



**İNSAN ALDEHİT DEHİDROGENAZ İZOENZİMLERİNİN
(ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2) KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI
ANTİBİYOTİKLERİN BU ENZİMLERİN AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yeliz DEMİR

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

2018

Her hakkı saklıdır.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İNSAN ALDEHİT DEHİDROGENAZ İZOENZİMLERİNİN
(ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2) KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI
ANTİBİYOTİKLERİN BU ENZİMLERİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yeliz DEMİR

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır.



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

İNSAN ALDEHİT DEHİDROGENAZ İZOENZİMLERİNİN (ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2) KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI ANTİBİYOTİKLERİN BU ENZİMLERİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Yeliz DEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma 11/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı - Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza

Üye : Prof. Dr. İsmail ÇELİK

İmza

Üye : Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 17.05.2018 tarih ve 20.1.2 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN

Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN ALDEHİT DEHİDROGENAZ İZOENZİMLERİNİN (ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2) KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI ve BAZI ANTİBİYOTİKLERİN BU ENZİMLERİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yeliz DEMİR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Bu çalışmada, insan beyin cDNA'sı kullanılarak aldehit dehidrogenaz izoenzimleri (ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2) pET SUMO vektörüne klonlandı ve başarılı bir şekilde eksprese edildi. Oluşturulan rekombinant konstraktlar çapraz PCR ile doğrulandı. Elde edilen rekombinant proteinler *Escherichia coli* BL21 (DE-3)'de eksprese edildi. İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG) induksiyonu ile üretilen hekzahistidin (6xHis) kuyruğuna sahip füzyon proteinler anti-his antikorunu kullanarak yapılan western blot yöntemiyle doğrulandı ve yaklaşık 70 kDa'luk füzyon proteinler tespit edildi. ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 enzimleri nikel-nitritotriasetik asit (Ni-NTA) afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimlerin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant elde edildi. ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 enzimleri mol kütlesi sırasıyla 68,45; 69,31 ve 67,85 kDa olarak belirlendi. Enzimlerin doğal halinin molekül kütlesi ise Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu kullanılarak sırasıyla 277,97; 281,83 ve 275,42 kDa olarak belirlendi. Böylece enzimlerin dört alt birimden oluştuğu tespit edildi. Ayrıca saflaştırılan hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin karakterizasyonu yapılarak enzimin optimum pH, optimum iyonik şiddet ve optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Daha sonra saflaştırılan rekombinant enzimlerin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri araştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri ile inhibisyon tipleri tespit edildi.

2018, 207 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aldehit dehidrogenaz, antibiyotikler, klonlama, rekombinant protein, enzim saflaştırılması

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF HUMAN ALDEHYDE DEHYDROGENASE ISOENZYMES (ALDH1A1, ALDH1A3 AND ALDH2) AND INVESTIGATION OF SOME ANTIBIOTICS EFFECTS ON ENZYMES ACTIVITY

Yeliz DEMİR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Biochemistry Division

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

In this study, aldehyde dehydrogenase isoenzymes (ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2) were cloned into pET SUMO vector by using human brain cDNA and expressed successfully. The recombinant constructs created plasmids were confirmed by cross PCR. This recombinant proteins were over expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE-3). Fusion protein with hexahistidine (6xHis) tail produced by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction were confirmed by western blotting using anti-his antibody and ~70 kDa fusion proteins were detected. ALDH1A1, ALDH1A3 and ALDH2 enzymes were purified by using nickel-nitrilotriacetic acid affinity chromatography. To check the purity and determine the molecular mass of the purified enzyme SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed and a single band was observed. Molecular mass of SUMO-hALDH1A1, hALDH1A3 and hALDH2 enzymes were determined as 68.45, 69.31 and 67.85 kDa, respectively. The molecular weight of enzymes were estimated to be 277.97, 281.83 and 275,42 kDa by Sephadex G-100 gel filtration chromatography, respectively. Thus, it was determined that the enzymes were composed of four subunits. In addition, optimal pH, optimal ionic strength and optimal temperature values were determined for characterization of purified hALDH1A1, hALDH1A3 and hALDH2 enzymes. Then, effects of some antibiotics on hALDH1A1, hALDH1A3 and hALDH2 enzymes activity were investigated. For antibiotics that exhibit inhibitory effect K_i constants and inhibition types were calculated by the help of Lineweaver-Burk curves.

2018, 207 pages

Keywords: Aldehyde dehydrogenase, antibiotics, cloning, recombinant protein, purification of enzymes

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyerek her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı gerçekleştirmemde bana her türlü imkanı sağlayan, çalışmalarım boyunca beni yönlendiren Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVIÖĞLU, Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN ve Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER, Sayın Dr. Arş. Gör. Hamit CEYLAN, Sayın Dr. Arş. Gör. Melike YILDIZ, Sayın Dr. Arş. Gör. Zuhâl ALİM, Sayın Arş. Gör. Sümeyye AKBULUT, Sayın şeyda Nur KALIN, Sayın Hatice Esra ASLAN, Sayın M. Serhat ÖZASLAN, Sayın Dr. Arş. Gör. Mine AKSOY, Sayın Dr. Parham TASLİMİ, Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTACI, ve Sayın Dr. Nurdan BALTACI başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Genetik Araştırma Laboratuvarında bulunan bütün arkadaşlarıma,

Benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem Sayın Firuzan DEMİR'e, babam Sayın Yener DEMİR'e kardeşim Sayın Oğuzhan DEMİR'e ve değerli arkadaşım Sayın Emine SOYDAş'a,

Ayrıca doktora eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) teşekkür ederim.

Yeliz DEMİR

Mayıs, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Aldehit Oluşumu ve Metabolizması.....	1
1.2. ALDH ailesi	2
1.2.1. ALDH1A1	9
1.2.2. ALDH1A3	10
1.2.3. ALDH2.....	11
1.3. ALDH ve OKSİDATİF STRES	12
1.3.1 Alkol toksisitesi.....	12
1.3.2. UV radyasyon.....	15
1.3.3. Kanser hücreleri	17
1.4. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi	19
1.5. Antibiyotikler	22
1.6. İnsan ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Antibiyotiklerin Sınıfları ve Özellikleri	23
1.6.1. Kinolonlar.....	23
1.6.2. Penisilin	26
1.6.3. Sefalosporinler.....	29
1.6.4. Aminoglikozitler	32
1.6.5. Linkozamidler	36
1.6.6. Antistafilokokal	37
2. KAYNAK ÖZETLERİ	41
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
3.1. Sarf edilen kimyasal maddeler	48

3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	49
3.3. DeneYlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	51
3.3.1. Besiyeri ve agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler	51
3.3.2. Doğal şartlar altında saflaştırmada kullanılan çözeltiler	52
3.3.3 hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimlerinin aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler.....	53
3.3.4. hALDH2 enziminin aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler.....	53
3.3.5. SDS-PAGE ve Western blot işleminde kullanılan çözeltiler	54
3.3.6. Jelin Coomassie Brilliant Blue (CBB) ile boyanması işleminde kullanılan çözeltiler.....	55
3.3.7. Jelin gümüş boyama yöntemi ile boyanmasında kullanılan çözeltiler	56
3.4. Moleküler Biyolojik Metotlar	56
3.4.1. Primerlerin hazırlanması	56
3.4.2. ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 genlerine ait cDNA sekansının çoğaltılması polimeraz zincir reaksiyonları (PCR).....	57
3.4.3. DNA agaroz jel elektroforezi	59
3.4.4. Rekombinant vektörün elde edilmesi	59
3.4.5. Rekombinant vektörün kompetent hücelere transformasyonu.....	60
3.4.6. Koloni PCR	60
3.4.7. Plazmid izolasyonu.....	62
3.4.8. Çapraz Kontrol PCR Reaksiyonu.....	63
3.4.9. Pozitif sonuç veren bakterilerin gliserolde stoklanması.....	64
3.4.10. Rekombinant plazmidin konağa transformasyonu	65
3.4.11. Pilot (Deneme) ekspresyon	65
3.4.12. Pilot ekspresyon sonrası hücelerin parçalanması.....	66
3.4.13. Western blot analizi.....	66
3.5. Biyokimsyal Metotlar	68
3.5.1. Bakteri hücre lizatının hazırlanması.....	68
3.5.2. Doğal şartlar altında kolondan rekombinant proteinlerin saflaştırılması	68
3.5.2.1. ProBond™ kolonun hazırlanması	68
3.5.2.2 Ni-NTA afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	70
3.5.3. Kantitatif Protein Tayini.....	70

3.5.4. ALDH1A1 ve ALDH1A3 enzimlerinin dehidrogenaz aktivitesi ölçümü.....	71
3.5.5. ALDH2 enziminin esteraz aktivitesi Ölçümü	72
3.5.6. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin saflığının kontrolü	73
3.5.7. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin molekül kütlelerinin tayini	74
3.6. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için karakterizasyon çalışmaları	76
3.6.1. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	76
3.6.2. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	76
3.6.3. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	76
3.7. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesi.....	77
3.8. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	77
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	79
4.1.1. İnternet Ortamından ALDH1A1 Genine Ait Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi	79
4.1.2. İnternet Ortamından ALDH1A3 Genine Ait Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi	80
4.1.3. İnternet Ortamından ALDH2 Genine Ait Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi	81
4.1.4. hALDH1A1 Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri	82
4.1.5. hALDH1A3 Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri	82
4.1.6. hALDH2 Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri	83
4.2. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Genlerine Ait Primerlerin Belirlenmesi	83

4.3. cDNA Kütüphanesinden hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Genlerinin PCR İle Çoğaltılması.....	84
4.4. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu.....	84
4.5. Koloni PCR	86
4.6. Plazmid İzolasyonu ve Çapraz PCR.....	86
4.7. IPTG Kullanılarak İstenilen Genin Pilot Ekspresyonu	88
4.8. Western blot analizi.....	89
4.9. Doğal Şartlar Altında Ni-NTA Afinite Kolonundan Proteinin Saflaştırılması ...	90
4.10. Diyaliz	92
4.11. SUMO-hALDH1A1, SUMO-hALDH1A3, ve SUMO-hALDH2 füzyon proteinlerinin SDS-PAGE ile mol kütlelerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	92
4.12. Jel filtrasyon kromatografisi ile hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin tabii molekül kütlesi tayini sonuçları.....	94
4.13. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	97
4.14. hALDH1A1, hALDH1A3 ve ALDH2 Enzimleri İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar	99
4.14.1. hALDH1A1 enzimi için Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar.....	100
4.14.1.a. NaH ₂ PO ₄ tamponu için optimum pH çalışması.....	100
4.14.1.b. Tris-HCl tamponu için optimum pH çalışması	100
4.14.1.c. Glisin/NaOH tamponu için optimum pH çalışması.....	101
4.14.2. hALDH1A3 enzimi için Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar.....	102
4.14.2.a. NaH ₂ PO ₄ tamponu için optimum pH çalışması.....	102
4.14.2.b. Tris-HCl tamponu için optimum pH çalışması	102
4.14.2.c. Glisin/NaOH tamponu için optimum pH çalışması.....	102
4.14.3. hALDH2 enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	103
4.14.3.a. NaH ₂ PO ₄ tamponu için optimum pH çalışması.....	103
4.14.3.b. Tris-HCl tamponu için optimum pH çalışması	104
4.15. Optimum İyonik Şiddetin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar.....	104
4.16. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	108

4.17. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Enzimleri Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	110
4.17.1. hALDH1A1, enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları.....	111
4.17.2. hALDH1A1, Enzimi Üzerine Bazı antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	127
4.17.3. hALDH2, enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları	142
4.18. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Enzimleri Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı antibiyotikler İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları	154
4.18.1. hALDH1A1, Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı antibiyotikler İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları	154
4.18.2. hALDH1A3, Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı antibiyotikler İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları.....	162
4.18.3. hALDH2, enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı antibiyotikler için K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları	170
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	179
KAYNAKLAR	197
ÖZGEÇMİŞ	208

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

4-HNE	4-hidroksi-2-nonenal
ALDH	Aldehit dehidrogenaz
bp	Baz çifti
BSA	Bovinel (sığır) serum albumin
cDNA	Komplamenter DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
E.C.	Enzim komisyon numarası
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.U.	Enzim Ünitesi
EtBr	Etidyum bromür
hALDH1A1	İnsan aldehit dehidrogenaz 1A1
hALDH1A3	İnsan aldehit dehidrogenaz 1A3
hALDH2	İnsan aldehit dehidrogenaz 2
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IPTC	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
kDa	Kilodalton
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	Enzimin aktif bölgesinin yarısının substratla dolduğu andaki substrat konsantrasyonu/ Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
LB	Luria-Bertani
LPO	Lipit peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
M _K	Molekül kütlesi
mRNA	Messenger (haberci) ribonükleik asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information- Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
Ni-NTA	Nikel-nitrilotriasetik asit

OD	Optik dansite
ORF	Open reading frame- Translasyona uğrayan gen bölgesi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Phosphate buffer salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PER	Amonyum persülfat
R _f	Proteinin yürüme mesafesinin boyanın yürüme mesafesine oranı
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Devir/dakika
RT	Revers transkriptaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametilendiamin
T _m	Ayrılma sıcaklığı
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Aldehitlerin metabolizması	2
Şekil 1.2. ALDH izoenzimlerinin moleküler yapısı	6
Şekil 1.3. Aldehit oksidasyon mekanizması	7
Şekil 1.4. Önerilen ester hidrolizi mekanizması	8
Şekil 1.5. ALDH'lerin alkolle indüklenen oksidatif stresi hafifletme mekanizmaları....	13
Şekil 1.6. ALDH izoenzimlerinin malondialdehit (MDA) metabolizmasındaki rolü	14
Şekil 1.7. pET SUMO vektör haritası.....	21
Şekil 1.8. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama kısmı.....	22
Şekil 1.9. Başlıca antimikrobiyal ajanların hedefleri.....	23
Şekil 1.10. Siprofloksasin molekülünün yapısal formülü.....	24
Şekil 1.11. Levofloksasin molekülünün yapısal formülü	25
Şekil 1.12. Moksifloksasin HCl molekülünün yapısal formülü.....	26
Şekil 1.13. Ofloksasin molekülünün yapısal formülü.....	26
Şekil 1.14. Piperasilin sodyum molekülünün yapısal formülü	27
Şekil 1.15. Amoksisilin molekülünün yapısal formülü	28
Şekil 1.16. Ampisilin sodyum molekülünün yapısal formülü	28
Şekil 1.17. Sefazolin sodyum molekülünün yapısal formülü	29
Şekil 1.18. Seftriakson sodyum molekülünün yapısal formülü	30
Şekil 1.19. Sefoperazon sodyum molekülünün yapısal formülü	31
Şekil 1.20. Sefuroksim sodyum molekülünün yapısal formülü.....	31
Şekil 1.21. Gentamisin sülfat molekülünün yapısal formülü.....	32
Şekil 1.22. Kanamisin sülfat molekülünün yapısal formülü.....	33
Şekil 1.23. Amikasin sülfat molekülünün yapısal formülü	34
Şekil 1.24. Tobramisin molekülünün yapısal formülü	35
Şekil 1.25. Netilmisin molekülünün yapısal formülü	35
Şekil 1.26. Klindamisin fosfat molekülünün yapısal formülü	36
Şekil 1.27. Linkomisin HCl molekülünün yapısal formülü.....	37
Şekil 1.28. Rifamisin sodyum molekülünün yapısal formülü	38
Şekil 1.29. Vankomisin HCl molekülünün yapısal formülü.....	39

Şekil 1.30. Teikoplanin molekülünün yapısal formülü.....	40
Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	84
Şekil 4.2. Farklı miktarlarda ekim yapılan besiyerlerinde oluşan koloniler (ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2)	85
Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen koloni PCR ürünleri.....	86
Şekil 4.4. Plazmit izolasyonu.....	87
Şekil 4.5. Çapraz PCR	87
Şekil 4.6. Belirli saat aralıklarında ekspresyon profili sergileyen hALDH1A1'in SDS-PAGE fotoğrafı.....	88
Şekil 4.7. Belirli saat aralıklarında ekspresyon profili sergileyen hALDH1A3'in SDS-PAGE fotoğrafı.....	89
Şekil 4.8. Belirli saat aralıklarında ekspresyon profili sergileyen hALDH2'in SDS- PAGE fotoğrafı	89
Şekil 4.9. hALDH1A1 ve hALDH1A3 Western blot sonucu.....	90
Şekil 4.10. hALDH2 Western blot sonucu	90
Şekil 4.11. Saflaştırılan SUMO-hALDH1A1 enziminin SDS- PAGE fotoğrafı	91
Şekil 4.12. Saflaştırılan SUMO-hALDH1A3 enziminin SDS- PAGE fotoğrafı.....	91
Şekil 4.13. Saflaştırılan SUMO-hALDH2 enziminin SDS- PAGE fotoğrafı.....	92
Şekil 4.14. Saflaştırılan hALDH1A1 enzimin $R_f/\log M_K$ grafiği	93
Şekil 4.15. Saflaştırılan hALDH1A3 enzimin $R_f/\log M_K$ grafiği	93
Şekil 4.16. Saflaştırılan hALDH2 enzimin $R_f/\log M_K$ grafiği	94
Şekil 4.17. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorbans değerleri	95
Şekil 4.18. Jel filtrasyon kolonundan alınan hALDH1A1 enziminin elüsyon grafiği....	95
Şekil 4.19. Jel filtrasyon kolonundan alınan hALDH1A3 enziminin elüsyon grafiği....	96
Şekil 4.20. Jel filtrasyon kolonundan alınan hALDH2 enziminin elüsyon grafiği.....	96
Şekil 4.21. Jel filtrasyon kromotografisi sonucu çizilen $K_{av}- \log M_K$ grafiği.....	97
Şekil 4.22. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.....	98
Şekil 4.23. 50 mM NaH_2PO_4 , Tris-HCl ve Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak hALDH1A1 enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiki	101

Şekil 4.24. 50 mM NaH ₂ PO ₄ , Tris-HCl ve Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak hALDH1A3 enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği	103
Şekil 4.25. 50 mM NaH ₂ PO ₄ ve Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak hALDH2 enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği	104
Şekil 4.26. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH=9,0) kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	105
Şekil 4.27. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH=9,0) kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	106
Şekil 4.28. Değişik konsantrasyonlardaki NaH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi (pH=8,0) kullanılarak hALDH2 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği	107
Şekil 4.29. hALDH1A1 enzimi için optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmasının sonucunda çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	108
Şekil 4.30. hALDH1A3 enzimi için optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmasının sonucunda çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	109
Şekil 4.31. hALDH2 enzimi için optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmasının sonucunda çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	110
Şekil 4.32. Siprofloksasin'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	111
Şekil 4.33. Levofloksasin'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	112
Şekil 4.34. Moksifloksasin HCl'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	113
Şekil 4.35. Piperasilin sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	114
Şekil 4.36. Amoksisilin'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	115
Şekil 4.37. Sefazolin sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	116
Şekil 4.38. Seftriakson sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	117
Şekil 4.39. Sefaperazon sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	118
Şekil 4.40. Sefuroksim sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	119
Şekil 4.41. Gentamisin sülfat'ın hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	120
Şekil 4.42. Amikasin sülfat'ın hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	121
Şekil 4.43. Klindamisin fosfat'ın hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi	122

Şekil 4.44. Linkomisin HCl'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	123
Şekil 4.45. Rifamisin sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	124
Şekil 4.46. Vankomisin HCl'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	125
Şekil 4.47. Teikoplanin'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	126
Şekil 4.48. Siprofloksasin'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	127
Şekil 4.49. Levofloksasin'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	128
Şekil 4.50. Moksifloksasin HCl'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	129
Şekil 4.51. Piperasilin sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	130
Şekil 4.52. Sefazolin sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	131
Şekil 4.53. Seftriakson sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	132
Şekil 4.54. Sefaperazon sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	133
Şekil 4.55. Sefuroksim sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	134
Şekil 4.56. Gentamisin sülfat'ın hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	135
Şekil 4.57. Amikasin sülfat'ın hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	136
Şekil 4.58. Klindamisin fosfat'ın hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	137
Şekil 4.59. Linkomisin HCl'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	138
Şekil 4.60. Rifamisin sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	139
Şekil 4.61. Vankomisin HCl'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	140
Şekil 4.62. Teikoplanin'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	141
Şekil 4.63. Siprofloksasin'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	142
Şekil 4.64. Levofloksasin'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi	143
Şekil 4.65. Moksifloksasin HCl'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi	144
Şekil 4.66. Piperasilin sodyum'ın hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi	145
Şekil 4.67. Sefazolin sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi	146
Şekil 4.68. Seftriakson sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi	147
Şekil 4.69. Sefaperazon sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	148
Şekil 4.70. Sefuroksim sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	149
Şekil 4.71. Gentamisin sülfat'ın hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	150
Şekil 4.72. Amikasin sülfat'ın hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi	151
Şekil 4.73. Klindamisin fosfat'ın hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi	152
Şekil 4.74. Linkomisin HCl'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	153

