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 55-&.
- [5] Castellarin, M. Warren, R.L. Freeman, J.D. Dreolini, L. Krzywinski, M. Strauss, J. Barnes, R. Watson, P. Allen-Vercoe, E. Moore, R.A. ve Holt, R.A., (2012). "*Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma", *Genome Research*, 22: 299-306.
- [6] Strauss, J. White, A. Ambrose, C. McDonald, J. ve Allen-Vercoe, E., (2008). "Phenotypic and genotypic analyses of clinical *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium periodonticum* isolates from the human gut", *Anaerobe*, 14: 301-309.
- [7] Karpathy, S.E. Qin, X. Gioia, J. Jiang, H.Y. Liu, Y.M. Petrosino, J.F. Yerrapragada, S. Fox, G.E. Haake, S.K. Weinstock, G.M. ve Highlander, S.K., (2007). "Genome Sequence of *Fusobacterium nucleatum* Subspecies Polymorphum - a Genetically Tractable *Fusobacterium*", *Plos One*, 2.
- [8] Morris, M.L. Andrews, R.H. ve Rogers, A.H., (1997). "Investigations of the taxonomy and systematics of *Fusobacterium nucleatum* using allozyme electrophoresis", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 103-110.
- [9] Kapatal, V. Anderson, I. Ivanova, N. Reznik, G. Los, T. Lykidis, A. Bhattacharyya, A. Bartman, A. Gardner, W. Grechkin, G. Zhu, L.H. Vasieva, O. Chu, L. Kogan, Y. Chaga, O. Goltsman, E. Bernal, A. Larsen, N. D'Souza, M. Walunas, T. Pusch, G. Haselkorn, R. Fonstein, M. Kyrpides, N. ve Overbeek, R., (2002). "Genome sequence and analysis of the oral bacterium

Fusobacterium nucleatum strain ATCC 25586", Journal of Bacteriology, 184: 2005-2018.