Şekil 4.75. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	154
Şekil 4.76. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	155
Şekil 4.77. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	155
Şekil 4.78. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	156
Şekil 4.79. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine amoksisilin'in etkisinin Lineweaver- Burk grafiği	156
Şekil 4.80. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	157
Şekil 4.81. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	157
Şekil 4.82. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	158
Şekil 4.83. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	158
Şekil 4.84. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	159
Şekil 4.85. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	159
Şekil 4.86. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	160
Şekil 4.87. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	160
Şekil 4.88. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine rifamisin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	161
Şekil 4.89. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	161
Şekil 4.90. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisinin Lineweaver- Burk grafiği	162

Şekil 4.91. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	162
Şekil 4.92. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	163
Şekil 4.93. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	163
Şekil 4.94. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	164
Şekil 4.95. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	164
Şekil 4.96. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	165
Şekil 4.97. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	165
Şekil 4.98. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	166
Şekil 4.99. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	166
Şekil 4.100. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	167
Şekil 4.101. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	167
Şekil 4.102. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	168
Şekil 4.103. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine rifamisin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	168
Şekil 4.104. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	169
Şekil 4.105. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	169
Şekil 4.106. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	170

Şekil 4.107. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	170
Şekil 4.108. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	171
Şekil 4.109. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	171
Şekil 4.110. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	172
Şekil 4.111. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	172
Şekil 4.112. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	173
Şekil 4.113. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	173
Şekil 4.114. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	174
Şekil 4.115. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	174
Şekil 4.116. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	175
Şekil 4.117. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği.....	175

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnsan ALDH proteinleri.....	4
Çizelge 1.2. Kanserle ilişkili olduğu kabul edilen ALDH izoenzimleri.....	18
Çizelge 3.1. Çalışmada sarf edilen kimyasallar ve markaları.....	48
Çizelge 3.2. ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 genlerine ait PCR karışımı.....	58
Çizelge 3.3. ALDH1A1 geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları.....	58
Çizelge 3.4. ALDH1A3 geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları.....	58
Çizelge 3.5. ALDH2 geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları.....	59
Çizelge 3.6. Ligasyon işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	60
Çizelge 3.7. Koloni PCR reaksiyon karışımı.....	61
Çizelge 3.8. hALDH1A1 için koloni PCR reaksiyon şartları.....	61
Çizelge 3.9. hALDH1A3 için koloni PCR reaksiyon şartları.....	62
Çizelge 3.10. hALDH2 için koloni PCR reaksiyon şartları.....	62
Çizelge 3.11. SUMO vektörüne ait primer bilgileri.....	63
Çizelge 3.12. ALDH1A1 için plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları.....	64
Çizelge 3.13. ALDH1A3 için plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları.....	64
Çizelge 3.14. ALDH2 için plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları.....	64
Çizelge 3.15. SDS jel Elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri.....	67
Çizelge 3.16. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri.....	67
Çizelge 3.17. ALDH1A1 ve ALDH1A3 enzimlerinin aktivite ölçümü için gerekli çözeltiler.....	72
Çizelge 3.18. ALDH2 enziminin aktivite ölçümü için gerekli çözeltiler.....	73
Çizelge 4.1. hALDH1A1 genine ait primer bilgileri.....	83
Çizelge 4.2. hALDH1A3 genine ait primer bilgileri.....	83
Çizelge 4.3. hALDH2 genine ait primer bilgileri.....	84
Çizelge 4.4. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin jel filtrasyon sonucu molekül kütleleri.....	97
Çizelge 4.5. SUMO-hALDH1A1 füzyon proteinin Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları.....	98

Çizelge 4.6. SUMO-hALDH1A3 füzyon proteinin Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları	98
Çizelge 4.7. SUMO-hALDH2 füzyon proteinin Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları	99
Çizelge 4.8. 50 mM NaH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	100
Çizelge 4.9. 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	100
Çizelge 4.10. 50 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	101
Çizelge 4.11. 50 mM NaH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	102
Çizelge 4.12. 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	102
Çizelge 4.13. 50 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	102
Çizelge 4.14. 50 mM NaH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak hALDH2 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	103
Çizelge 4.15. 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hALDH2 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	104
Çizelge 4.16. hALDH1A1 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	105
Çizelge 4.17. hALDH1A3 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	106
Çizelge 4.18. hALDH2 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için NaH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	107
Çizelge 4.19. hALDH1A1 enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları.....	108

Çizelge 4.20. hALDH1A3 enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları.....	109
Çizelge 4.21. hALDH2 enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları.....	110
Çizelge 4.22. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisi.....	111
Çizelge 4.23. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisi.....	112
Çizelge 4.24. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi	113
Çizelge 4.25. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi	114
Çizelge 4.26. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine amoksisilin'in etkisi.....	115
Çizelge 4.27. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi.....	116
Çizelge 4.28. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisi.....	117
Çizelge 4.29. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisi	118
Çizelge 4.30. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi.....	119
Çizelge 4.31. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisi.....	120
Çizelge 4.32. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi.....	121
Çizelge 4.33. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisi	122
Çizelge 4.34. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi	123
Çizelge 4.35. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyum'un etkisi	124
Çizelge 4.36. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisi.....	125
Çizelge 4.37. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisi	126
Çizelge 4.38. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisi.....	127
Çizelge 4.39. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisi.....	128
Çizelge 4.40. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi	129
Çizelge 4.41. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisi	130
Çizelge 4.42. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi.....	131
Çizelge 4.43. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisi.....	132
Çizelge 4.44. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisi	133
Çizelge 4.45. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi.....	134
Çizelge 4.46. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisi.....	135
Çizelge 4.47. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi.....	136
Çizelge 4.48. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisi	137
Çizelge 4.49. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi	138

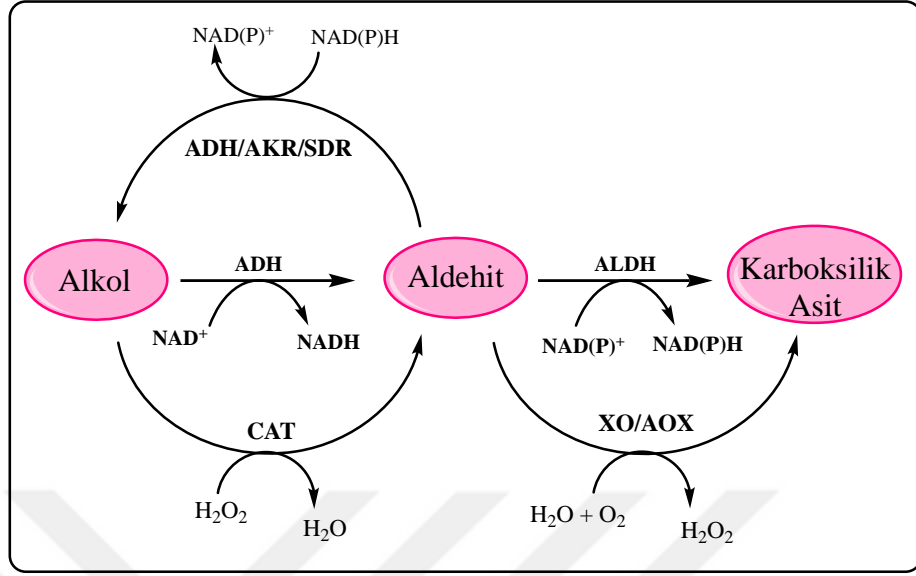
Çizelge 4.50. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyum'un etkisi.....	139
Çizelge 4.51. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisi.....	140
Çizelge 4.52. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisi.....	141
Çizelge 4.53. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisi	142
Çizelge 4.54. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisi.....	143
Çizelge 4.55. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi.....	144
Çizelge 4.56. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisi	145
Çizelge 4.57. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi.....	146
Çizelge 4.58. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisi.....	147
Çizelge 4.59. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisi	148
Çizelge 4.60. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi.....	149
Çizelge 4.61. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisi	150
Çizelge 4.62. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi.....	151
Çizelge 4.63. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisi.....	152
Çizelge 4.64. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi	153
Çizelge 5.1. hALDH1A1 enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili toplu sonuçlar	194
Çizelge 5.2. hALDH1A3 enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili toplu sonuçlar	195
Çizelge 5.3. hALDH2 enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili toplu sonuçlar	196

1. GİRİŞ

1.1. Aldehit Oluşumu ve Metabolizması

Aldehitler; aminoasit, nörotransmitter, karbohidrat ve lipitler gibi endojen bileşiklerin biyotransformasyonunu içeren çok çeşitli endojen ve ekzojen öncüllerden oluşmaktadır. 4-Hidroksi-2-nonenal (4-HNE) ve malondialdehitide (MDA) içeren 200'den fazla aldehit türü, lipit peroksidasyonu olarak bilinen (LPO) hücre membran lipitlerinin degradasyonundan meydana gelmektedir (Esterbauer *et al.* 1991). Aminoasit katabolizmasında, glutamat γ -semialdehiti içeren bazı aldehit ara ürünleri oluşur. Gama-aminobütirik asit (GABA), serotonin, noradrenalin, adrenalin ve dopamin gibi nörotransmitterlerde aldehit metabolitlerinin oluşmasına neden olur (Marchitti *et al.* 2007). Ksenobiyotik ve ilaçlar aldehit oluşturur. Antikanser ilaçlar olan siklofosfamid ve ifosfamid, akrolein gibi önemli aldehit öncülünü meydana getirmektedir. Formaldehit, asetaldehit ve akrolein gibi çeşitli aldehitler çevrede her yerde mevcuttur. Aldehitler ayrıca çeşitli resinlerin ve poliester plastiklerin endüstriyel uygulamalarda kullanılıp ya da üretilmesini sağlamaktadır (Vasiliou *et al.* 2004).

Bazı aldehitler görme, embriyonik gelişim, nörotransmisyon gibi normal fizyolojik proseslerde önemli rol oynamasına rağmen, çoğu toksik ve karsinojeniktir (Yokohama *et al.* 2001). Aldehitler terminal karboksil gruplarına sahip güçlü elektrofilik bileşiklerdir. Karboksil grupları onları güçlü reaktif yapar ve 4-HNE ve akrolein gibi α , β – doymamış aldehitler β karbonunda ikinci bir elektrofil daha içerir. Serbest radikallerin aksine, aldehitler uzun ömürlüdür ve yalnızca hücre bileşenlerini değil onların yolaklarını da etkilerler (Esterbauer *et al.* 1991). Aldehitlerin toksik olmasının altında yatan mekanizma; DNA hasarı, hücre ölümü, protein metabolizması, enzim inaktivasyonu gibi yolakları hedef almasıdır (Brooks and Theruvathu 2005).



Şekil 1.1. Aldehitlerin metabolizması (Marchitti *et al.* 2008).

*ADH: Alkol dehidrogenaz; AKR: Aldo-Keto redüktaz; ALDH: Aldehit dehidrogenaz; AOX: Aldehit oksidaz; CAT: Katalaz; SDR: Kısa zincirli dehidrogenaz/redüktaz; XO: Ksantin oksidaz

1.2. ALDH ailesi

İnsan ALDH ailesi, farklı kromozomal lokalizasyona sahip 19 tane olduğu varsayılan fonksiyonel genlerden oluşmaktadır (Vasiliou and Nebert 2005). ALDH enzimleri NAD(P)^+ bağımlı geri dönüşümsüz oksidasyon reaksiyonlarını katalizlerler (Şekil 1.1). ALDH proteinleri; sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum, çekirdek gibi çeşitli lokalizasyonlarda bulunmaktadırlar. ALDH enzimlerinin çoğu çeşitli doku dağılımına sahiptir ve farklı substrat spesifikliği sergiler (Sladek 2003; Vasiliou *et al.* 2004). Genellikle detoksifikasyon enzimi olarak adlandırılırlar. ALDH'lar, aldehitleri karboksilik asite oksitleyerek, aldehitlerin etkisinden hücreyi koruyarak hizmet ederler. Yapılan çalışmalar ALDH enzimlerinin aldehit sitotoksitesine karşı hücreleri koruduğunu göstermiştir (Pappa *et al.* 2005). Bunun yanı sıra yapılan çoğu çalışmada ise ALDH genleri üzerindeki polimorfizm ve mutasyonların Sjögren-Larsson sendromu (SLS), Tip 2 diyabet, kanser, Alzheimer gibi hastalıklarla ilişkili olduğu bulunmuştur (Kamino *et al.* 2000; Yokoyama *et al.* 2001; Onenli-Mungan *et al.* 2004; Rizzo and Carney 2005). ALDH genlerindeki mutasyonlar ve polimorfizme ek olarak transgenik knockout farelerde yapılan çalışmalar embriyonik gelişme dönemi gibi fizyolojik

fonksiyon ve proseslerde ALDH enzimlerinin önemli rolünü ortaya koymuştur (Dupe *et al.* 2003).

ALDH enzimleri aldehit detoksifikasyonu dışında çok yönlü katalitik ve non-katalitik fonksiyonlara da sahiptir (Çizelge 1.1). Ayrıca bazı ALDH enzimleri ester hidrolizini katalizlediği de bilinmektedir (Sydow *et al.* 2004). Çeşitli endojenik (androjen, kolesterol ve tiroid hormon) ve egzogenik (Asetaminofen) bileşiklere bağlanabilme özelliği gösterirler (Vasiliou *et al.* 2004). Ek olarak ALDH enzimleri; NAD(P)H üretimi, sistein ve metiyonin sülfhidril grupları vasıtasıyla hidroksil radikallerinin uzaklaştırılmasını ve UV ışığının absorpsiyonunu içeren önemli antioksidan rollere sahiptir (Pappa *et al.* 2003; Lassen *et al.* 2006, 2007; Estey *et al.* 2007).

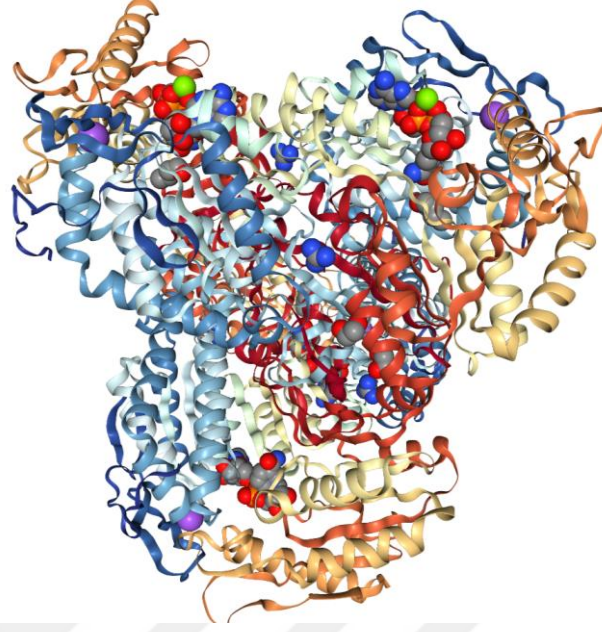
Çizelge 1.1. İnsan ALDH proteinleri

ALDH	Lokalizasyon	Seçtiği aldehit substratı	Fonksiyonu ve karakteristik özellikleri
ALDH1A1	Sitozol	Retinal	Ester hidrolizi; kolesterol, tiroide bağlanma, DOPAL, asetaldehit oksidasyonu
ALDH1A2	Sitozol	Retinal	Lipit peroksidasyonu türevli aldehitlere yüksek afinite
ALDH1A3	Sitozol	Retinal	Lipit peroksidasyonu türevli aldehitlere yüksek afinite
ALDH1B1	Mitokondri	Asetaldehit	Korneayı UV ışığından koruma
ALDH1L1	Sitozol	10-Formiltetrahidrofolat	Asetaminofen'e bağlanma
ALDH1L2	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Anti-inflamatuvar ajanlarını indükleme
ALDH2	Mitokondri	Asetaldehit	Ester hidrolizi; Asetaminofen'e bağlanma; DOPAL ve DOPEGAL oksidasyonu
ALDH3A1	Sitozol, Çekirdek	Aromatik, alifatik aldehitler	Ester hidrolizi; ROS uzaklaştırıcı, UV ışınlarından koruyucu
ALDH3A2	Mikrozom	Yağ aldehitleri	İnsülinin gen ekspresyonunun düzenlenmesi
ALDH3B1	Sitozol	Bilinmiyor	Lipit peroksidasyonu türevli aldehitlerin oksidasyonu
ALDH3B2	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor

Çizelge 1.1 devamı

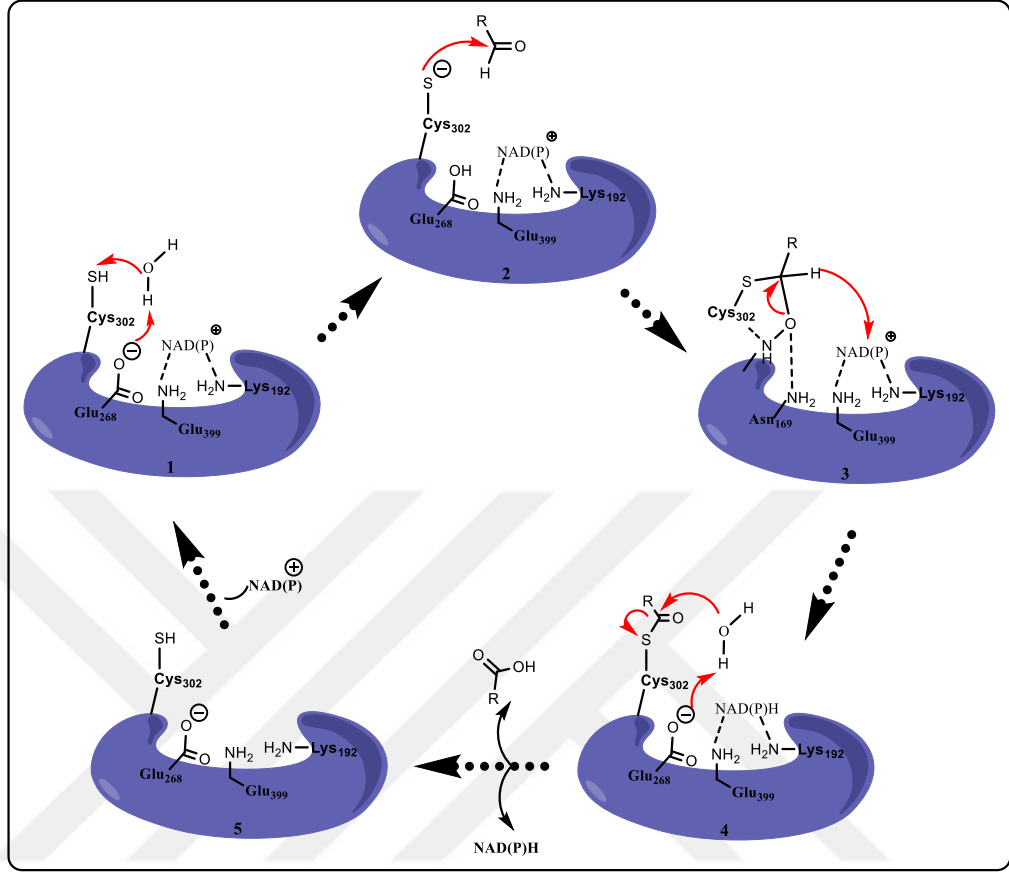
ALDH	Lokalizasyon	Seçtiği aldehit substratı	Fonksiyonu ve karakteristik özellikleri
ALDH4A1	Mitokondri	Glutamat γ -semialdehit	Ester hidrolizi; oksidatif stresi önleme
ALDH5A1	Mitokondri	Süksinat semialdehit	Nörotransmisyonda etkili olma
ALDH6A1	Mitokondri	Malonat semialdehit	Esteraz aktivitesi
ALDH7A1	Sitozol, Çekirdek Mitokondri	α -Aminodipik semialdehit	Hücre siklusünde protein regülasyonu
ALDH8A1	Sitozol	Retinal	Lipit peroksidasyonu türevli aldehitlerin ve asetaldehitin oksidasyonu
ALDH9A1	Sitozol,	γ -Aminobütılaldehit	Betain, asetaldehit ve DOPAL'in oksidasyonu, karnitin biyosentezi
ALDH16A1	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
ALDH18A1	Mitokondri	Glutamik γ -semialdehit	Bilinmiyor

ALDH enzimlerinde kataliz ve kofaktör bağlanması için gerekli olan rezidülerinin çoğu ortaktır (Steinmetz *et al.* 1997; Liu *et al.* 1997). Katalitik sistein Cys-302, Glu-268, Gly-299 ve Asn-169 kataliz için gereklidir. Gly-245 ve Gly-250 kofaktör bağlanması için gerekli rezidülerdir. Ek olarak, Lys-192, Glu-399 ve Phe-401 kofaktör bağlanması ve katalizin ilerlemesi için gerekli olduğuna inanılmaktadır. Memeli ALDH enzimlerinin kristal yapıları enzimin üç domainden oluştuğunu ortaya koymaktadır. Bunlar NAD(P)⁺ kofaktör bağlama bölgesi, katalitik bölge, bir de köprü bölgesidir (Steinmetz *et al.* 1997; Liu *et al.* 1997).



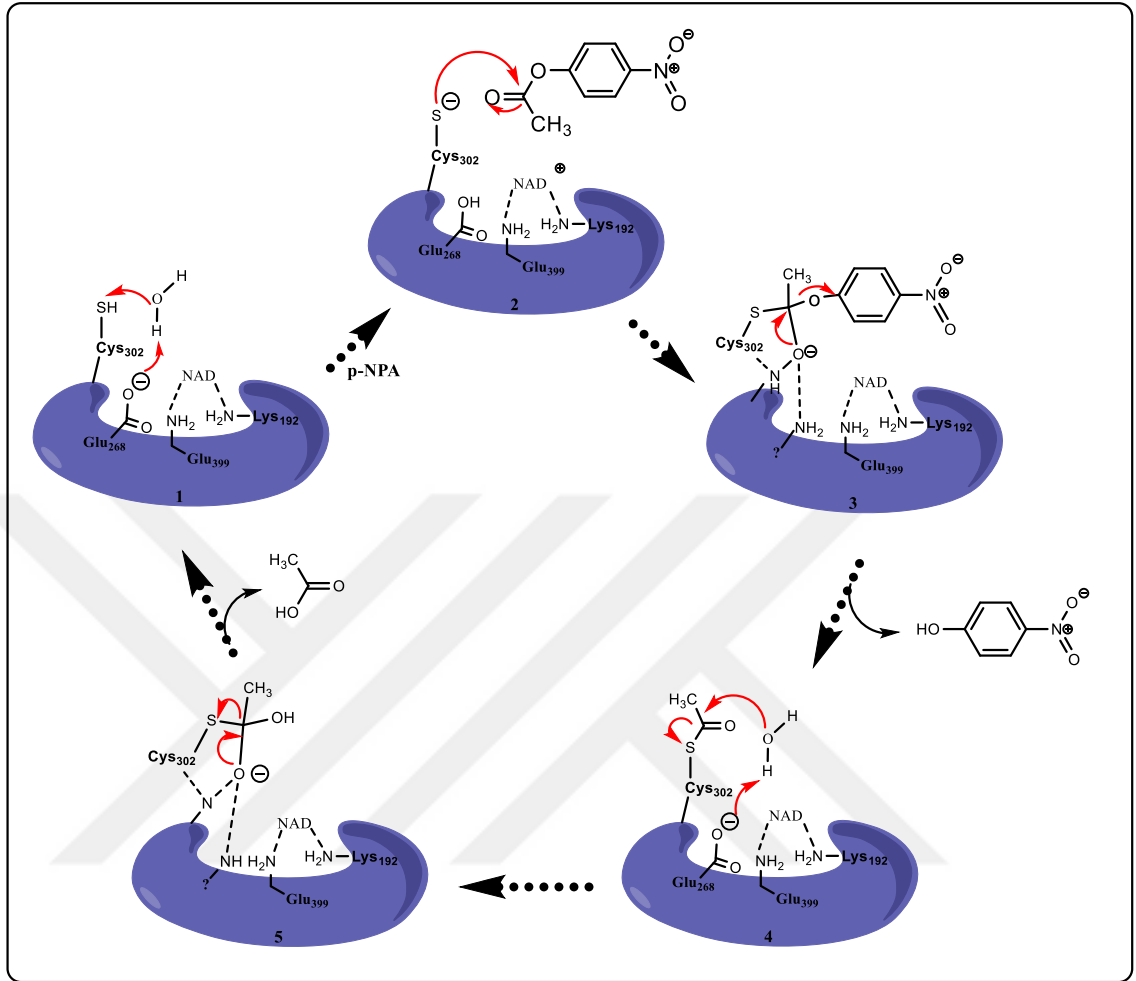
Şekil 1.2. ALDH izoenzimlerinin moleküler yapısı

ALDH enzimlerinin kristal yapılarına dayanarak, kofaktörün bağlanması nükleofil Cys-302'nin Gly-299 tarafından pozitif yüklenerek katalitik aktivasyonu sağlayıp konformasyonel değişime neden olmaktadır (Liu *et al.* 1997). Sonrasında Cys-302 substratın aldehit kısmına atak yaparak oksianyon tiyohemiasetal formunu oluşturur ve Asn-169 tarafından stabilize edilir (Steinmetz *et al.* 1997). Oksianyon formundaki negatif yüklü oksijen kofaktöre hidrit transferini gerçekleştirir ve tiyoaçilenzim formunu oluşturur. Tiyoaçilenzimin hidrolizi ve karboksilik asit salınımı, hidrit transferi sonrası su tarafından aktifleştirilen ve baz gibi davranan Glu-268 vasıtasıyla meydana gelir.



Şekil 1.3. Aldehit oksidasyon mekanizması

1-Düzenli su molekülleri tarafından katalitik Cys302'nin aktivasyonu sağlanır ve Glu268'den proton çıkarır. 2- katalitik Cys302'nin tiyoloat grubu tarafından aldehitin karbonil karbonu üzerine nükleofilik atak yapar. 3-Tetrahedral tiyohemiasetal yapının oluşumu ve bu yapıdan NAD⁺'nin piridin halkasına hidrit transferi gerçekleşir. 4-Tiyoeester yapının hidrolizi meydana gelir. 5- NAD⁺ bağlanarak enzimin rejenarasyonu ve kofaktör indirgenmesi olur.



Şekil 1.4. Önerilen ester hidrolizi mekanizması

1-Katalitik bölgedeki bir rezidüden (Glu268) hidrojen çıkarılarak katalitik sistein rezidüsü aktive edilir. 2-Tiyolat iyonları p-nitrofenilasetat substratına saldırarak oksianyon formuna öncülük eder. 3-Ara maddeler yeniden düzenlenir ve nitrofenil grupları ayrılır. 4-Glu268 rezidüsü yakınındaki düzenli su moleküllerinden hidrojen çıkarır, onu nükleofil yaparak tiyoaçil enzim kompleksindeki karbonil gruplarına saldırır. 5-Asetik asit ve enzim salınımı için tetrahedral ara ürünlerinin yeniden oluşumu gerçekleşir.

1.2.1. ALDH1A1

ALDH1A1 yetişkinlerde testis, beyin, göz lensi, karaciğer, böbrek, akciğer, retina gibi çeşitli dokularda bulunan homotetramer bir enzimdir (Zhai *et al.* 2001) ALDH1A1, ALDH enzim ailesi içinde yüksek oranda sitozolde bulunan üç enzimden biridir (diğerleri ALDH1A2 ve ALDH1A3) ve retinol metabolizmasında retinalin (retinaldehit) retinoik aside oksidasyonunu katalizler. ALDH1A1 oksidasyon reaksiyonunda hem all-trans retinal hem de 9-cis retinal için yüksek afiniteye sahiptir (Marchitti *et al.* 2008).

Retinoik asit, nükleer retinoik asit reseptörleri için bir ligant olarak görev yapıp gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Onun sentezi normal büyüme, farklılaşma, gelişme ve omurgalı hayvanlarda epitel gelişiminde önemlidir (Ross *et al.* 2000). Retinoid bağlı dokularda (özellikle retina) retinali oksitleyen ALDH'lar farklı ekspresyon özellikleri sergiler. Retinoik asit oluşumu embriyonik dönem için gereklidir. Retinoik asit sentezinde ALDH1A1'in *in vivo* rolüne kanıt olarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Aldh1a1^{-/-}* farelerde canlı ve normal retina morfolojisine sahipken *Aldh1a1^{-/-}* olan farelerin karaciğerinde retinoik asit sentezi azalış sergilediğini ve retinol tedavisinden sonra serumda retinal seviyesinin arttığı bulunmuştur (Fan *et al.* 2003). Hepatosit kültüründe, ALDH1A1'in baskılanması hem reaktif oksijen türlerinin üretimi hem de serbest yağ asitlerinin omega oksidasyonunu azalttığı görülmüştür (Li *et al.* 2007).

İnsan beyninde ALDH1A1 dopaminerjik nöronlarda yüksek oranda eksprese olmaktadır ve bu nöronların farklılaşması ve gelişmesi için retinoik asite ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Bu nöronlarda, ALDH1A1 bir homeodomain transkripsiyon faktörü olan ve dopaminerjik nöronların regülasyonunu sağlayan Pitx3'ün kontrolü altındadır (Chung *et al.* 2005). Nöronlardaki ALDH1A1'in seviyesinin azalması Parkinson hastalığı ve şizofreni ile sonuçlanmaktadır (Galter *et al.* 2003). Merkezi sinir sisteminde monoamin oksidaz dopamini onun aldehit metabolitlerine, 3,4-dihidroksifenilasetaldehit (DOPAL)'e metabolize eder. Artan kanıtlar, DOPAL'in nörotoksit olabileceğini ve onun birikiminin hücre ölümleriyle bağlantılı olabileceğini öne sürmektedir. Bu sebeple, ALDH1A1, DOPAL'i 3,4-dihidroksifenilasetikasite katalizleyerek

nöronlardaki seviyesini düşürme işlemini gerçekleştiren önemli bir role sahiptir (Marchitti *et al.* 2007).

ALDH1A1, oksidatif strese karşı hücreyi korumada da anahtar bir rol üstlenmektedir. İnsan ALDH1A1 enzimi, 4-HNE, hegzanal ve MDA'yı içeren lipid peroksidasyonu türevi olan aldehitleri etkili bir şekilde oksitler. Çeşitli *Aldh1a1*^{-/-} fare modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda ALDH1A1'in fare lens ve korneasını lipid peroksidasyonu türevi olan aldehitleri detoksifiye ederek koruduğu, ve yaşlanma ile UV radyasyonunu içeren oksidatif strese bağlı durumlarda katarakt oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Lassen *et al.* 2007).

Aldehit metabolizması dışında esteraz aktiviteside göstermektedir ve potansiyel glikasyon ajanı olan 3-deoksiglukosom oksidasyonunu katalizlemektedir (Collard *et al.* 2007). Ayrıca, ALDH1A1 tiroid hormonuna bağlanarak ve östrojenler tarafından indüklenir. Hormon sinyallerinin düzenlenmesinde görev alır (Deng *et al.* 2003).

1.2.2. ALDH1A3

İnsan ALDH1A3, kromozom 15'te bulunur (15q26.3). 16 ekzon içerir ve 2 transkript üretir. Kodlanan protein 512 amino asit kalıntısı içerir. Sitoplazmada, çekirdekte ve mitokondride lokalize olmuştur (Gil-Ibanez *et al.* 2014). ALDH1A3, retinoik asit'in (RA) biyolojik sentezine katılmanın yanı sıra, glikoliz/glukogenesis, aminoasit metabolizması, lipid peroksidasyonu, sitokrom P450 yoluyla eksojen kimyasal maddelerin uzaklaştırılması gibi metabolik ve fizyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. ALDH1A3 normal dokularda yaygın olarak bulunur. Bu protein, retina, tükrük bezi ve midede yüksek oranda eksprese olmaktadır (Graham *et al.* 2006).

ALDH1A3 çeşitli kanser tiplerinde özellikle, pankreas kanseri ve yumurtalık kanserinde anormal derecede eksprese olmaktadır (Saw *et al.* 2012; Kong *et al.* 2016). Tümörlerde ALDH1A3'ün anormal ifadesi; tümör süpresör geni ve onkogen, promoter metilasyon, androjen reseptörü, transkripsiyon 3 (STAT3) sinyal transdüktörü/aktivasyonu,

hepatosit büyüme faktörü (HGF) / c-MET yolaklarını ve spesifik mikroRNA'ları içeren çeşitli mekanizmalarla regüle edilir (Duan *et al.* 2016). Birçok araştırmacı, ALDH1A3 promotör metilasyonunun, bu tümörlerin erken teşhisi için bir gösterge olarak kullanılabileceğini önermektedir (Shames *et al.* 2006; Shao *et al.* 2014).

1.2.3. ALDH2

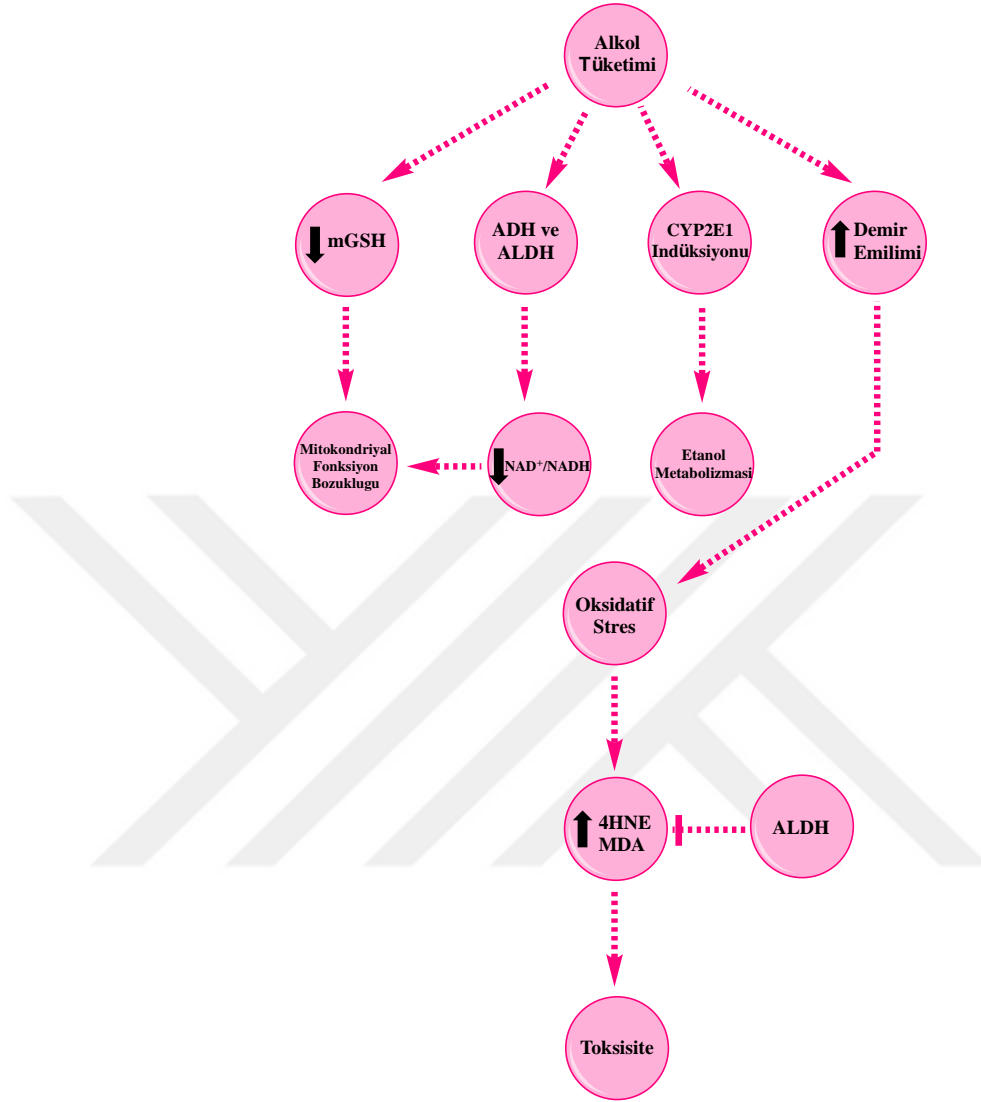
ALDH2 mitokondri matriksinde kodlanmış bir proteindir. Karaciğer, böbrek, kalp, akciğer ve beyin dokularında eksprese olmaktadır (Goedde and Agarwal 1990). ALDH2 etanol metabolizması sırasında asetaldehitin oksidasyonunu sağlayan önemli bir enzimdir. Bu zamana kadar, bazı mutant ALDH2 alelleri tanımlanmıştır. Bunların içinde en çok çalışılan ALDH2*2 allelidir (tek baz mutasyonu G/C---A/T) ve bu değişim ALDH2'nin inaktivasyonunu sağlayarak aktif bölgedeki sistein rezidüsünün nükleofilik özelliğinin azalmasına neden olur. Bunun sonucunda NAD⁺'ya bağlanma afinitesi azalır (Farres *et al.* 1994). Glu-487 köprü bölgesinde lokalize olmuştur ve Arg-264 ile Arg-475 ile etkileşime girerek kofaktör bağlanma bölgesiyle katalitik bölge arasında yapı stabilitesi oluşturur (Larson *et al.* 2007). ALDH2 homotetramerik özellik gösterir, yalnız mutant ALDH2*2 alleli dominant olduğunda ALDH2 proteinleri heterotetramerik özellik gösterir ve alt birimler enzimatik açıdan inaktif olur (Chao *et al.* 1993). Asya kökenli bireylerin yaklaşık %40-50'sinde ALDH2*2 alleli bulunmaktadır ve alkol kullandıklarında asetaldehit birikimi nedeniyle alkol-indüklenmiş toksisite meydana gelmektedir (Peng *et al.* 2007).

ALDH2 nitrat redüktaz gibi davranmaktadır, bu enzim kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan nitrogliserinin aktivasyonu için gereklidir ve Çinli hastalarda ALDH2*2 alleli nitrogliserin eksikliği ile ilişkilendirilmektedir (Li *et al.* 2006). ALDH2'nin asıl rolünün 4-HNE ve MDA gibi lipid peroksidasyonu türevi aldehitlerin metabolizması olduğuna inanılmaktadır. Beyinde, ALDH2 enzim aktivitesi Alzheimer hastalarının serebral korteksinde yüksek oranda bulunmuştur. Bunun nedeni olarak; yüksek 4-HNE seviyesine karşı koruyucu bir mekanizma üstlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Picklo *et al.* 2001).

1.3. ALDH ve OKSİDATİF STRES

1.3.1 Alkol toksisitesi

Etanol, ağırlıklı olarak alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi tarafından asetaldehite okside edilir ve daha sonra ALDH2 ile asetik aside yükseltgenir. Alkol bağımlı oksidatif stres; alkolik karaciğer hastalığı, kardiyomiyopati ve gastrit gibi alkol ile ilişkili hastalıkların gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (Pan *et al.* 2008; Jing *et al.* 2012). Etanol vücuda girdikten sonra, hızlı bir şekilde metabolize olur. Hem ADH hem de ALDH tarafından gerekli bir kofaktör olan NAD^+ , indirgenmiş form olan NADH'a dönüştürülür. Bu işlem bir $NAD^+/NADH$ dengesizliğine neden olabilir (Şekil 1.5) Hem NAD^+ hem de NADH mitokondriyal fonksiyon açısından önem taşıdığından, alkolün fazla kullanımı bu fonksiyonun bozulmasına yol açmaktadır. Karaciğer ATP üretiminin etanol tarafından inhibisyonu bunu desteklemektedir (Cunningham *et al.* 1990).