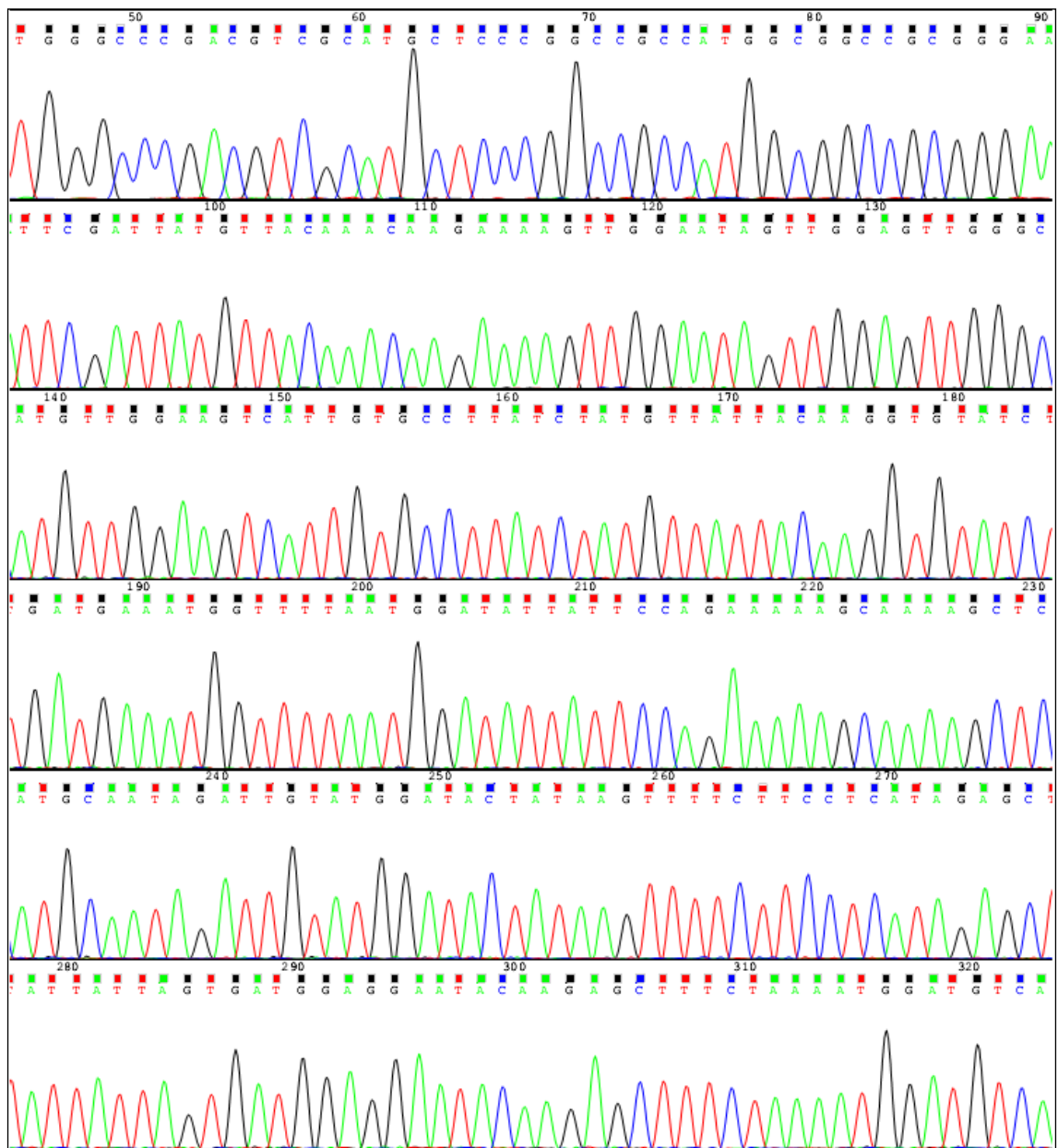
- [10] Chew, J., (2010). Protein Expression in *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 Biofilm Cells Induced by an Alkaline Environment, eds.: The University of Adelaide.
- [11] Zhang, C.H. Yang, H. Yang, F.X. ve Ma, Y.J., (2009). "Current Progress on Butyric Acid Production by Fermentation", Current Microbiology, 59: 656-663.
- [12] Roberts, G.L., (2000). "Fusobacterial infections: an underestimated threat", British Journal of Biomedical Science, 57: 156-162.
- [13] Strauss, J., (2011). "Investigating a role for *Fusobacterium nucleatum* in Inflammatory Bowel Disease".
- [14] Dharmani, P. Strauss, J. Ambrose, C. Allen-Vercoe, E. ve Chadee, K., (2011). "*Fusobacterium nucleatum* infection of colonic cells stimulates MUC2 mucin and tumor necrosis factor alpha", Infection and immunity, 79: 2597-2607.
- [15] Milward, M. Chapple, I. Wright, H. Millard, J. Matthews, J. ve Cooper, P., (2007). "Differential activation of NF- κ B and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens", Clinical & Experimental Immunology, 148: 307-324.
- [16] Scannapieco, F., (2004). "Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease?", Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995), 25: 16.
- [17] Chung, W.O. ve An, J.Y., "Periodontal Disease and Gingival Innate Immunity–Who Has the Upper Hand?".
- [18] Abrahão, P. ve Stach-Machado, D.R., "Innate Immune and Inflammation".
- [19] Signat, B. Roques, C. Poulet, P. ve Duffaut, D., (2011). "Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease", Curr Issues Mol Biol, 13: 25-35.
- [20] Hatem, A.E., "Epidemiology and Risk Factors of Periodontal Disease".
- [21] Merchant, A.T. Oranbandid, S. Jethwani, M. Choi, Y.-H. Morrato, E.H. Pitiphat, W. Mayer-Davis, E.J. Hendryx, M. Ducatman, A.M. ve Zullig, K.J., (2005). "Position paper: epidemiology of periodontal diseases", Journal of Periodontology, 76: 1406-1419.
- [22] Albandar, J.M., (2005). "Epidemiology and risk factors of periodontal diseases", Dental Clinics of North America, 49: 517-532.
- [23] Kesic, L. Milasin, J. Igic, M. ve Obrodovic, R., (2008). "Microbial etiology of periodontal disease-mini review", Med Biol, 15: 1-6.
- [24] Borrell, L.N. ve Papapanou, P.N., (2005). "Analytical epidemiology of periodontitis", Journal of Clinical Periodontology, 32: 132-158.