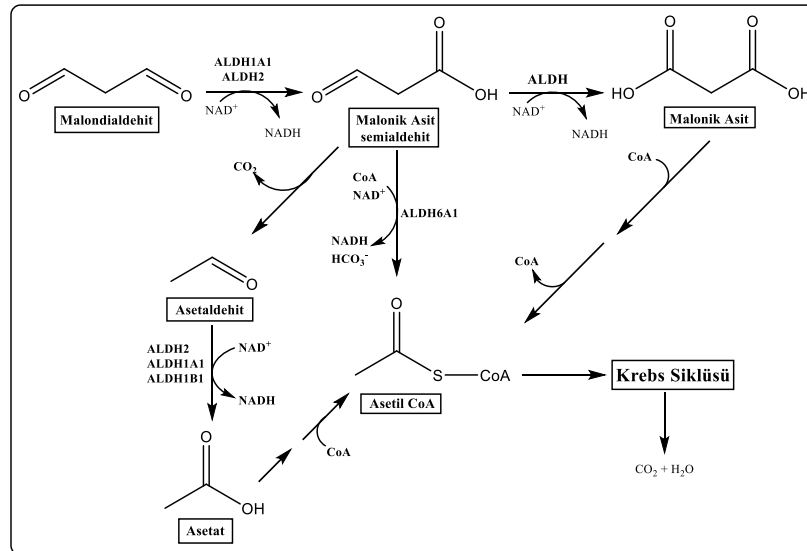
Şekil 1.5. ALDH'lerin alkolle indüklenen oksidatif stresi hafifletme mekanizmaları

*ALDH, aldehit dehidrogenaz; CYP2E1, sitokrom P450 2E1; mGSH, mitokondriyal glutatyon; 4HNE, 4-hidroksi-2-nonenal; MDA, malondialdehit; NAD⁺, nikotinamid adenin dinukleotit

Mitokondrinin ROS üretme kapasitesi göz önüne alındığında, bozulmuş mitokondriyal fonksiyonun ROS oluşumunu arttırdığı, çok çeşitli hücre ve doku hasarına katkıda bulunan oksidatif stresi oluşturduğu makuldür (Huang and Manton 2004). Mitokondriyal glutatyon, mitokondriyi sürekli ürettiği ROS'dan korur (Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa 2006). Alkolün kötüye kullanımıyla birlikte ortaya çıkan mekanizma açıklanamamasına rağmen mitokondriyal glutatyon düzeyinde down regülasyona neden olmaktadır (Zhao *et al.* 2002). Böyle bir down regülasyon ROS birikimine ve daha sonra da artmış oksidatif strese neden olur. Alkolden türetilen diğer bir önemli ROS

kaynağı ise, etanol alımı ile indüklenen sitokrom P450 2E1'in (CYP2E1) enzimatik aktivitesinin bir sonucudur (Şekil 1.5). Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve H_2O_2 gibi ROS, etanolün CYP2E1 ile indüklenen oksidasyonunun bir yan ürünü olarak üretilir (Lu and Cederbaum 2008). Ayrıca demir enzimatik olmayan Fenton reaksiyonu yoluyla en yüksek derecede reaktif ROS olan, hidroksil radikalini (OH^{\cdot}) üreterek oksidatif stresi artırabilir. Alkolün fazla kullanımı, demirin karaciğere alınmasına neden olur (Whitfield *et al.* 2001).

Oksidatif stres, LPO'yu başlatır ve proteinler ile DNA'nın kovalent modifikasyonunu tetikleyen 4-HNE gibi reaktif aldehytlerin oluşumunu sağlar. ALDH2 ve ALDH1A1, 4-HNE'nin detoksifikasyonunu, 4-hidroksinon-2-enoik aside dönüştürerek katalize eder (Ohta and Ohsawa 2006). Başka bir LPO ürünü olan MDA da diyabet ve alkolik karaciğer hasarı dahil çeşitli hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, ALDH'lerin MDA'yı oksitlediğini ve daha yüksek MDA seviyeleri inaktif ALDH2'ye sahip olan kişilerde ortaya çıktığını göstermektedir. Bu da bu enzimin MDA'nın uzaklaştırılmasına önemli katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Tseng *et al.* 2008).



Şekil 1.6. ALDH izoenzimlerinin malondialdehit (MDA) metabolizmasındaki rolü

1.3.2. UV radyasyon

Güneş ışığına yoğun maruz kalma ve yüksek oksijen gerilimi nedeniyle göz hücreleri sürekli olarak oksidatif stres altındadır. Güneş UV radyasyonu, UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) ve UVC'den (100-280 nm) oluşur. Gözdeki serbest radikal oluşumunun başlıca çevresel uyarıcısıdır. Dünyadaki atmosferin sağladığı üstün koruma nedeniyle UVC'ye maruz kalma minimuma indirilir. Çoğu UVB, kornea, çoğu UVA merceğ tarafından emilir. Özellikle UVB ile ilişkili olan bu göz dokuları UV ışını emilimiyle; singlet oksijen, süperoksit anyon, hidroksil ve peroksil radikalleri dahil olmak üzere fotokimyasal olarak üretilen ROS'a yol açarlar (Bergmanson and Soderberg 1995). Peroksil radikallerinin üretilmesi, 4-HNE ve MDA gibi 200'den fazla sitotoksik reaktif aldehit türünün üretimine yol açabilir. UV radyasyona maruz kalmanın, DNA zincirinde pirimidin ve timin dimer oluşumuna, DNA iplikçiklerinde iplik kırılmasına ve proteinlerin çapraz bağlanmasına neden olduğu belirtilmiştir (Cai *et al.* 1998). Bu UV radyasyona bağlı moleküler modifikasyonlar, katarakt oluşumu ve retinal dejenerasyonu gibi çeşitli göz patolojileri ile ilişkilendirilmiştir. Kornea ve lens redoks homeostazını korumak ve böyle yoğun bir oksidan yükü ile baş etmek için, oksidatif hasara karşı koruyucu özelliğe sahip metabolik enzimler ile küçük molekülleri içeren sağlam antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir.

ALDH süper ailesinin üyeleri, omurgalı ve omurgasız hayvanların korneasında ve lensinde kristalenler olarak tanımlanmıştır. ALDH3A1, korneanın gerekli şeffaflığı, refraktif ve koruyucu özelliklerini sağlayan kristalin olarak sınıflandırılan ilk enzim olmuştur (Verhagen *et al.* 1991). ALDH3A1 ve ALDH1A1'in, gözü UV radyasyona bağlı hasarlardan çok yönlü mekanizmalarla koruduğu düşünülmektedir. ALDH3A1 büyük bir UV radyasyon filtresi görevi görebilir. UV radyasyona bağlı modifikasyonlar, enzim inaktivasyonuna, kısmi açılmaya ve protein agregasyonuna neden olabilir. Bu modifikasyonlar katarakt oluşumu sırasında gözle görülür şekilde proteinlerin birikmesine katkıda bulunabilir (Bloemendal *et al.* 2004).

UV hasarının giderilme mekanizmalarından birinci olarak; ALDH3A1, UV radyasyonunu doğrudan absorbe ederek diğer korneal proteinleri korumak için işlev görebilir. Örneğin, rekombinant ALDH3A1, doğrudan UV ışınlarına maruz bırakılarak inaktif hale getirilir ve kovalent olarak çapraz bağlanırken, UV radyasyonunun neden olduğu G6PD'nin inaktivasyonunun azaltılması sağlar. Benzer şekilde, farelerin UV ışınlarına maruz kalmasıyla korneal ALDH3A1 ve ALDH1A1'in aktivitesinde %85'lik bir azalma gerçekleşirken diğer korneal enzimlerin aktiviteleri değişmeden kalmıştır (Estey *et al.* 2010). İkinci olarak, ALDH3A1 ve ALDH1A1, UV radyasyona bağlı lipid peroksidasyonu ile üretilen toksik aldehytleri metabolize eder. İnsan ALDH3A1, 4-HNE için yüksek afiniteye sahipken, ALDH1A1 hem 4-HNE'yi hem de MDA'yı metabolize etmektedir. Artan 4-HNE ve / veya MDA seviyeleri göz önüne alındığında, ALDH3A1 ve ALDH1A1'in bu reaktif aldehytlerin enzimatik detoksifikasyonu sağlayarak UV radyasyona bağlı hasarlara karşı koruduğu bir başka mekanizmayı temsil eder. Dahası, korneadaki ALDH1A1'in varlığı, ALDH3A1'in zayıf bir substratı olan MDA'yı oksitleyerek ALDH3A1'i telafi edebilir (Buddi *et al.* 2002). Üçüncü olarak, ALDH3A1 ve ALDH1A1, UV radyasyona bağlı serbest radikalleri doğrudan uzaklaştırarak veya NAD(P)H'yi üreterek antioksidan gibi davranırlar. Oksidanlarla muamele edilen korneal fibroblastlarda ALDH3A1'in karbonilasyon seviyesi iki ila üç kat artmaktadır. Yüksek korneal ALDH3A1 konsantrasyonlarının ROS ve reaktif aldehytlerin doğrudan bir hedef görevi görebileceğini ve orada diğer proteinler için pasif koruyucu bir etki sağlayabileceğini düşündürmektedir (Estey *et al.* 2007).

ALDH aracılı metabolizma sırasında üretilen NAD(P)H korneanın antioksidan ortamına katkıda bulunur. NADPH, GSSG'nin GSH formuna dönüşmesinde indirgeyici bir ajan olarak görev yapmaktan başka UV radyasyonunu doğrudan emebilir (Atherton *et al.* 1999). Buna ek olarak, izositrat dehidrojenaz, malik dehidrojenaz ve 6-fosfat dehidrojenaz gibi göz dokularını korumakla görevli çeşitli redoks-aktif enzimler için bir azaltıcı potansiyelin korunmasına yardımcı olur (Pappa *et al.* 2003). Birlikte ele alındığında, enzimatik ve enzimatik olmayan işlevleri ile, ALDH3A1 ve ALDH1A1 oküler dokulardaki oksidatif / elektrofilik strese verilen hücrel yanıtta önemli rol oynamaktadır.

1.3.3. Kanser hücreleri

ALDH enzimleri son zamanlarda yeni kanser tanıyıcı markırları olarak görülmektedir. ALDH1A1 kanser tedavisinde önemli bir rol üstlenmektedir. ALDH1A1 aktivitesi siklofosfoamid ve ifosfamid gibi bazı antikanser ilaçların ana aktif aldehit metabolitlerini detoksifiye ederek etkisini azalttığı rapor edilmiştir (Sladek 1999). Aslında, ALDH1A1 inhibisyonu siklofosfamid'in ana metabolitlerinin toksitliğinin artmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda ALDH1A1 daunorubisin ve flavopiridol gibi bazı anti-kanser ilaçlara bağlanabilmektedir (Velazquez-Fernandez *et al.* 2005).

ALDH1A2 tarafından gerçekleştirilen retinoik asit sentezi hücre büyümesi ve apoptoziste farklı şekilde ilerler. Anti-kanser etkisine neden olabilir. Öyleki, ALDH1A2 prostat kanserinde tümör baskılayıcı gene aday olarak gösterilmektedir. ALDH1A2 ekspresyonu insan prostat kanser hücre hattında DNA dimetilasyonu tarafından indüklenir ve prostat tümörlerinde regülasyon azalır. ALDH1A2'nin düşük oranda ekspresyonu daha kısa süre hayatta kalmayla ilişkilidir. Ek olarak, prostat kanser hücrelerinde ALDH1A2'nin doğal tipinin fazla ekspresyonu hücre büyümesini inhibe etmektedir (Kim *et al.* 2005).

ALDH2*2 alleli; mide, kolon, akciğer ve boyun kanserinde risk faktörü olarak görülmektedir (Muto *et al.* 2000). Alkolik ALDH2*2 bireyler artmış asetaldehit seviyeleri sergiler. Bu da DNA hasar mekanizmasının artmasına ve kanser gelişimine neden olur (Matsuda *et al.* 2006).

ALDH3A1 çeşitli tümör tiplerinde ilaçlara karşı direnci artırmaktadır. Bazı kanserlerde bu ilaçlara karşı aktivitesindeki değişimler bunun nedenini açıklamaktadır (Sreerama and Sladek 1993). Knockdown ALDH3A1'in kanser hücre hattında oksafosforin ve onun metaboliti olan 4-hidroperoksisiklofosfamid'e karşı duyarlılığı artarken, normal insan periferik kan hücresine transfenksiyon edilen ALDH3A1'in oksafosforin'e direnci artmıştır (Wang *et al.* 2001).

Çizelge 1.2. Kanslerle ilişkili olduğu kabul edilen ALDH izoenzimleri

ALDH	Kanser Fenotipi
ALDH1A1	Tümör hücrelerinin oksafosforin türü anti-kanser ilaçlarına karşı direncini artırır. Normal hücrelerinin oksafosforin türü anti-kanser ilaçlarına karşı direncini artırır. Anti-kanser ilaçlarına bağlanır. Farede karaciğer tümörlerini baskılar.
ALDH1A2	Prostat kanserinde tümör baskılayıcı gen olarak gösterilir.
ALDH1A3	İnsanda göğüs kanseri hücre hattını baskılar. İnsan kolon kanseri hücre kültüründe p53'ü indükleyerek regülasyonu artırır. Mide kanserinde susturulmuş metilasyon işlemi yapar. Anti-kanser sitotoksik ajanı olan interlokin-13 tarafından regüle edilir.
ALDH1L1	İnsan karaciğer, akciğer, prostat ve pankreas kanserinde baskılanır. Apoptosis ve kanser hücre hattında fazla oranda eksprese olur. Antikanser ilaçlar ALDH1L1 aktivitesini indükler.
ALDH2	ALDH2'nin işlememesi; mide, kolon, akciğer, boyun kanseriyle ilişkilidir.
ALDH3A1	Tümör hücrelerinin oksafosforin türü anti-kanser ilaçlarına karşı direncini artırır. İnsanda Akciğer tümör hücrelerinde lipit peroksidasyonu türevli aldehitleri detoksifiye eder. İnsanda kanser doku ve hücre hattını düzenler. Hücre siklusunu regüle edebilir ve DNA tamirine yardım eder.
ALDH4A1	DNA hasarının bir sonucu olarak yeniden düzenleme yapar ve tümör baskılayıcı gen olan p53'ü hedef alabilir.
ALDH7A1	Hücre siklusunu regüle edebilir.

1.4. SUMO Protein Ekspresyon Sistemi

Rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılan plazmitler, DNA klonlama işlemi sırasında vektör olarak kullanımı için temelde üç bölgeye sahip olacak şekilde tasarlanır. Bu bölgeler; replikasyon orijini, seçim için marker gen (ilaç direnç geni) ve eksojenik DNA fragmentlerinin insert edilebileceği bölgelerdir.

The Champion™ pET SUMO protein ekspresyon sistemi *E. coli*'de doğal proteinlerin ekspresyon ve ifadesine izin veren küçük ubiquitin benzeri bir modifiye edici (SUMO; small ubiquitin-like modifier) kullanmaktadır. SUMO füzyonları, rekombinant proteinlerin ekspresyonunu ve çözünürlüğünü arttırabilir bir özelliğindedir.

Sistem vektörü olan pET SUMO önemli özelliklere sahip bir vektördür;

a. T7 promotörü: pET SUMO vektörünü bulduran bu bölge, IPTG ile indüklendiğinde, yüksek oranda ekspresyon kapasitesine ulaşmaktadır.

b. lac operatörü (lacO): Rekombinant proteinin bazal ekspresyonunu azaltan lac represörünün bağlanma bölgesidir.

c. Ribozom Bağlanma Bölgesi (RBS): PCR ürününün etkili translasyonunu sağlayan bölgedir.

d. N-Terminal Polihistidin (6xHis) Kuyruğu: Rekombinant proteinin kolay bir şekilde saflaştırılmasını ve Anti-HisG antikoru ile tespit edilmesini sağlayan bölgedir.

e. SUMO ORF: Rekombinant proteinin çözünürlüğünü ve ekspresyonunu artırır. Ayrıca SUMO proteaz kullanılarak doğal ürünün elde edilmesine olanak sağlar.

f. TA Klonlama Sitesi: Bu bölge ile amplifiye edilen ve adenin kuyruğu içeren PCR ürünü etkili bir şekilde klonlanabilir.

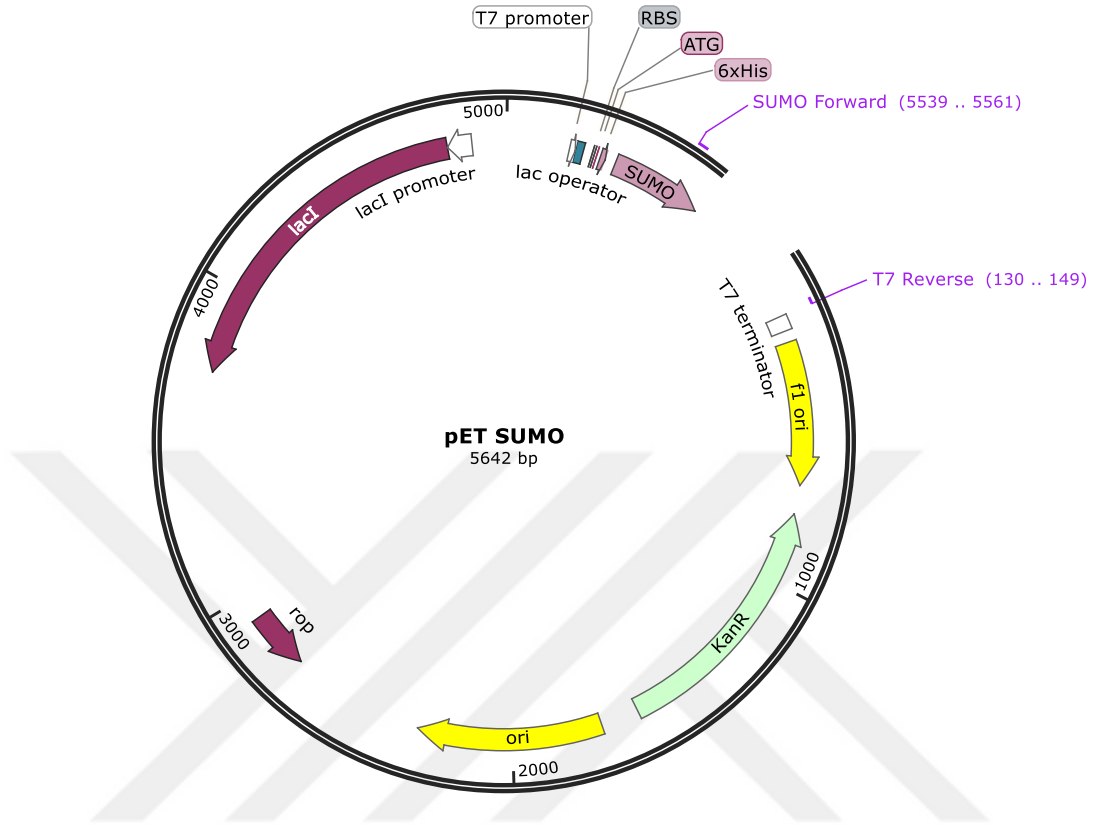
g. T7 Transkripsiyon Sonlanma Bölgesi: Transkripsiyonun etkili bir şekilde sonlanmasını sağlar.

h. Kanamisin Direnç Bölgesi: Antibiyotik direncinden sorumlu olan bu bölge tüm vektörlerde olduğu gibi hedef geni alan konak hücrenin seçilebilirliğine imkan sağlar.

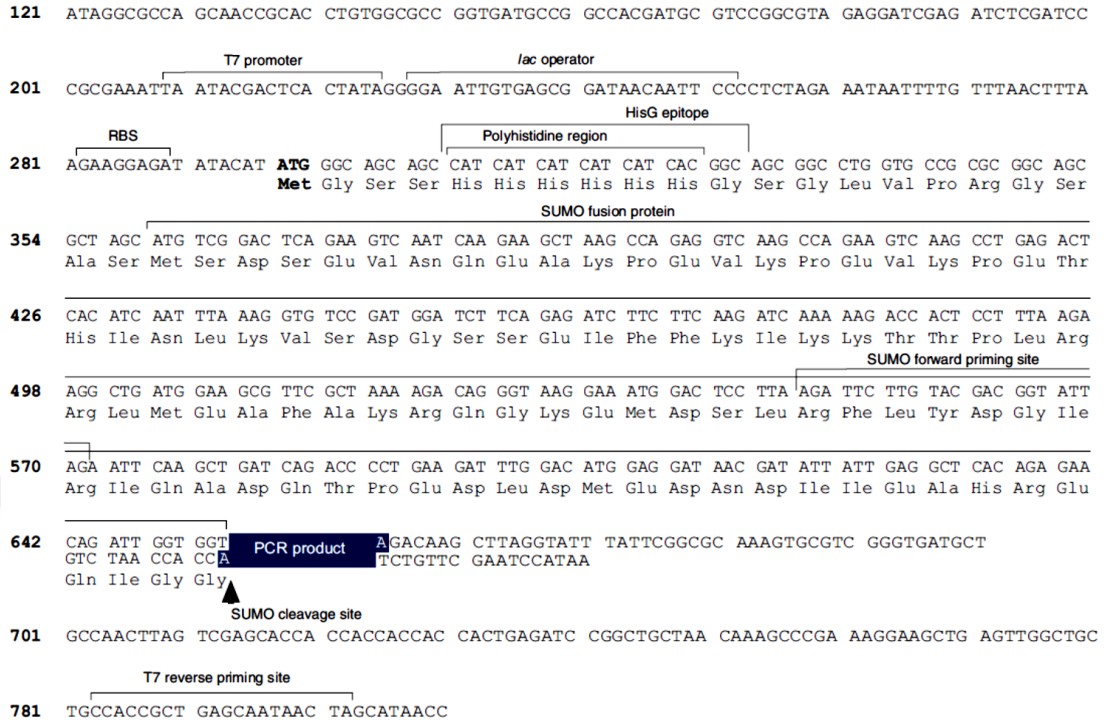
i. pBR322 Replikasyon Orijini: *E. coli* içerisinde kopyalama ve onarım faaliyetlerinden sorumludur.

j. ROP ORF: Düşük kopya sayılı replikasyon için pBR322 replikasyon orijini ile ilişkili bölgedir.

k. lacI ORF: İlgili genin transkripsiyonunu baskılamak için T7lac promotörüne bağlanan represörü kodlayan bölgedir.



Şekil 1.7. pET SUMO vektör haritası



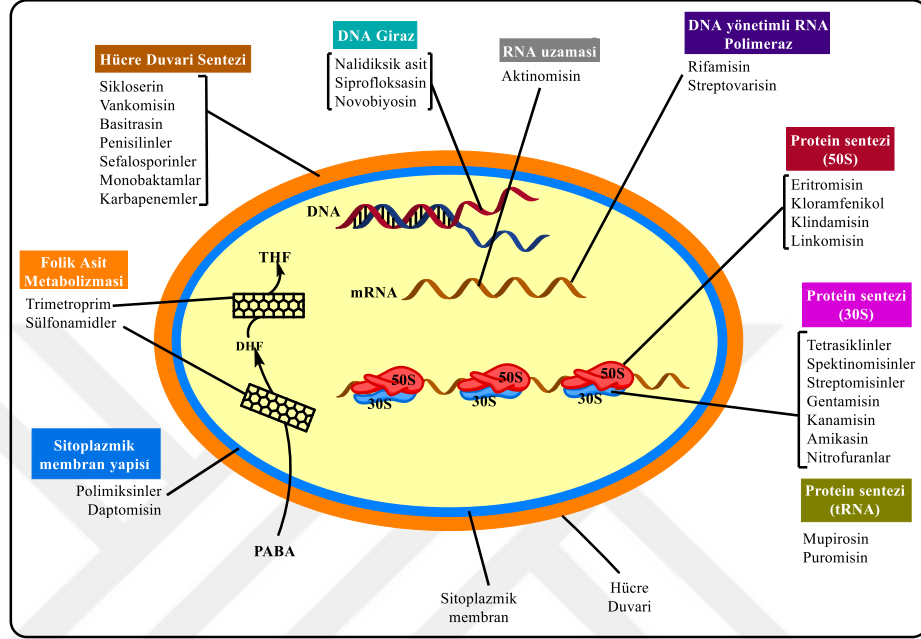
Şekil 1.8. pET SUMO vektörüne ait TA klonlama kısmı

1.5. Antibiyotikler

Antibiyotikler çeşitli mikroorganizma ve funguslar (*Eukarya*) tarafından üretilen antimikrobiyal ajanlardır. Diğer mikroorganizmaları inhibe ederek veya öldürerek işlev görürler. Antimikrobiyal ilaçlar moleküler yapılarına ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılır (Şekil 1.8.). Binlerce antibiyotik bilinmesine rağmen, genellikle konakçı hücreler tarafından alınımının olmamasıyla ilgili problemler nedeniyle %1'den azı klinik açıdan yararlıdır (Qiao *et al.* 2018).

20. yüzyıldan beri hızla gelişen ve ilerleyen teknoloji ile artan yaşam beklentisinde antibiyotikler daha da büyük önem kazanmıştır. Bu doğrultuda antibiyotikler, modern tarım ve hayvancılık endüstrilerinde de değişikliğe neden olmuştur. Enfeksiyon tedavisi ve sağlıklı hayvancılıkta yem verimliliğini artırmada da antibiyotikler kullanılmıştır. Antibiyotiklerin aşırı, gereksiz ve kötüye kullanımı, antibiyotiklere dirençli bakterilerin ve antibiyotiklere dirençli genlerin hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına sebebiyet

vermiştir. Bunun sonucunda da insan ve hayvanların patojenlere karşı terapötik potansiyelleri azalmıştır (Qiao *et al.* 2018).



Şekil 1.9. Başlıca antimikrobiyal ajanların hedefleri

*PABA, *p*-aminobenzoik asit; THF, Tetrahidrofolat; DHF, dihidrofolat; mRNA, haberci RNA

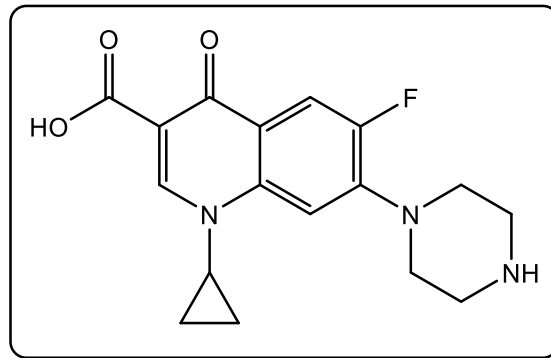
1.6. İnsan ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Antibiyotiklerin Sınıfları ve Özellikleri

1.6.1. Kinolonlar

Kinolonlar, bakteriyel enzimlere, DNA giraza ve topoizomeraz IV'e bağlanarak güçlü antibakteriyel etki gösterirler. Bu bağlanma, kinolon-enzim-DNA kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır. Bağlandıktan kısa bir süre sonra enzim konformasyonel değişikliklere uğrar. Enzim DNA'yı parçalar ve ilaç, kırık DNA iplikçiklerinin yeniden birleşmesini engeller, böylece DNA çoğalmasını önler. En sonunda, bu durum bakteri DNA'sına hasar verir ve dolayısıyla hücre ölümüne sebep olur (Stefan *et al.* 2016).

Florokinolonlar, (FQ) geniş antibakteriyel spektrumlara sahip olması ve konak dokulara sistemik dağılımının artması nedeniyle, çok çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif patojenlere karşı büyük terapötik değere sahip, dünyada en çok öngörülen antibiyotik sınıflarından biridir (Aldred *et al.* 2014). FQ yaklaşık 30 yıldır önemli antimikrobiyal ajanlar olarak hızla gelişmiştir. Molekül yapısında ki diketon gruplarının varlığı nedeniyle beta diketon antibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda FQ'ler en çok çalışılan ve kapsamlı olarak sentetik antimikrobik maddelerdir (Xu *et al.* 2006). FQ'ler güçlü antibakteriyel özelliklere, basit yapılara ve belirgin iyileştirici etkilere sahiptir. Bu nedenle, bu ajanlar hayvan ve insan hastalıklarının kontrolünde yaygın olarak kullanılır (Kools *et al.* 2008).

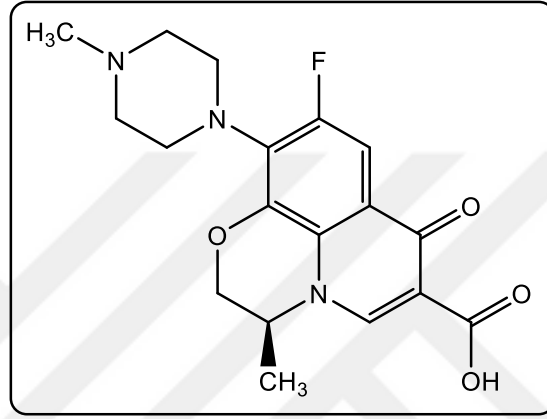
Siprofloksasin: İkinci jenerasyon kinolon olan siprofloksasin, yapısal olarak nalidiksik aside benzemektedir. Yapıdaki asidik kısım kinolonların etki mekanizmasını ve bakteri potensiyelini kontrol eder. Nalidiksik asidin aksine, siprofloksasin flor atomu içermektedir. Bu değişiklik nedeniyle, siprofloksasin nalidiksik asitten yaklaşık 100 kat daha güçlüdür. Komplike idrar yolu enfeksiyonları, kemik veya eklem enfeksiyonları, kistik fibroz, tifo, shigellosis (basilli dizanteri) ve duyarlı bakterilerin neden olduğu epididimo-orşit gibi geniş bir yelpazede enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Sharma *et al.* 2007).



Şekil 1.10. Siprofloksasin molekülünün yapısal formülü

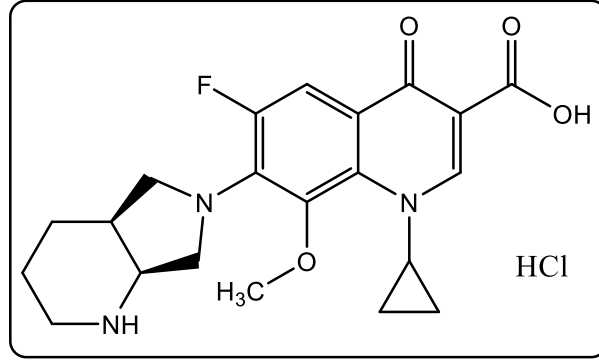
Levofloksasin: Gastroenterit, pelvik inflamatuvar hastalık, kronik prostatit, idrar yolu enfeksiyonları, akut bakteriyel sinüzit, menenjit, şarbon, tüberküloz ve pnömoni gibi pek çok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılan fluorokinolon sınıfının geniş

spektrumlu bir antibiyotiktir. Olası yan etkileri tendon iltihabı ve rüptürü, psikoz, nöbetler, periferik sinir hasarı, uyku bozukluğu, diyare ve mide bulantısı içerir. Ticari olarak oral veya intravenöz olarak kullanılmak üzere jenerik ilaç olarak mevcuttur. Levofloksasin herhangi bir ulusal sağlık sistemi için vazgeçilmez en önemli ilaçlardan birisidir (Zhanel *et al.* 2002).



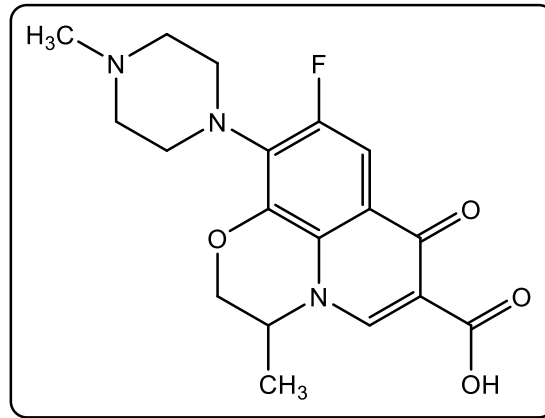
Şekil 1.11. Levofloksasin molekülünün yapısal formülü

Moksifloksasin HCl: Dördüncü nesil florokinolon grubunda bulunan bir antibiyotiktir. Antifungal aktivitesine sahip olması, iyi fotokimyasal özelliklerinin bulunması ve termal direnç göstermesi sebebiyle sıklıkla kullanılan antibiyotiktir (Paula Vieira *et al.* 2017) Moksifloksasin, son zamanlarda görülen florokinolonlar gibi, solunum yolu patojenlerini kapsayan geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir. Gram negatif basillere (*Enterobacteriaceae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*) karşı mükemmel aktivite gösterir ve siprofloksasinle karşılaştırıldığında gram pozitif bakterilerden *S. pneumoniae*'ye (hem penisiline duyarlı hem de penisiline dirençli suşlar) ve *S. Aureus*'a karşı geliştirilmiş aktivitesi gösterir (Zhanel *et al.* 2002; Tano *et al.* 2005).



Şekil 1.12. Moksifloksasin HCl molekülünün yapısal formülü

Oflaksasin: Geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahip fluorokinolondur. Oflaksasin aktif olarak bölünen hem de durağan bakteriler üzerinde etkindir. İlacın mekanizması bakteri DNA girazının inhibisyonu ile gerçekleşir. Ofloksasin, sistemik ve lokal enfeksiyon tedavisinde geniş bir antibakteriyel etkinliğe sahiptir. Ofloksasin'in yarılanma ömrü 6-7 saattir. Oflaksasin suda ve metanol de az çözünür. Düşük çözünürlük ve yüksek geçirgenliğe sahiptir (Jagdale and Pawar 2017).



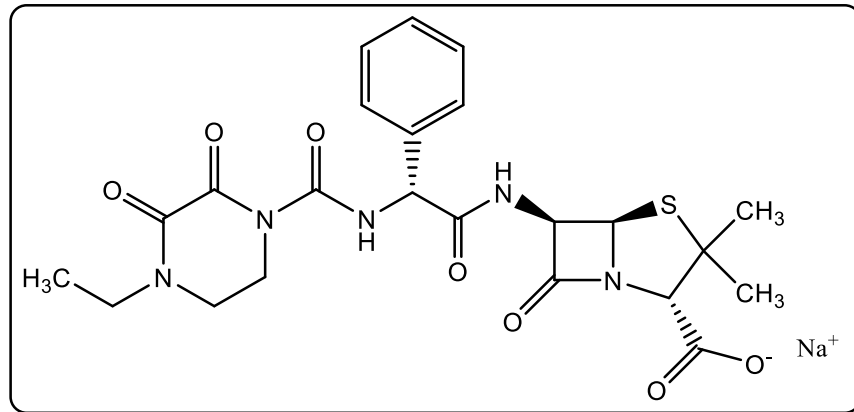
Şekil 1.13. Ofloksasin molekülünün yapısal formülü

1.6.2. Penisilin

Penisilinler, mantarlardan türetilen doğal veya sentetik antibakteriyel ajanlardır. Tüm penisilinlerin üç boyutlu kimyasal bileşenlerinde bir tiazolidin halkası, birleştirilmiş beta-laktam halkası ve bir yan zincir bulunmaktadır. Karakteristik beta-laktam yapısını

penisilin ile paylaşan diğer antibiyotikler ise sefalosporin, karbapenamin ve monobaktam sınıflarını içerir. Genel olarak, bu antibiyotik sınıflarına sıklıkla beta laktam denir. Tüm penisilinler aktif olarak büyüyen ve bölünen organizmalara bakterisidal etki gösterirler. Bakteri hücre duvarını oluşturan ve protein çapraz bağlanmasını sağlayan enzimlere bağlanarak hücre duvarı sentezini engellerler. Hücre duvarlarının hemen altında bulunan bu enzimler, aynı zamanda penisilin-bağlayıcı proteinler olarak da adlandırılır. Ortaya çıkan yapısal zayıflık, otolitik enzimlerin aktivasyonu ile dengelenir ve duyarlı bakterilerin parçalanmasına neden olur (Aksu and Tunç 2005).

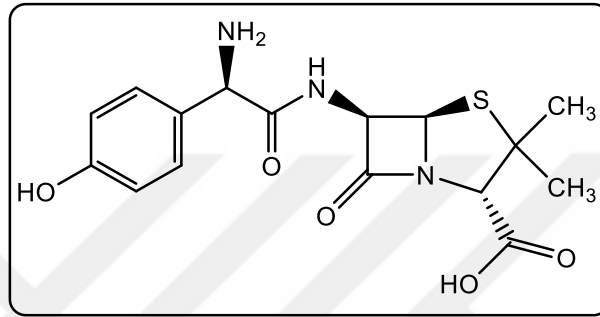
Piperasilin sodyum: Aerobik ve anaerobik bakterilere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinliğe sahiptir ve karmaşık nozokomiyal enfeksiyonları tedavi etmek için sıklıkla kullanılır. Piperasilin-tazobaktam genel olarak güvenli ve iyi tolere edildiği düşünülse de, advers ilaç olayları (ADE'ler) tarif edilmiş ve en yaygın olarak gastrointestinal rahatsızlıklar, deri döküntüleri ve kemik iliği baskılanmasına neden olduğu bilinmektedir (Yusef *et al.* 2017).



Şekil 1.14. Piperasilin sodyum molekülünün yapısal formülü

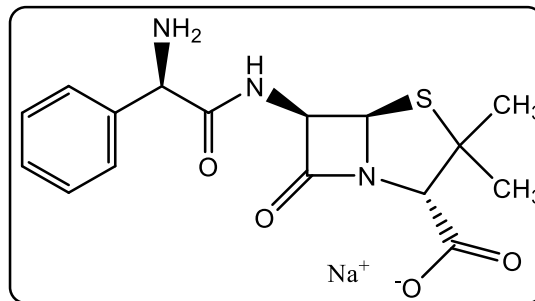
Amoksisilin: Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder. Amoksisilin genellikle streptokok, beta-laktamaz üretmeyen stafilokok ve diğer gram-pozitif koklar ve basilleri içeren dar bir aktivite spektrumuna sahiptir. Birçok *Staphylococcus* suşu, beta-laktamaz üretimi nedeniyle dirençlidir. *Enterobacteriaceae*'nin enterik gram negatif basillerine

karşı dirençlidir. Duyarlı gram-negatif bakteriler, *Proteus*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus*'un bazı türlerini içerir. Gram negatif bakteriler arasında direnç yaygındır. Kısa yarılanma ömründen dolayı, gram negatif enfeksiyonların tedavisi için sık uygulanmaktadır. Ek olarak, duyarlılık kırılma noktası, gram pozitif organizmalara kıyasla gram negatif için daha yüksektir (Papich 2016).



Şekil 1.15. Amoksisilin molekülünün yapısal formülü

Ampisilin sodyum: Beta-laktam antibiyotığıdır. Ampisilin bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder. Ampisilin, amoksisilininkine benzer dar bir aktivite spektrumuna sahiptir. Ampisilin genel olarak streptokok, beta-laktamaz üreten stafilocok ve basiller diğer gram pozitif koklar üzerine etkinliğe sahiptir. Birçok stafilocok beta-laktamaz üretimi nedeniyle dirençlidir. *Enterobacteriaceae*'nin enterik gram negatif basilleri dirençlidir. *Proteus*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus*'un bazı türlerini içeren gram-negatif bakterilere karşı duyarlıdır (Papich 2016).

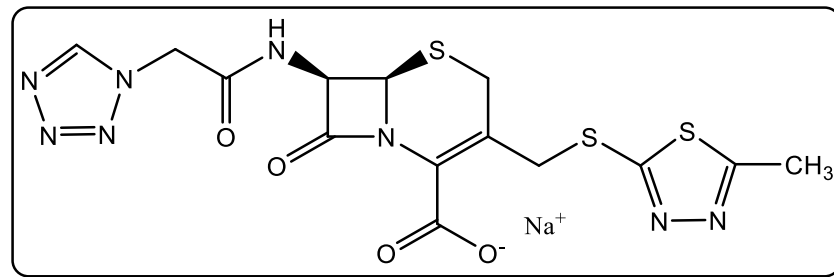


Şekil 1.16. Ampisilin sodyum molekülünün yapısal formülü

1.6.3. Sefalosporinler

Sefalosporinler, penisilinlerle aynı etki mekanizmasını ve benzer yapıyı paylaşan beta-laktam antimikrobiklerdir. Penisilinler ve sefalosporinler aynı dört üyeli "merkez" beta-laktam halkasına sahiptir, ancak sefalosporinler yan halkada ek bir atoma sahiptir. Her iki halkadaki modifiye olan yan zincirler, antimikrobiyal aktiviteyi, farmakokinetiği ve direnç mekanizmasını değiştirir. *Listeria* ve *Pasteurella sp.* hariç penisiline duyarlı patojenler genellikle sefalosporinlere duyarlıdır. Sefalosporinler, *E. coli*, tipik olmayan *Haemophilus influenzae* (ntHi) ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) gibi ortak gram-negatif organizmalara karşı aktiviteye sahiptir (Harrison and Bratcher 2008).

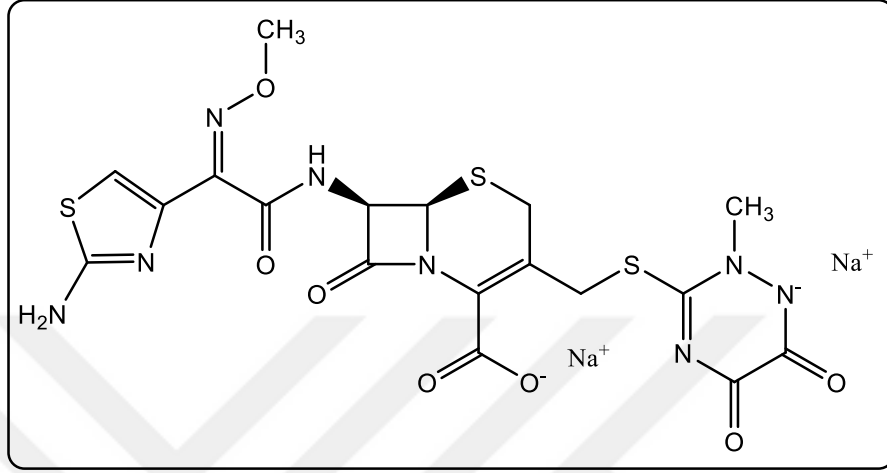
Sefazolin sodyum: Sefalosporin grubu antibiyotiktir. Etkisi, diğer beta-laktam antibiyotiklerine benzemektedir. Bakteriyel hücre duvarının sentezini inhibe eder ve hücre ölümüne yol açar. Sefalosporinlerin birinci kuşağında bulunan antibiyotiktir. Diğer birinci jenerasyon sefalosporinler gibi, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* türlerine ve *Pasteurella*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bazı gram negatif basillere karşı da aktiftir (Papich 2016).