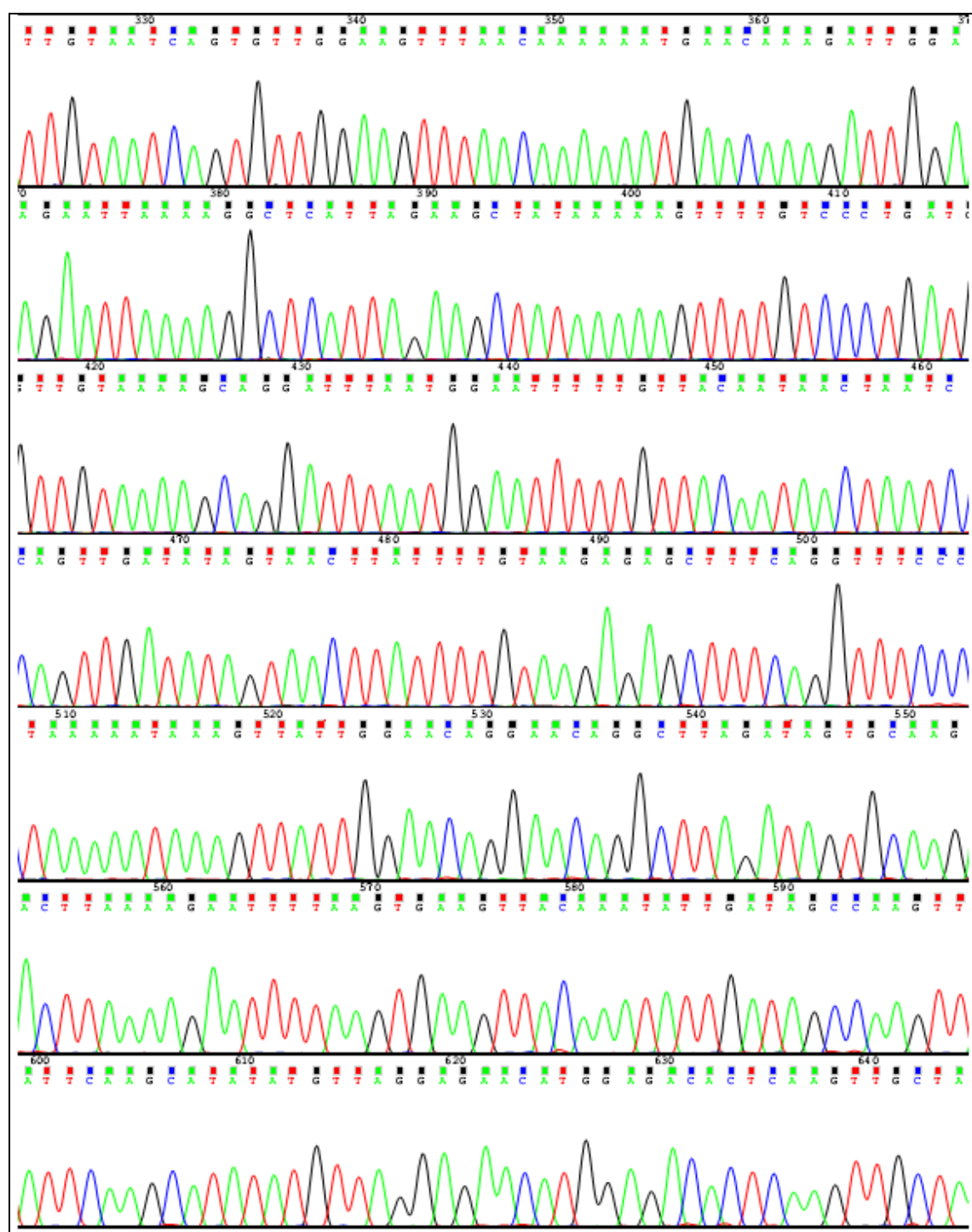
- [25] Morimoto-Yamashita, Y. Tokuda, M. Ito, T. Kikuchi, K. Maruyama, I. Torii, M. ve Kawahara, K.-i., "Japanese Apricot (Ume): A Novel Therapeutic Approach for the Treatment of Periodontitis".
- [26] Wright, H. Chapple, I. Matthews, J. ve Cooper, P., (2011). "*Fusobacterium nucleatum* regulation of neutrophil transcription", Journal of periodontal research, 46: 1-12.
- [27] Kobayashi, N. Ishihara, K. Sugihara, N. Kusumoto, M. Yakushiji, M. ve Okuda, K., (2008). "Colonization pattern of periodontal bacteria in Japanese children and their mothers", Journal of periodontal research, 43: 156-161.
- [28] Saito, Y. Fujii, R. Nakagawa, K.I. Kuramitsu, H. Okuda, K. ve Ishihara, K., (2008). "Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*", Oral microbiology and immunology, 23: 1-6.
- [29] Baker, P. Coburn, R. Genco, R. ve Evans, R., (1987). "Structural determinants of activity of chlorhexidine and alkyl bisbiguanides against the human oral flora", Journal of dental research, 66: 1099-1106.
- [30] de Souza Filho, J.A. Diniz, C.G. Barbosa, N.B. de Freitas, M.C.R. Lopes Neves, M.S. Nogueira da Gama Mazzei, R. Coelho, C.M. ve da Silva, V.L., (2012). "Morphological, biochemical, physiological and molecular aspects of the response of *Fusobacterium nucleatum* exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobials", Anaerobe.
- [31] Nyfors, S. Könönen, E. Syrjänen, R. Komulainen, E. ve Jousimies-Somer, H., (2003). "Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51: 107-112.
- [32] Senhorinho, G.N. Nakano, V. Liu, C. Song, Y. Finegold, S.M. ve Avila-Campos, M.J., (2012). "Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas spp.* and *Fusobacterium spp.* in dogs with and without periodontitis", Anaerobe, 18: 381-385.
- [33] Kubinyi, H., (1998). "Structure-based design of enzyme inhibitors and receptor ligands", Curr. Opin. Drug Discov. Dev, 1: 4-15.
- [34] Wermuth, C.G., (2011). The practice of medicinal chemistry: Academic Press.
- [35] Klebe, G., (2000). "Recent developments in structure-based drug design", Journal of molecular medicine, 78: 269-281.
- [36] Anderson, A.C., (2003). "The process of structure-based drug design", Chemistry & biology, 10: 787-797.
- [37] Turgut-Balik, D. Shoemark, D.K. Moreton, K.M. Sessions, R.B. ve Holbrook, J.J., (2001). "Over-production of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* opens a route to new antimalarials", Biotechnology letters, 23: 917-921.