Şekil 1.17. Sefazolin sodyum molekülünün yapısal formülü

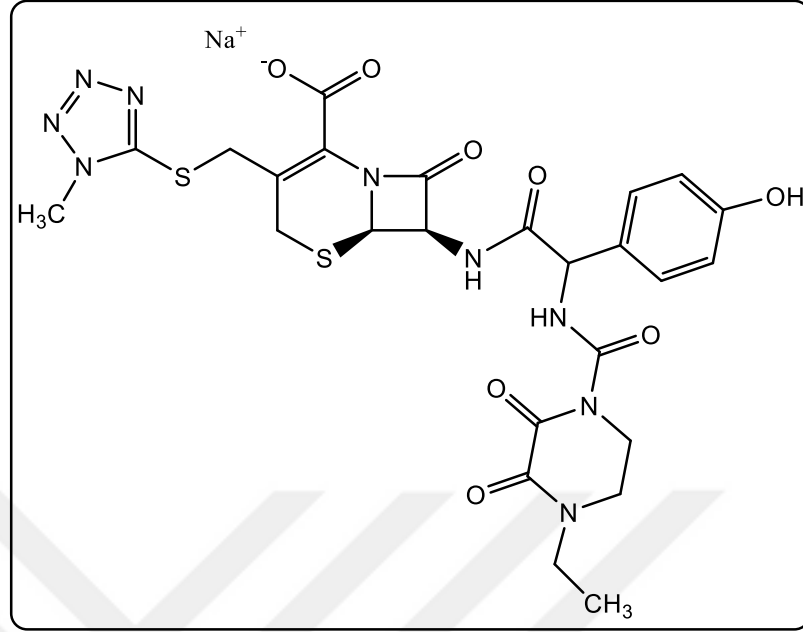
Seftriakson sodyum: Seftriakson, yarı sentetik ve geniş spektrumlu 3. jenerasyon sefalosporindir. Seftriakson'un, gram pozitif ve gram negatif aerob ve bazı anaerob bakterileri içine alan geniş bir etki spektrumu vardır. Bakterisid etkisini hücre duvarı sentezini inhibe ederek yapmaktadır. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hem

penisilinaz, hem de sefalosporinaz türündeki beta laktamazlara karşı yüksek derecede dayanıklıdır (Kayaalp 2002).



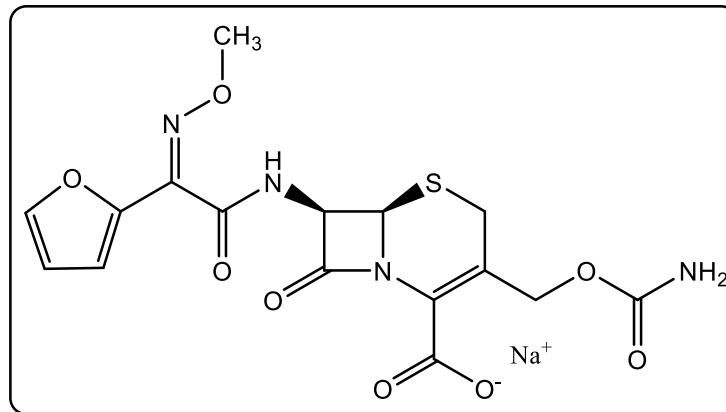
Şekil 1.18. Seftriakson sodyum molekülünün yapısal formülü

Sefoperazon sodyum: Üçüncü kuşak sefalosporinlerin ilk üyelerinden birisi olan sefoperazon, bu kuşaktaki diğer ilaçlar gibi *Entebacteriaceae* grubu gram-negatif basillere karşı güçlü etkinlik gösterir. *P.aeruginosa*'ya karşı etkinliği bakımından seftazidim ve sefsulodinden sonra üçüncü sırada yer alır. *B.fragilis* ve *K.pneumoniae*'ye etkinliği bakımından önde gelen üçüncü kuşak ilaçlardan birisidir. Sefaperazonun ve üçüncü kuşaktaki diğer ilaçların *B.fragilis*'e karşı etkinliği ikinci kuşaktaki sefoksitininkinden düşüktür. *N.gonorrhoeae*'ye karşı etkinliği yeteri derecededir. Shigella ve diğer birçok Enterobacteriaceae türüne karşı etkinliği sefotaksim, seftazidim ve seftriakson'unkinden daha düşüktür. Gram-pozitif kokuslara karşı etkinliği birinci kuşaktaki ilaçlara göre daha düşüktür. Plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.19. Sefoperazon sodyum molekülünün yapısal formülü

Sefuroksim sodyum: Sefalosporin antibiyotığıdır. Diğer beta-laktam antibiyotiklerine benzer şekilde bakteriyel hücre duvarının sentezini inhibe eder ve hücre ölümüne yol açar. Sefalosporinler, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü olarak adlandırılan kuşaklara ayrılır. Sefazolin, birinci kuşak sefalosporindir. *Streptococcus*, *Staphylococcus* türleri ve bazı gram negatif basillere karşı etkilidir (Papich 2016).

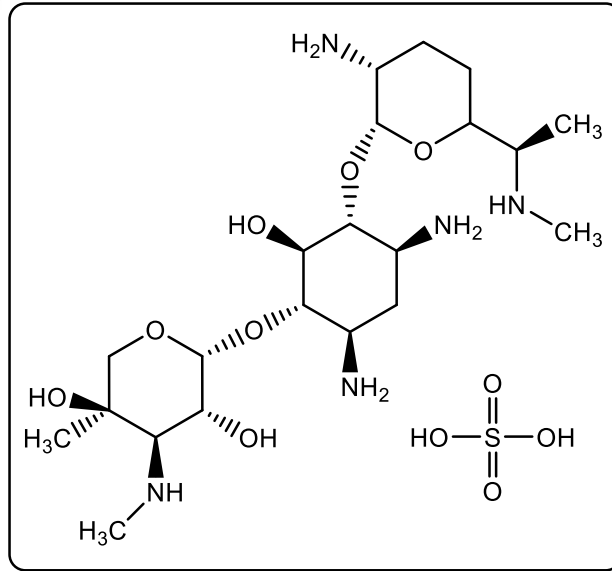


Şekil 1.20. Sefuroksim sodyum molekülünün yapısal formülü

1.6.4. Aminoglikozitler

Glikozit bağla bağlanmış amino şekerleri içeren antibiyotiklere aminoglikozitler denilir. Klinik yönden yararlı aminoglikozitler streptomisini (*Streptomyces griseus* tarafından üretilir) ve onun akrabaları olan kanamisin, neomisin ve gentamisini içerir. Aminoglikozitler ribozomun 30S altbirimini hedef alarak protein sentezini inhibe eder ve gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Madigan and Martinko 2010).

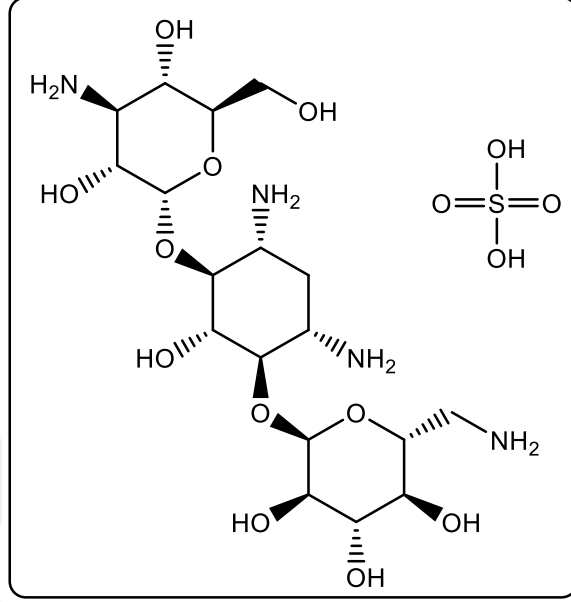
Gentamisin sülfat: Aminoglikozit antibiyotığıdır. Etkisi, 30S ribozoma bağlanarak bakteri protein sentezini inhibe etmektedir. Gentamisin, konsantrasyona bağlı bir tarzda bakterisidaldır. *Staphylococci* ve *Enterobacteriaceae*'nin gram negatif basilleri de dahil olmak üzere, hayvanlardaki bakteri izolatlarını içeren geniş bir aktivite yelpazesine sahiptir. Streptokoklara ve anaerobik bakterilere karşı çok aktif değildir (Papich 2016).



Şekil 1.21. Gentamisin sülfat molekülünün yapısal formülü

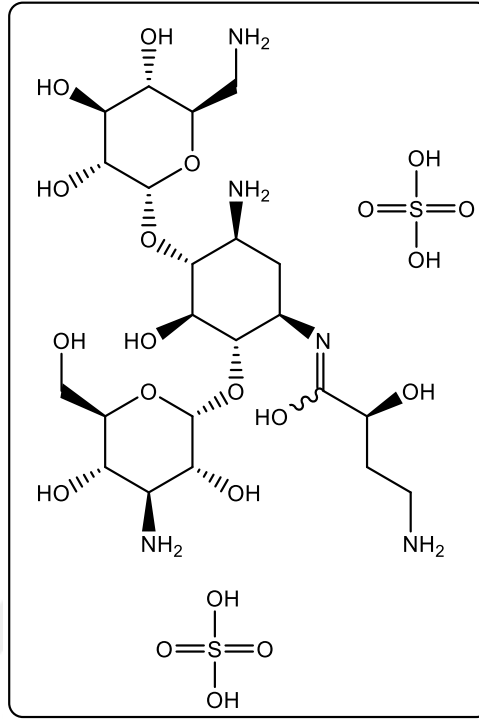
Kanamisin sülfat: Aminoglikozit antibiyotığıdır ve bakterisit etkiye sahiptir. Diğer aminoglikozitlerde olduğu gibi, kanamisin 30S ribozomuna bağlanarak bakteri protein sentezini inhibe eder. Geniş spektrumlu ve çeşitli patojen bakterilerin neden olduğu

ciddi enfeksiyonların tedavisinde ikinci basamak antibiyotik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Liu *et al.* 2016).



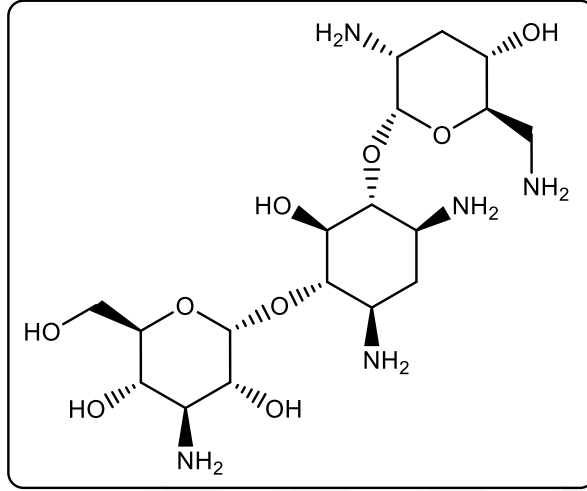
Şekil 1.22. Kanamisin sülfat molekülünün yapısal formülü

Amikasin sülfat: Aminoglikozit antibiyotığıdır. Bakterinin 30S ribozomuna bağlanarak protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Amikasin, streptokoklar ve anaerobik bakteriler haricinde geniş bir spektrumda bakterisidal özellik göstermektedir. Amikasin, diğer ilaçlara dirençli olan birçok bakteri, özellikle de gram negatif basillere karşı aktiviteye sahiptir. Amikasin birçok gram negatif bakteriye, özellikle enterik türlere karşı gentamisin'den daha aktiftir. Amikasin bakteriyel enfeksiyonlarda, özellikle de gram negatif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde endikedir. Gentamisine direnç beklendiğinde, yerine amikasin sıklıkla kullanılır (Papich 2016).



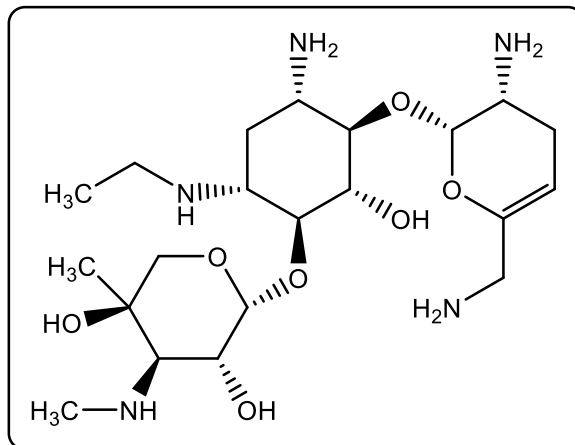
Şekil 1.23. Amikasin sülfat molekülünün yapısal formülü

Tobramisin: Diğer aminoglikozidler gibi, gram negatif bakterilerin neden olduğu ciddi sistemik enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır. Konsantrasyonu, antibakteriyel etkisine bağlıdır. Tobramisin, *Klebsiella pneumoniae*'ye ve *E. coli*'ye karşı gentamisinle benzer aktiviteye sahiptir. Tobramisin genellikle *Pseudomonas aeruginosa* karşı gentamisin'den daha aktiftir. Genellikle sinerjistik bir etki oluşturmak için beta-laktam antibiyotikleri ile aynı anda uygulanır (Papich 2016).



Şekil 1.24. Tobramisin molekülünün yapısal formülü

Netilmisin: Gentamisine benzer etkiye sahip, yarı sentetik aminoglikosid antibiyotiktir. Organizmalardaki protein sentezini, bakteriyel 30S ribozomal altbirimine bağlanarak ve alıcı tRNA sitesine müdahale ederek inhibe eder. Birçok gram negatif ve gram pozitif bakteriye karşı aktiftir. Buna ek olarak netilmisin, aminoglikozid inaktive edici bakteriyel enzimlerin birçoğundan gelen saldırılara karşı daha az hassastır ve bu nedenle gentamisin ve tobramisine dirençli suşlara karşı aktiftir (Russo *et al.* 2007).

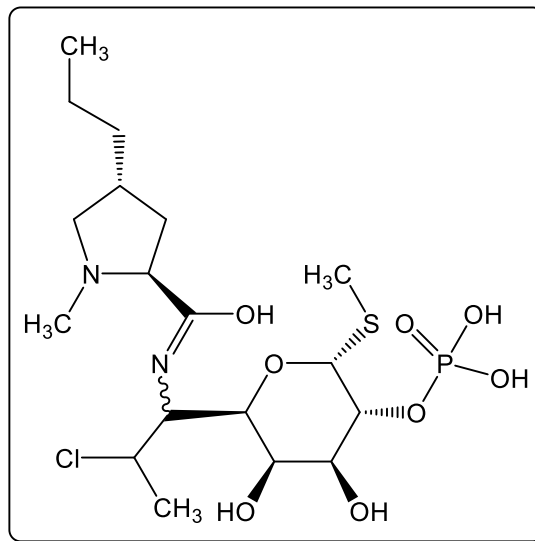


Şekil 1.25. Netilmisin molekülünün yapısal formülü

1.6.5. Linkozamidler

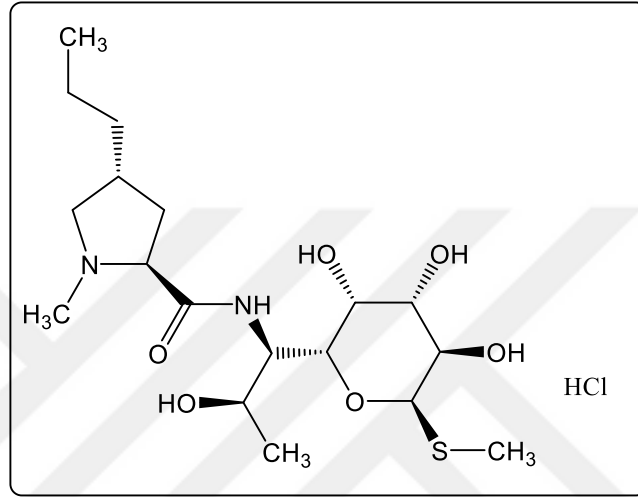
Linkosamidler, diğer antibiyotiklerin aksine yeni bir yapıya sahip küçük bir ajanlar grubudur. Gram-pozitif bakterilere ve anaeroblara karşı çok aktiftir, ancak Gram-negatif aeroblara karşı aktif değildir. Ayrıca bazı mikoplazmalara ve protozoonlara karşı da aktiftirler. Linkozamidler bakterilerin 50S ribozomal alt birimlere bağlanmak suretiyle protein sentezini inhibe ederek bakteriostatik etkinlik gösterir. Dar spektrumludurlar (Greenwood 2010).

Klindamisin fosfat: Linkozamid sınıfında bulunan antibakteriyel ilaçtır. Linkomisin ile yapısal, mikrobiyolojik aktivite ve diğer özellikleri paylaşır. Bakteriye ribozomun inhibisyonu yoluyla bakteri protein sentezini inhibe eder. Klindamisin esas olarak gram-pozitif bakterilere ve onların anaeroblarına karşı bakteriostatik etki gösterir. Klindamisin, makrolid antibiyotikleri gibi, lökositler ve birçok dokuda konsantre olabilir. Klindamisinin öncelikli olarak *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve gram-pozitif çubuklar olan *Corynebacterium* gibi gram pozitif organizmalara karşı etkinlik göstermektedir. Klindamycin, aynı zamanda mikoplazma ve anaerobik organizmalara karşı da aktiftir (Papich 2016).



Şekil 1.26. Klindamisin fosfat molekülünün yapısal formülü

Linkomisin HCl: Linkomisin mekanizması klindamisin ile benzerdir. Diğer ilgili ilaçlar gibi, etki yeri de 50S ribozomal altbirimdir. Bu ribozomu inhibe ederek protein sentezini düşürür. Çoğu bakteriye karşı, bakteriostatiktir. Spektrumu, esasen gram-pozitif bakterileri ve *Mycoplasma* gibi atipik bakterileri içerir (Papich 2016).

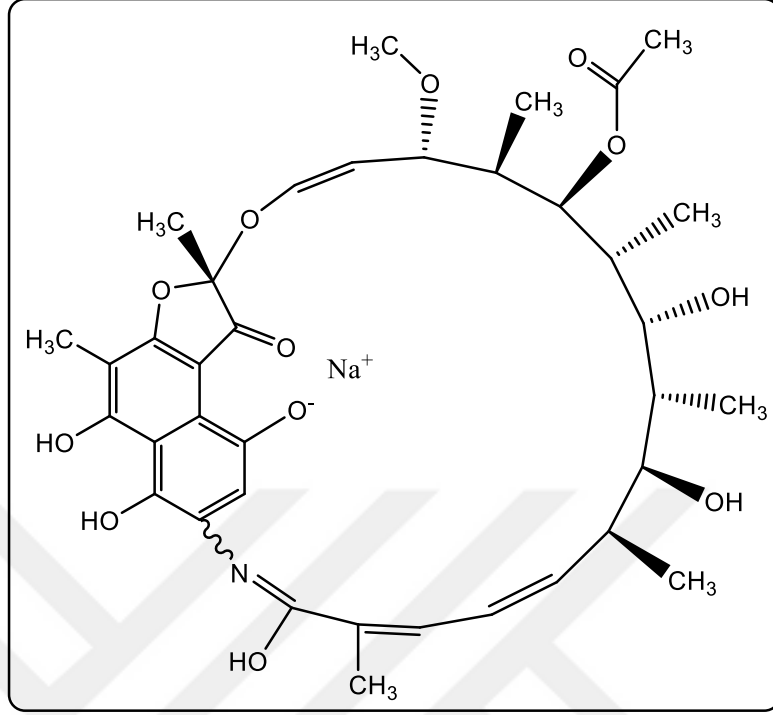


Şekil 1.27. Linkomisin HCl molekülünün yapısal formülü

1.6.6. Antistafilokokal

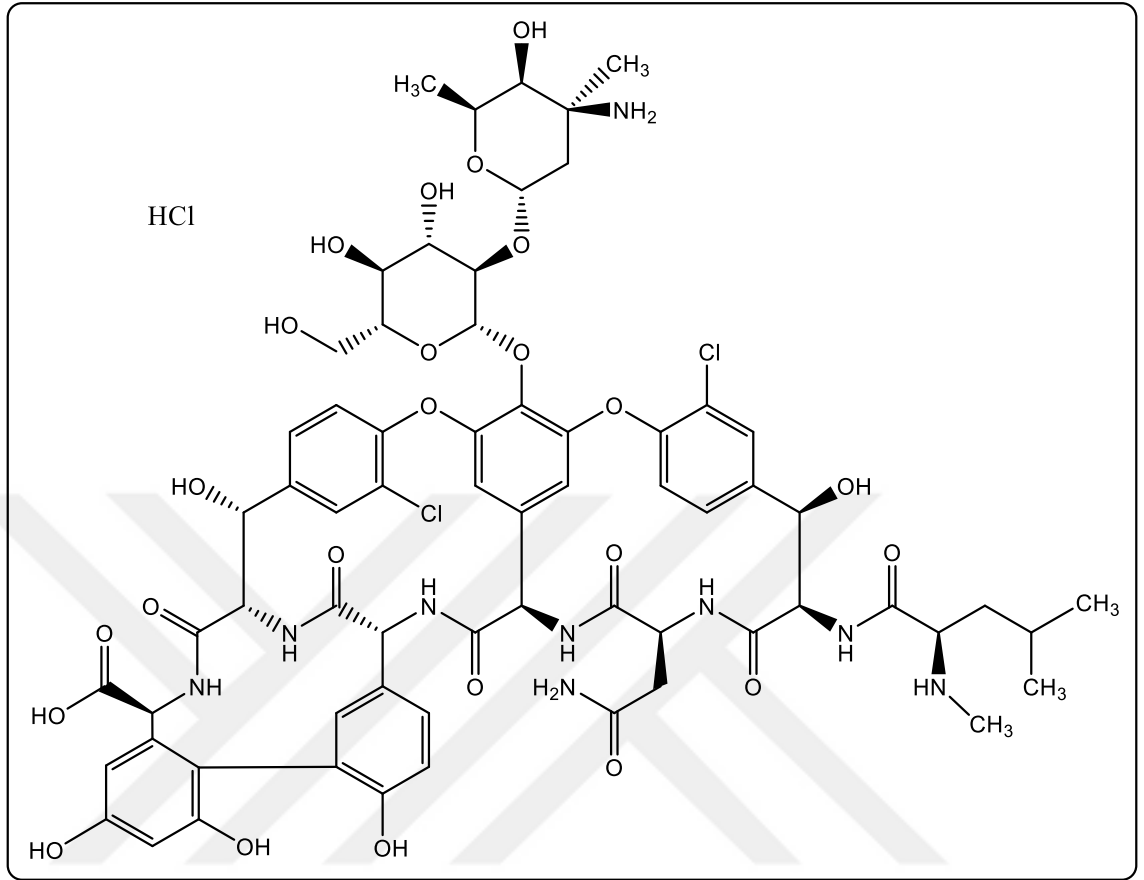
Gram pozitif bakteri olan *S. aureus*, doku karbonsüllerinin, gıda zehirlenmesinin, yara ile ilişkili enfeksiyonların, bakteremi gibi durumların ortak bir nedenidir. Hastane enfeksiyonlarının başlıca sebebidir ve pek çok farklı antibiyotik sınıflarına karşı direnç kazanmıştır. Özel endişe kaynağı olan metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak adlandırılan suşlar, çoğu β -laktam antibiyotiğine dirençlidir. Bu nedenle, bu organizmalara karşı etkili ve yeni antibiyotik sınıfları aramak önemli hale gelmiştir. Antistafilokokal sınıfı antibiyotikler bu amaçla kullanılmaktadır (Zhang *et al.* 2017).

Rifamisin sodyum: Bakterilerde DNA kontrolü altında yapılan mRNA sentezini, RNA polimeraz enziminin beta-alt ünitesini bloke ederek bozar yani transkripsiyonu engeller. Bakterisid etki gösterir. Özellikle gram pozitif koklara karşı etkilidir (Aristoff *et al.* 2010).



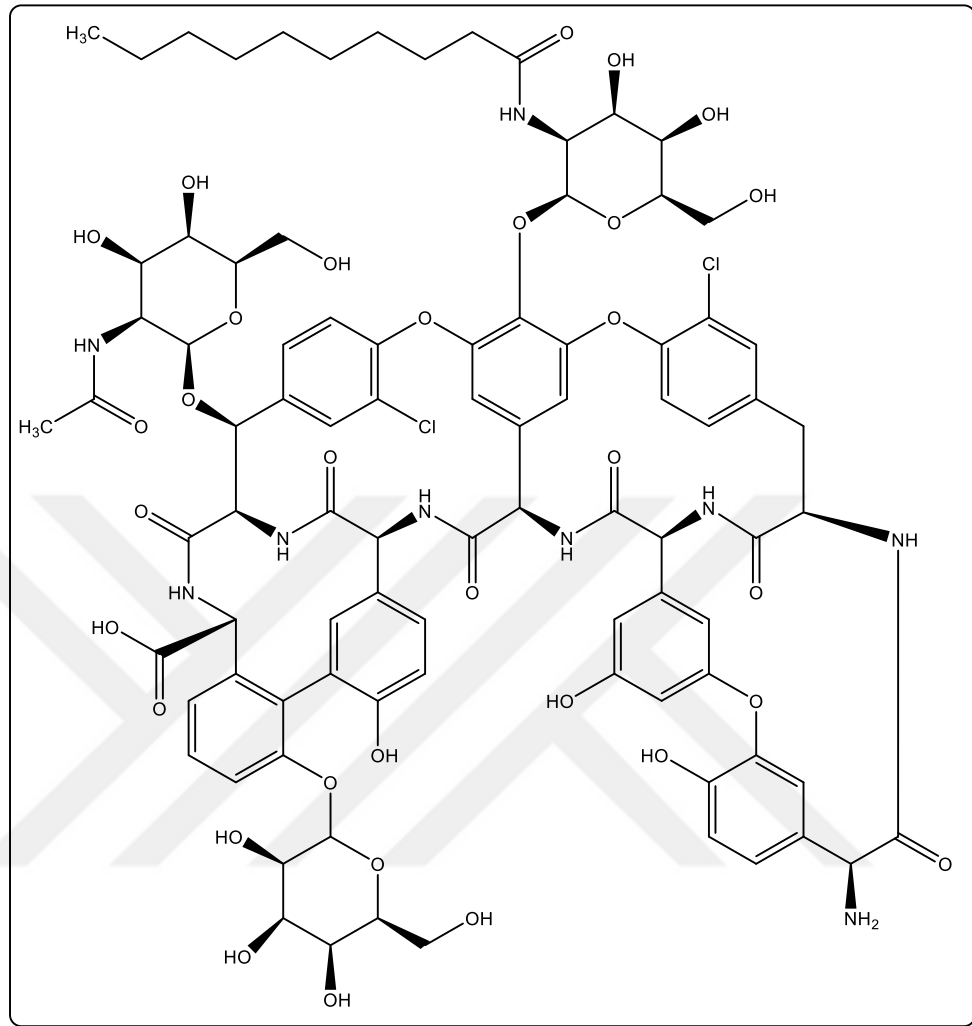
Şekil 1.28. Rifamisin sodyum molekülünün yapısal formülü

Vankomisin HCl: Vankomisin bakteriyel bir antibiyotiktir, bakteriyel hücre duvarına bağlanır ve glikopeptit polimerizasyonunu bloke eder. Bu etki hücre duvarı sentezini hemen inhibe eder ve sitoplazmik membrana sekonder hasar verir. metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak adlandırılan suşlar üzerinde etkinlik gösterir (Peng *et al.* 2013).



Şekil 1.29. Vankomisin HCl molekülünün yapısal formülü

Teikoplanin: Glikopeptit yapısındadır. Bakterisid etkisini hücre duvarı sentezini inhibe ederek yapmaktadır. Etki spektrumu vankomisine benzer ancak ondan daha etkilidir. Stafilokok ve enterokokların neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılır (Peng *et al.* 2013).



Şekil 1.30. Teikoplanin molekülünün yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Aldehit dehidrogenazlar (ALDH), endojen ve eksojen aldehitleri, karşılık gelen karboksilik asitlere metabolize eden bir grup enzimdir. ALDH aktivitesi, hücre farklılaşması, detoksifikasyon ve ilaç direnci için önemlidir (Muramoto *et al.* 2010). Aldehitlerin öncelikli toksikliği; enzimlerin inaktivasyonunu, DNA hasarını ve hücre homeostazın bozulmasını sağlamasıdır. Organizmalardaki ALDH eksikliği ve polimorfizmleri, Parkinson hastalığı, tip II diyabet, hipertansiyon ve Sjögren-Larsson sendromu gibi hastalıklarla ilişkilidir, hatta karsinoma oluşumuna katkıda bulunabilir (Xu *et al.* 2015).

ALDH1 çeşitli kanser türlerinde yüksek oranda eksprese olması araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu enzimin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmaların artmasını sağlamıştır. Zhang *et al.* (2014) yaptığı çalışmada Hidroksisafrol Sarı A (HSYA)'nın antioksidan özelliklerine dayanarak, hesaplamalı simülasyon bütünleştirme yöntemlerini uygulayarak ALDH1 üzerindeki inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda HSYA'nın ALDH1 enzimini yarışmasız olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır. ($K_i = 0,267 \pm 0,024$ mM). Moleküler docking sonuçlarına göre de HSYA'nın dört halkasının ALDH1 aktif bölgesi yakınındaki birkaç kalıntıyla etkileşime girdiğini göstermişlerdir.

ALDH1A1 inhibitörleri, bu enzimin hastalık süreçlerinde rol oynamasına yardımcı olabilir. Bununla birlikte, piyasada ALDH1A1 için seçici inhibitörler bulunmamaktadır. Morgan and Harley (2015) yaptıkları bu çalışmada diğer sekiz ALDH izoenzimi ile karşılaştırıldığında insan ALDH1A1 için seçici olan iki farklı kimyasal inhibitör sınıfını karakterize etmişlerdir. CM026 ve CM037'de ki her bir yapısal sınıfın prototip üyeleri, mikromolar inhibisyon sergilemiş olmasına rağmen farklı inhibisyon mekanizmalarına göstermişlerdir. Bu bileşiklerin kristal yapılarının ALDH1A1'i inhibe etmesi; ALDH1A1'in aldehit bağlama cebi içine bağlanmasını ve seçiciliklerini elde etmek için tek bir glisin kalıntısının varlığından faydalanmaları ile açıklanabilir. Bu iki yeni ve

seçici ALDH1A1 inhibitörü, ALDH1A1'in normal ve hastalık durumlarına katkılarını daha iyi anlamak için kimyasal araçlar görevi görebilir.

Wu *et al.* (2018) Temozolomid (TMZ) tedavisinin ALDH1A3 ekspresyonuyla olan ilişkisini inlelemişlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda TMZ tedavisi, ALDH1A3 proteinin seviyesini azaltmış ve bu down regülasyonun tümör hücrelerini kemoterapiye daha duyarlı hale getirdiğini ortaya koymuştur. Artan konsantrasyonlardaki TMZ ile birlikte otofaji artan yönde regülasyon göstermiş ve otofajozomlarda önemli bir bağdaştırıcı protein olan p62 ile ALDH1A3 arasında fiziksel bir etkileşim olduğuna dair bilgiler elde edilmiştir. ALDH1A3 proteininin otofaji ile down regülasyon gösterdiği bulunmuştur. Bulunan veriler glioblastomun doğrudan tedavi direncinde yer alan ALDH1A3'ün kemoterapi sırasında otofaji ile regüle edildiğini göstermiştir.

Arnold *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada testiste retinoik asit üretiminin çoğundan sorumlu olan ALDH1A enzimlerini (ALDH1A1 ve ALDH1A2) inhibe edip retinoik asit metabolizmasını ortadan kaldırarak spermatogenez etkileyen WIN18,446,10 inhibitörlerini belirlemişlerdir.

Chen *et al.* (2018) direkt bağlanma ve X-ışını kristalografisi çalışmalarını kullanarak insan ALDH1A2'sinin yapısal olarak ilgisiz geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz inhibitörlerinin etki mekanizmasını tanımlamaya çalışmışlardır. Çalışmada kullanılan tüm inhibitörlerin tetramerik ALDH1A2'nin aktif bölgelerine bağlandığını bulmuşlardır.

Dopamin metaboliti olan, 3,4-dihidroksifenil asetaldehit (DOPAL) ağırlıklı olarak ALDH ile detoksifiye edilmektedir. Fungisit benomil'in, fare striatumunda, *in vitro* PC12 hücrelerinde ve insan kültürü fibroblastlar ile glial hücrelerde, ALDH'ı potansiyel bir şekilde inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bunun sonucunda *in vivo* olarak DOPAL'ı oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle, ALDH'yi inhibe eden pestisitlere maruz kalmak, DOPAL birikimi yoluyla Parkinson hastalığı riskini artırabilir (Casida *et al.* 2014).

Liu *et al.* (2017) krosifer sebzelerden bir organosülfür bileşiği olan benzil izotiosiyanatı (BITC), mütajen hepatom Hepa1c1c7 hücreleri kullanarak ALDH aktivitesinin potansiyel bir uyarıcısı olarak değerlendirmişlerdir. BITC'nin sadece toplam ALDH aktivitesini değil aynı zamanda sitozolik / mikrozomal ve mitokondriyal fraksiyonun ALDH aktivitesini de arttırdığı gösterilmiştir. BITC ayrıca, konsantrasyona bağlı bir tarzda ALDH1A1, ALDH2 ve ALDH3A1'in gen ve protein ekspresyonunuda önemli ölçüde artırmıştır.

Alkol bağımlılığı tedavisinde ALDH2'nin inhibisyonu, küçük molekül tabanlı ilaçlar kullanarak gerçekleştirilen modern farmakolojik müdahalelerden önce, uzun bir geçmişe sahiptir. Antidipsotropik etkisi sebebiyle Kudzu (*Pueraria lobata*) 1000 yıldan uzun süredir geleneksel Çin tıbbında kullanılmaktadır. Daidzin ve daidzein, Kudzu'nun kökü ve çiçeklerinde tanımlanan iki aktif izoflavondur. Daidzin, ALDH2'nin katalitik bölgesine bağlanarak 80 nM IC₅₀ değeriyle ALDH2'nin güçlü ve geri dönüşümlü yarışmalı inhibitörü olma özelliği gösterir (Lowe *et al.* 2008). Disulfiram (Antabuse) bugüne kadar ALDH2'yi hedef alan ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış tek ilaçtır. Disulfiram ve onun metabolitleri, ALDH2 enziminin substrat bağlanma alanındaki katalitik Cys302'yi karbamilasyon yoluyla geri döndürülemez şekilde inhibe etmektedir (Lipsky *et al.* 2001).

Daidzin'in ile ALDH2'nin etkileşim gösterdiği kristal yapısına dayanılarak, diğer güçlü ALDH2 inhibitörleri tasarlanmaya çalışılmıştır. Daidzinin yapısal etkinlik ilişkileri çalışmalarına dayalı olarak geliştirilen CVT-10216'nın, güçlü bir ALDH2 inhibitörü (30 nM IC₅₀ değerine sahip ana molekül olan daidzin'den ~ 2-3 kat daha iyi) olduğu bulunmuştur (Overstreet *et al.* 2009). Bir başka yeni aldehit dehidrogenaz inhibitörü sınıfı 3-amino-l-fenilpropan-l-on'un yapısı ile karakterize edilmektedir. Enzim aracılı β-eliminasyon reaksiyonu nedeniyle, bir vinil keton ara maddesi olduğunda, bu inhibitörler, aktif bölgedeki sistein kalıntısını (Cys 302) kovalent olarak değiştirerek ALDH'ın enzimatik aktivitesini geri dönüşümsüz inhibe ederler (Khanna *et al.* 2011). Nitrogliserin güçlü bir ALDH2 inhibitörüdür ve nitrogliserinin tedavisine devam

edilmesi anjina hastalarında vazodilatasyon etkisine karşı duyarsızlığa neden olur (Ferreira and Mochly-Rosen 2012).

Farelerde yapılan bir araştırmada, klorpropamid veya tolbutamidin alkol ile birlikte uygulanmasının ardından farelerin karaciğer homojenatlarında ALDH2 inhibisyonun tespit edildiği, inhibisyon türünde geri dönüşümsüz olduğu ortaya konulmuştur. Klorpropamid'in tolbutamidine göre nispeten daha güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir. (Niederreither and Dolle 2008). Kronik yorgunluk sendromlu hastalarda yüksek triptofan düzeyleri, alkol bağımlılığını indüklendiği düşünölmüş ve bu düşünceden yola çıkarak muhtemel ALDH inhibitörleri triptofan metabolizmasında aranmıştır. Kinürenin yolundaki dört triptofan metaboliti, (3-hidroksikinürenin, 3-hidroksianthranilik asit, kinürenik asit ve indol-3-ilpiruvik asit) sıçan karaciğer mitokondriyal ALDH2'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Badawy and Morgan 2007). Molinat, sülfoksit türevi ve sülfon metabolitleri insan rekombinant ALDH2'yi *in vitro* inhibe ettiği gösterilmiştir. İnhibisyonun aktif bölgedeki sistein kalıntısının (Cys302) geri dönüşümsüz modifikasyonu ve tiokarbamat oluşumu yoluyla oluştuğu düşünölmektedir (Allen *et al.* 2010).

Saflaştırılmış ALDH2'nin fonksiyonuna karşı difenileniodonyum (DPI)'un etkileri araştırılmıştır. Moleküler modelleme ile DPI'nin ALDH2'nin aktif bölgesine bağlandığı ve enzimin dehidrogenaz ile esteraz aktivitelerine karşı yarışmalı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (Neubauer *et al.* 2013).

Doorn *et al.* (2006) 4-oksonon 2-enal (4ONE)'in insan ALDH2'ni bir substratı veya inhibitörü olup olmadığını belirlemeye ve 4- hidroksinon 2-enal (4HNE) ve 4ONE tarafından enzimin inhibisyon mekanizmasını aydınlatmaya çalışmışlardır. hALDH2 aktivitesi üzerine yapılan analizlerde hem 4ONE hem de oksidasyon ürünü 4ONEA'nın, enzimi güçlü ve geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Buna karşın, yüksek konsantrasyonda 4HNE (50 μ M) hALDH2'yi dönüşümlü olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır.

ALDH2 inhibisyonu için 111 tane bileşik seçilmiş ancak, ALDH2 enzimin dehidrogenaz aktivitesine bağlı olarak yüzde elliden fazla oranda inhibe eden beş tane bileşik bulunmuştur. IC₅₀ değerleri ALDH400, ALDH417, ALDH423, ALDH427 ve ALDH440 için sırasıyla 2,32, ~23, 0,62, 1,58, ve 3,51 µM olarak belirlenmiştir (Wang *et al.* 2014).

ALDH2 hücrelerin sağlığı için kritik bir öneme sahiptir ve oksidatif stres altında oluşan hasarlara karşı kalkan görevi görmektedir. Oksidatif stres sayısız insan patolojisi ile ilişkili olduğu için, ALDH2'nin katalitik aktivitesinin artırılması, oksidatif strese bağlı hücre ve organ fonksiyon bozukluğunu azaltmak ve dolayısıyla insan sağlığını desteklemek için yeni ve etkili bir araç sağlayabilir.

ALDH aktivatörü olarak yalnızca birkaç küçük molekül tespit edilmiştir. Buna örnek olarak Aldas denilen yeni bir molekül sınıfı verilebilir. Yüksek verimli taramaya dayalı bir floresans kullanılarak keşfedilmiştir. Alda-1 [N- (1, 3-benzodioxol-5-ilmetil) -2,6-diklorobenzamid, MW 324] *in vitro* ve *in vivo* olarak ALDH2'nin katalitik aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. ALDH2 enzimatik aktivitesini 4-HNE ile indüklenen inaktivasyona karşı korur ve yüksek bir 4-HNE konsantrasyonunun varlığında ALDH2'nin katalitik aktivitesini muhafaza edebilmektedir. Potansiyel klinik önemi olan Alda-1, ALDH2'nin E487K mutantının enzimatik aktivitesini etkili bir şekilde eski haline getirir. Alda-1, *ALDH2**2 homozigot enziminin katalitik aktivitesini 11 kat arttırdığı ve heterozigot enzimin aktivitesinin vahşi tip seviyelere getirdiği bulunmuştur (Chen *et al.* 2008).