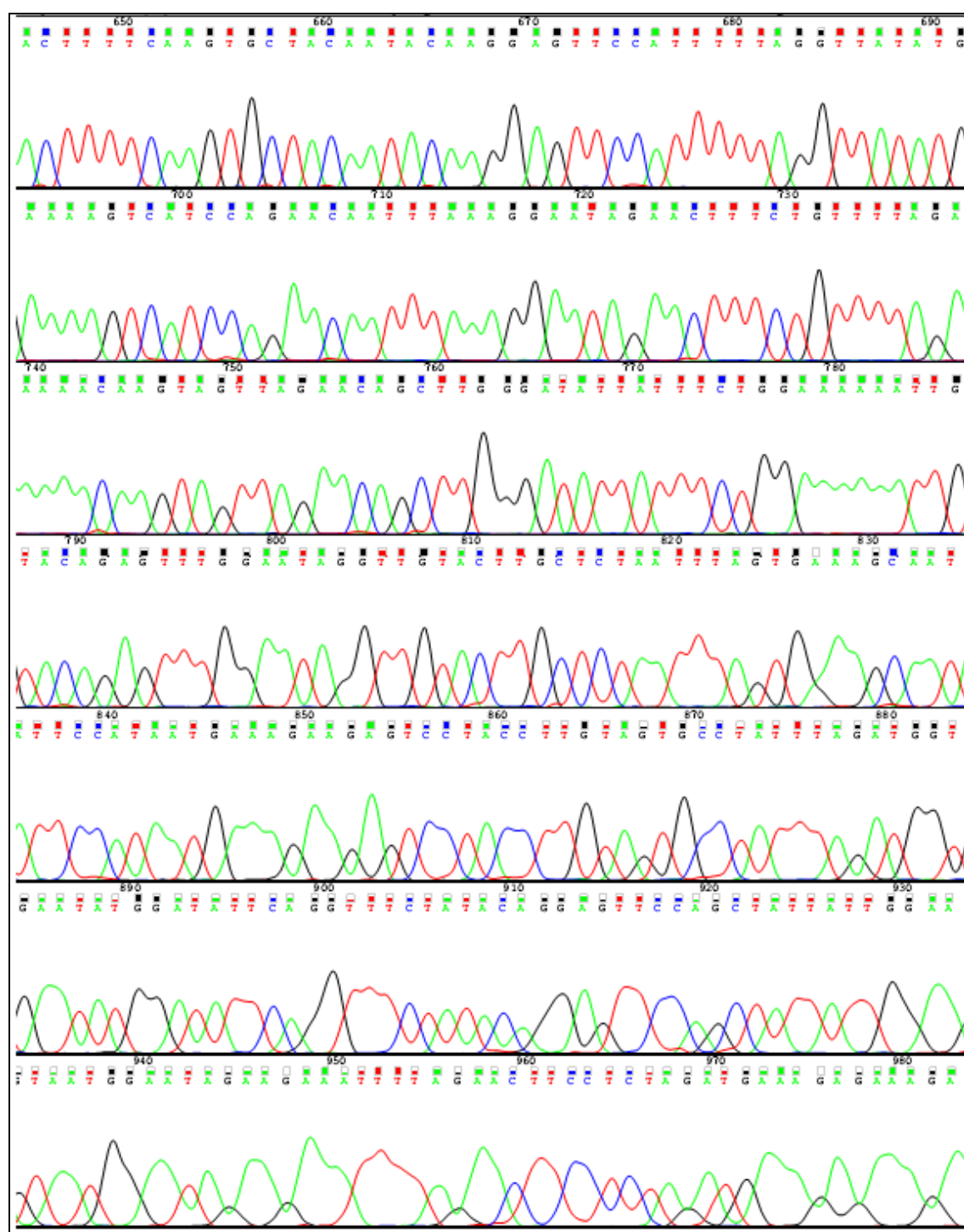
- [38] Turgut-Balik, D. Akbulut, E. Shoemark, D.K. Celik, V. Moreton, K.M. Sessions, R.B. Holbrook, J.J. ve Brady, R.L., (2004). "Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, *Plasmodium vivax*", Biotechnology letters, 26: 1051-1055.
- [39] Dunn, C.R. Banfield, M.J. Barker, J.J. Higham, C.W. Moreton, K.M. Turgut-Balik, D. Brady, R.L. ve Holbrook, J.J., (1996). "The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design", Nature Structural & Molecular Biology, 3: 912-915.
- [40] Sessions, R.B. Dewar, V. Clarke, A.R. ve Holbrook, J.J., (1997). "A model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and its implications for the design of improved antimalarials and the enhanced detection of parasitaemia", Protein engineering, 10: 301-306.
- [41] Cameron, A. Read, J. Tranter, R. Winter, V.J. Sessions, R.B. Brady, R.L. Vivas, L. Easton, A. Kendrick, H. ve Croft, S.L., (2004). "Identification and activity of a series of azole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity", Journal of Biological Chemistry, 279: 31429-31439.
- [42] Connors, R. Schambach, F. Read, J. Cameron, A. Sessions, R.B. Vivas, L. Easton, A. Croft, S.L. ve Brady, R.L., (2005). "Mapping the binding site for gossypol-like inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase", Molecular and biochemical parasitology, 142: 137-148.
- [43] Promega, (2010). "pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual": <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/ProtCards/pGEM%20T%20and%20pGEM%20T%20Easy%20Vector%20Systems%20Quick%20Protocol.pdf>. Erişim tarihi 25 Aralık, 2013.
- [44] Scientific, T., (2013). "aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System": http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/coa_k1291.pdf. Erişim tarihi 25 Aralık, 2013.
- [45] Helmholtz-muenchen, (2013). "pKK223-3 ekpression vector": http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/Other_vectors/pKK223_3_map-MCS.pdf. Erişim tarihi 25 Aralık, 2013.
- [46] Sambrook, J. Russell, D.W. ve Russell, D.W., (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)".
- [47] Eswar, N. Webb, B. Marti-Renom, M.A. Madhusudhan, M. Eramian, D. Shen, M.y. Pieper, U. ve Sali, A., (2006). "Comparative protein structure modeling using Modeller", Current protocols in bioinformatics: 5.6. 1-5.6. 30.
- [48] Holbrook, J. Liljas, A. Steindel, S.J. ve Rossmann, M., (1975). "Lactate dehydrogenase", The enzymes, 11: 191-292.
- [49] Smiley, I.E. Koekoek, R. Adams, M.J. ve Rossmann, M.G., (1971). "The 5Å resolution structure of an abortive ternary complex of lactate

dehydrogenase and its comparison with the apo-enzyme", *Journal of Molecular Biology*, 55: 467-484.

- [50] Wilks, H.M. Hart, K.W. Feeney, R. Dunn, C.R. Muirhead, H. Chia, W.N. Barstow, D.A. Atkinson, T. Clarke, A.R. ve Holbrook, J.J., (1988). "A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework", *Science*, 242: 1541-1544.
- [51] Hainfeld, J.F. Liu, W. Halsey, C.M. Freimuth, P. ve Powell, R.D., (1999). "Ni-NTA-gold clusters target his-tagged proteins", *Journal of structural biology*, 127: 185-198.
- [52] Morris, A.L. MacArthur, M.W. Hutchinson, E.G. ve Thornton, J.M., (1992). "Stereochemical quality of protein structure coordinates", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 12: 345-364.
- [53] Colovos, C. ve Yeates, T.O., (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions", *Protein Science*, 2: 1511-1519.
- [54] Wiederstein, M. ve Sippl, M.J., (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", *Nucleic acids research*, 35: W407-W410.
- [55] Laurie, A.T. ve Jackson, R.M., (2005). "Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites", *Bioinformatics*, 21: 1908-1916.
- [56] Burgoyne, N.J. ve Jackson, R.M., (2006). "Predicting protein interaction sites: binding hot-spots in protein-protein and protein-ligand interfaces", *Bioinformatics*, 22: 1335-1342.
- [57] Volkamer, A. Kuhn, D. Grombacher, T. Rippmann, F. ve Rarey, M., (2012). "Combining global and local measures for structure-based druggability predictions", *Journal of chemical information and modeling*, 52: 360-372.
- [58] Rogers, A.H., (1998). "Studies on fusobacteria associated with periodontal diseases", *Australian dental journal*, 43: 105.
- [59] Chaikuad, A. Fairweather, V. Connors, R. Joseph-Horne, T. Turgut-Balik, D. ve Brady, R.L., (2005). "Structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: complexes with NADH and APADH", *Biochemistry*, 44: 16221-16228.









ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emrah SARIYER
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.01.1985 ELAZIĞ
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : esaryer@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Teknik Üniversitesi	2009
Lise	Fen	Elazığ Gazi Lisesi	2002

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011-halen	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma görevlisi
2010	Gümüşhane Üniversitesi	Araştırma görevlisi

YAYINLARI

Bildiri

1. Emrah SARIYER, Ayşegül ERDEMİR, Mike MILWARD, Paul R. COOPER, Dilek TURGUT-BALIK, *Fusobacterium nucleatum* Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin Klonlanması, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya-TÜRKİYE, (2012)
2. Emrah SARIYER, Ayşegül ERDEMİR, Mike MILWARD, Paul R. COOPER, Dilek TURGUT-BALIK, Expression of Lactate Dehydrogenase Gene From *Fusobacterium nucleatum*, 38 th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013, St. Petersburg-RUSYA (2013)
3. Emrah SARIYER, Mike MILWARD, Paul R. COOPER, Dilek TURGUT-BALIK, Purification and characterization of lactate dehydrogenase enzyme from *Fusobacterium nucleatum*, V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2013, Madrid-İSPANYA (2013)
4. Emrah SARIYER, Dilek TURGUT-BALIK, *Fusobacterium nucleatum* laktat dehidrogenaz enziminin homoloji modellemesi, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, (2013)
5. Sinem YAKARSÖNMEZ, Ebru ÇAYIR, Emrah SARIYER, Mike MILWARD, Paul R. COOPER, Dilek TURGUT-BALIK, Cloning and Sequence Analysis of Enolase Gene from *Fusobacterium nucleatum*, II. Uluslararası Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi, İstanbul-TÜRKİYE, 2013

ÖDÜL

1. TÜBİTAK kongre katılım bursu, XIII.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, TÜRKİYE, 2013