ALDH2 enzimi aktif olmayan kişilerin de içki alışkanlığından fayda sağlayıp sağlamayacağı tartışmalıdır. Shen *et al.* (2017) ALDH2 eksikliğinin düşük ila orta şiddette alkol tüketimi ile ilişkili miyokardiyal değişiklikler üzerine etkisini incelemek üzere çalışmalar yapmışlardır. Yabani Tip (WT) ve ALDH2 nakavt (KO) fareleri, 6 hafta boyunca düşük-orta derecedeki alkole (EtOH) maruz bırakıldı. Yabani tip etanol grubundaki farelerde kardiyak fonksiyonu daha fazla iyileştirmemekte ya da reaktif oksijen türlerini (ROS) seviyesini düşürmese de yüksek yoğunluklu lipoprotein-

kolesterol seviyeleri (HDL-c) ve heme oksijenaz-1'in (HO-1) ekspresyonu anlamlı olarak yükselmiştir. Buna rağmen, etanole maruz bırakılmış nakavt farelerde sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun azalmasıyla kardiyak fonksiyon baskılanmıştır. Bulunan bu sonuçlara göre ALDH2, düşük ile orta dereceli alkol kullanımının olumlu kardiyak etkileri için vazgeçilmezdir ve ALDH2 eksikliği, miyokardiyal apoptozu ve nekroptozu arttırarak beklenmedik kardiyak işlev bozukluğuna neden olabilir.

Song *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada rutin, hipokampal nöronlarda (HT22 hücreleri) ALDH2 aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Rutinin koruyucu etki mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için ALDH2 inhibitörü olan Daidzin kullanılmıştır. Rutin tedavisinden sonra hücre canlılığı önemli derecede artmıştır. Rutin HT22 hücrelerinde Bax, sitokrom c ekspresyonu ve kaspaz 3 aktivitesini artırarak; Bcl-2 ve Bcl-xL protein ekspresyonu ise azaltarak etanol artışını tersine çevirmiştir. Rutin, ALDH2 ekspresyonunu arttırırken, daidzin bu yararlı etkiyi baskılamıştır. Bu nedenle, bu çalışma, rutin ALDH2 aktivitesini arttırarak HT22 hücrelerini etanol kaynaklı nörotoksositeye karşı koruduğunu göstermektedir.

Laskar *et al.* (2017) bu çalışmada insan tükürük aldehid dehidrojenaz (hsALDH) üzerine Timokinonun (TQ) etkisi ve kinetiği incelenmiştir. TQ'nun enzime bağlanması, farklı biyofizik yöntemler ve moleküler yerleştirme analizi ile incelenmiştir. TQ saflaştırılmış hsALDH'nin dehidrojenaz aktivitesini 2,9 kat arttığı esteraz aktivitesinde 1,2 kat arttığını bulmuşlardır. TQ'nun, enzimin K_M 'sini azalttığı V_{max} 'ını ise arttığını belirlemişlerdir. Katalitik sistein kalıntısının nükleofilik özelliğinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. TQ'nin, ağız boşluğundaki toksik aldehitlere karşı daha iyi koruma sağlaması ve hsALDH'nin aktivasyonu yoluyla ağız kanseri gelişme riskini azaltmaktadır. Dolayısıyla, diyet ve diğer oral formülasyonlarda TQ'nun eklenmesinin sağlığa yararlı olması beklenmektedir.

Laskar *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada kafeinin tükürük ALDH etkinliğini etkilediği bulmuşlardır. Bu çalışmada kafeinin hsALDH'nin aktivitesi (dehidrojenaz ve esteraz) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kafeinin hsALDH'ye bağlanması, farklı biyofiziksel

yöntemler ve moleküler yerleştirme analizi kullanılarak incelenmiştir. Kafein saflaştırılmış hsALDH'yi inhibe ettiği bulunmuştur. İnhibisyon tipi karışık olarak belirlenmiştir. Kafein enzimin katalitik sistein kalıntısının nükleofilik özelliğini azaltmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Sarf edilen kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada sarf edilen kimyasallar ve markaları

Kimyasal Adı	Marka
Akrilamid	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Asetik asit	E.Merc AG
Brom timol mavisi	E.Merc AG
Coomassie brillant blue G-250	Sigma
Coomassie brillant blue R-250	Sigma
DNAz	Sigma
dNTP	Sigma
Fosforik asit	E.Merc AG
Gene spesifik primerler	Metabion
Gliserol	E.Merc AG
Glisin	E.Merc AG
Hidroklorik asit	E.Merc AG
IPTC	Promega
İmidazol	Sigma
İnsan beyin cDNA'sı	Invitrogen
İzopropanol	E.Merc AG
Kanamisin sülfat	Sigma
Lizozim	Sigma
LB Agar (Luria Bertani Agar)	Sigma
LB Broth (Luria Bertani Broth)	Sigma
MgCl ₂	Sigma
TEMED (N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin)	Sigma
NaH ₂ PO ₄	Sigma

Çizelge 3.1. (devam)

pET SUMO protein ekspresyon kiti	Invitrogen
p-Nitrofenol (PNF)	Sigma
Protein Marker	BioRad 0375
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Sigma
Sodyum hidroksit	E.Merc AG
Sodyum klorür	E.Merc AG
Standart sığır serum albumin (BSA)	Sigma
Taq DNA polimeraz	Sigma
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	E.Merc AG
β -Merkaptoetanol	E.Merc AG

İnhibisyonda kullanılan antibiyotikler Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi'nden temin edilmiştir.

3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Otoklav	: Hirayama HV-50L
İnkübatör	: Binder
PCR cihazı	: Bio Rad
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	: Edmund Bühler GmbH KS-15
Agaroz jel elektroforezi	: Thermo EC 135-90 (yatay)
Jel Görüntüleme	: Vilber Lourmat-ECX-20-M
Thermocycler	: Bio Rad C-1000 Thermal Cycler
Mikrodalga Fırın	: Beko MD-1500
Isı Blokları	: Lab-Line, VWR Digital Heatblock
Steril Kabin	: Telstar Bio-II-A

Mikro santrifüj	: Hettich Zentrifugen
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter DU 730
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez Tankı	: Bio Rad (dikey)
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025, Zhicheng ZHWY-200-D
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisonswhirli-mixer, WiseMix VM-10
Karıştırıcı (Dikey)	: Hybaid Midi Dual 14
Hassas teraziler	: Gecavery (UK), Denver Instrument
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Peristaltik pompa	: İsmatec
Magnetik karıştırıcı	: Chilten Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/U
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer, Uğur
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Thermo

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Besiyeri ve agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri (pH:7, 500 mL)	Boş bir otoklav şişesine 20 gr LB Broth besiyeri ve 1 g D (+) glukoz tartıldı. Bu karışım 1000 mL saf suda çözdürüldü. Daha sonra bu karışım otoklavlandı. Hazırlanan besiyerine antibiyotik katılmadan önce çözeltinin otoklav sonrası ~55°C'ye soğuması beklendi ve antibiyotik (kanamisin sülfat) ilavesi yapıldı. Daha sonra ağzı kapalı bir şekilde +4°C'ye alındı.
Antibiyotikli katı LB besiyerleri	Daha önce anlatıldığı gibi sıvı ortamdan farklı olarak içerisinde agar bulunan besiyeri otoklavlandı. Sıcaklık 40°C civarına düşmesi ile pET-SUMO vektörün kullanım protokolüne uygun olarak ortama 50 µg/mL kanamisin eklendi. 85 mm'lik petri kaplarına 20-25 mL'lik katı besiyerinden döküldü. Agar sertleşinceye kadar beklenildi ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.
Kanamisin stok çözeltisi (1 mg/mL)	10 mg kanamisin alınarak 10 mL steril saf suda çözüldü. 0,2 µm'lik filtre ile steril edildikten sonra alüminyum folyoya sarılıp +4°C'de saklandı.
1X TAE tamponu	40 mM Tris, 5 mM sodyum asetat, 1 mM EDTA (pH=8,0) olacak şekilde dH ₂ O kullanılarak 1 litre tampon hazırlandı.
%1'lik agaroz jel	0,3 gram agaroz tartıldı üzerine 30 mL 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu eklendi. Kısa bir süre mikrodalga fırın içerisinde ısıtılmaya bırakıldı. Oda sıcaklığında bir süre soğuduktan sonra üzerine son konsantrasyon 5 µg/ml olacak şekilde etidyum

bromür ilave edilip karıştırıldı. Elektroforez tankına döküldükten sonra vakit kaybetmeden taraklar yerleştirilip donmaya bırakıldı.

3.3.2. Doğal şartlar altında saflaştırmada kullanılan çözeltiler

Lizis Tamponu (50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, %0,1 Triton-X100, %10 gliserol, 1mM DTT pH 8,0)	Taze olarak kullanılması daha sağlıklı olacağı için küçük hacimlerde hazırlandı. 0,3 g NaH ₂ PO ₄ , 1,46 g NaCl, 0,0077 g DTT, 3 M pH 6,0 olan imidazol çözeltisinden alınan 166,66 µl imidazol, 50 µl Triton-X100 ve 5 ml gliserol 30 ml saf su içerisinde karıştırıldı. pH 8,0'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
IPTG stok çözeltisi (50 mM)	0,6 g IPTG alınarak, son hacim 50 mL olacak şekilde üzerine steril saf su ilave edildi. 0,2 µm'lik filtre ile steril edildikten sonra alüminyum folyoya sarılıp +4°C'de saklandı.
3 M imidazol çözeltisi	20,42 g imidazol, 2,93 g NaCl, 0,24 g NaH ₂ PO ₄ alınıp 80 mL saf suda çözüldü. pH 6,0'a ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL'ye tamamlandı. İmidazol bileşiğinin çözünmesi zor olduğundan 40-50°C'de ısıtıldı.
5X Doğal Saflaştırma Tamponu	7,0 g NaH ₂ PO ₄ ve 29,2 g NaCl 180 mL deiyonize suya ilave edilip pH'sı 8,0'e ayarlandı. Son hacimde 200 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklandı.
1X Doğal Saflaştırma Tamponu	5X Doğal Saflaştırma Tamponundan 20 mL alınarak son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
Doğal Dengeleme Tamponu	30 mL 1X doğal saflaştırma tamponu bağlanma tamponu olarak kullanıldı.

Doğal Yıkama Tamponu	50 mL 1X doğal saflaştırma tamponuna 335 µl 3 M imidazol (pH 6,0) ilave edilerek pH'sı 8,0'e ayarlandı.
Doğal Elüsyon Tamponu	13,75 mL 1X doğal saflaştırma tamponuna 1,25 mL 3 M imidazol (pH 6,0) ilave edilerek pH'sı 8'e ayarlandı.
Diyaliz Tamponu (5 mM NaH₂PO₄ pH=8,0)	0,3 gr NaH ₂ PO ₄ belli bir miktar saf su içerisinde karıştırıldı. pH=8,0 yapıldı. Daha sonra saf su ile son hacim 500 mL'ye tamamlandı.
Protein tayin çözeltisi	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözöldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.

3.3.3 hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimlerinin aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

Tampon çözelti (0,5 M Tris-HCl pH=8,0)	6,06 g tris alınarak 90 mL saf suda çözöndü. pH=7,5'a ayarlandıktan sonra son hacim saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
5,0 mM β-NAD⁺ çözeltisi	0,0165 g β-NAD ⁺ alındı 5 mL saf suda çözöndü.
4,0 mM all trans retinal çözeltisi	0,00057 g all trans retinal alındı 5 mL etanolde çözöndü.

3.3.4. hALDH2 enziminin aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler

Tampon çözelti (250 mM KH₂PO₄ pH=7,5)	3,4 g KH ₂ PO ₄ alınıp 90 mL saf suda çözöndü. pH=7,5'a ayarlandıktan sonra son hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.
10 mM β-NAD⁺ çözeltisi	0,033 g β-NAD ⁺ alındı 5 mL saf suda çözöndü.

4,0 mM <i>p</i>-NPA	0,018 g <i>p</i> -NPA alındı 1 mL asetonda çözüldü. Karışım 24 mL saf suya manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı.
100 mM MgCl₂ çözeltisi	0,095 g MgCl ₂ alındı 10 mL suda çözüldü.

3.3.5. SDS-PAGE ve Western blot işleminde kullanılan çözeltiler

1 M Tris-HCl (pH=8,8)	12,11 g Tris (0,1mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
1 M Tris-HCl (pH=6,8)	12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
%30 Akrlamid- %0,8 Bisakrilamid çözeltisi	15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
%10'luk amonyum persülfat çözeltisi	1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.
%10'luk SDS	1 g SDS 9 g suda çözümlenerek elde edildi.
Yürütme tamponu	1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.
Numune tamponu	1 M Tris-HCl (pH=6,8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.
Ayrırma Jelinin Hazırlanması	5 ml 1 M Tris-HCl pH=8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamid- %0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,13 ml

	TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 mL %10'luk PER [amonyum persülfat, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈] eklendi.
Yığma Jelinin Hazırlanması	0,41 ml 1 M Tris-HCl pH=6,8, 0,44 mL %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10'lik SDS, 0,03 ml TEMED ve 2,45 mL saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,04 mL %10'luk PER eklendi.
10X Transfer Çözeltilisi	29,0 g Glisin, 58,0 g Tris, 3,7 g SDS 900 mL destile su içerisinde çözüldü ve pH 8,3'e ayarlandıktan sonra son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.
10X TBS	80 g NaCl, 2 g KCl ve 30 g Tris 900 mL destile su içerisinde çözüldü. 1M HCl ile pH 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı. Otoklav edildikten sonra kullanıma hazır hale getirildi.
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ tartıldı. 1 litre saf su eklendikten sonra 1 mL Tween-20 eklenir.

3.3.6. Jelin Coomassie Brilliant Blue (CBB) ile boyanması işleminde kullanılan çözeltiler

Sabitleştirme çözeltisi	%50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
Boyama çözeltisi	50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su içerisinde 0,1 g Coomassie Brillant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

Yıkama çözeltisi	50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su olacak şekilde hazırlandı.
-------------------------	-------------------------------------------------------------------------

3.3.7. Jelin gümüş boyama yöntemi ile boyanmasında kullanılan çözeltiler

Tespit çözeltisi (1 jel için)	30 mL saf su, 15 mL %96'lık etanol, 5 mL asetik asit karıştırılarak hazırlandı.
Redüksiyon çözeltisi (1 jel için)	2,4 g Sodyum asetat, 22,5 mL etanol ve 40 mL saf su karıştırıldı, pH=6,0'ya asetik asit ile ayarlandıktan sonra 75 mg sodyum tiyosülfat, 1,5 mL glutaraldehit eklenerek toplam hacim saf su ile 75 mL'ye tamamlandı
Boyama çözeltisi (1 jel için)	50 mg gümüş nitrat, 50 mL saf su, 15 µL formaldehit karıştırılarak hazırlandı.
Yıkama 1 çözeltisi (1 jel için)	1,88 g sodyum karbonat, 135 mL saf su ve 60 µL formaldehit karıştırılarak hazırlandı.
Yıkama 2 çözeltisi (1 jel için)	0,5 mL gliserin ve %5'i asetik asit olan 125 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

3.4. Moleküler Biyolojik Metotlar

3.4.1. Primerlerin hazırlanması

ALDH1A1 genine özgü reverse ve forward primer <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sayfasından *Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 (ALDH1A1), mRNA* (Nucleotide- NM_000689.4) transkriplerinin cDNA dizilerine uygun olarak dizayn edildi. ALDH1A3 genine özgü reverse ve forward primer aynı web sitesinden *Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family member A3 (ALDH1A3), transcript variant 1* (NM_000693.3) transkriplerinin cDNA dizilerine uygun olarak dizayn edildi. ALDH2 genine özgü reverse ve forward primer aynı web sitesinden *Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) (ALDH2), transcript variant 2,*

mRNA (Nucleotide- NM_001204889.1) transkriplerinin cDNA dizilerine uygun olarak dizayn edildi. Genlere spesifik protein kodlama bölgeleri tespit edildi. Primerler ise protein kodlama bölgesini hem baştan hemde sondan bütün gen bölgesini tam kapsayacak biçimde seçildi.

Tasarlanan primerlerin, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın ve nükleotidlerin dağılımının olabildiğince eşit olmasına dikkat edildi. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> web sayfası kullanılarak dizayn edilen primerler blastlandı. Böylelikle seçilen primerlerin başka bir gene spesifik diziyi de amplifiye edip etmeyeceği belirlenmiş oldu. Bundan sonra, <http://eu.idtdna.com> adresinden yararlanılarak kullanılacak spesifik primerlerin Tm sıcaklıkları belirlendi.

3.4.2. ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 genlerine ait cDNA sekansının çoğaltılması polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)

cDNA sekansının amplifikasyonu için oluşturulan reverse ve forward primerler ile uygun PCR protokolü uygulanarak ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 genlerine ait sekans çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.2. ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 genlerine ait PCR karışımı

PCR Bileşeni	Kullanılan Miktar (µl)
dH ₂ O	7,3
Primer R (10 pmol)	0,5
Primer F (10 pmol)	0,5
Tampon (10X)	1,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,3
dNTP (10 mM)	0,8
Taq Polimeraz (5 u/µl)	0,25
cDNA	2 (1:10 seyreltilmiş)
Toplam Reaksiyon Hacmi	14 µl

Çizelge 3.3. ALDH1A1 geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 4 dk / 1
Denatürasyon	94°C / 1 dk / 35
Yapışma (Annealing)	59,5°C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72°C / 1 dk / 35
Son Uzama	72°C / 5 dk / 1
Bekleme	+4°C ∞

Çizelge 3.4. ALDH1A3 geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 4 dk / 1
Denatürasyon	94°C / 1 dk / 35
Yapışma (Annealing)	60°C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72°C / 1 dk / 35
Son Uzama	72°C / 5 dk / 1
Bekleme	+4°C ∞

Çizelge 3.5. ALDH2 geninin amplifikasyonu için PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94°C / 4 dk / 1
Denatürasyon	94°C / 1 dk / 35
Yapışma (Annealing)	61°C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72°C / 1 dk / 35
Son Uzama	72°C / 5 dk / 1
Bekleme	+4°C ∞

3.4.3. DNA agaroz jel elektroforezi

DNA elektroforezi için yatay jeller kullanıldı ve 60 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat örnekler yürütüldü. Elektroforez tamponu olarak 1xTAE tercih edildi. Agaroz jelle son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür (EtBr) ilave edildi. DNA'yı izleme boyası olarak bromfenol mavisi kullanıldı. Çalışmada %1'lik konsantrasyonda agaroz jel kullanıldı. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için farklı büyüklüklerde DNA belirleyiciler kullanıldı. Elektroforez sonuçları UV jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.4.4. Rekombinant vektörün elde edilmesi

Klonlama işlemi, DNA molekülleri ile Tag DNA Polimeraz enzimi arasında fosfodiester bağının oluşturulmasıyla gerçekleştirildi. Bu tepkimenin oluşması için klonlanmak istenen gen ile komplementer uçlara sahip plasmid DNA'nın ortamda bulunması gerekmektedir. Ortamda bulunan vektörün ve genin derişimi ligasyon tepkimesinde oldukça önemlidir. DNA fragmentlerinin büyüklüğüne bağlı olarak genin ve vektörün derişimleri değişiklik göstereceğinden bunlar optimize edilmelidir (Bloom *et al.* 1996). Bu hususlar dikkate alınarak uygun şartlarda ligasyon işlemi yapıldı. Bunun sonucunda rekombinant vektör elde edildi.

Çizelge 3.6. Ligasyon işlemi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Kullanılan Miktar (µl)
PCR Ürünü	3,0
SUMO vektör	2,0
Ligaz Buffer	2,0
T4 Ligaz	1,0
dH ₂ O	2,0

3.4.5. Rekombinant vektörün kompetent hücelere transformasyonu

Bu basamakta pET SUMO sistemi protokolü takip edildi;

- 80°C’de saklanan *E.coli* One Shot® Mach1™-T1R buzda yavaş bir biçimde çözündürüldü. Üzerine 2 µL ligasyon ürünü eklendi.
- 30 dakika buzda inkübe edildi.
- Buzda inkübasyondan sonra bakteri hücreleri 42°C’de 30 saniye bekletildi.
- Bakteri hücreleri hemen tekrar buza konuldu.
- Buza alınan tüpe steril kabinde 250 µL S.O.C. besiyerinden eklenildi.
- Tüpün ağzı sıkıca kapatılarak, 37°C’de 200 rpm de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra ürün, 100 µL ve 200 µL olacak şekilde antibiyotik bulunduran 2 ayrı petriye yayma işlemi yapıldı.
- Petrilerdeki ürünlerin büyümeleri için petriler 37°C’de bir gece inkübe edildi.

3.4.6. Koloni PCR

Bu işlem rekombinant vektör taşıyan kolonileri belirlemek amacıyla ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 için tasarlanmış primerlerle yapıldı. Transformasyon sonrası oluşan kolonilerden rastgele koloni belirlenip numaralandırıldı. Kalıp DNA olarak mikro pipet ucuyla alınan koloniler kullanıldı. Bu işlemde sonra PCR ürünleri agaroz

jel elektroforezi ile markır'a karşı yürütüldü. Pozitif çıkan kolonilerden daha sonra vektöre ait ileri ve geri primerler kullanılarak kontrol PCR'ı yapıldı.

Çizelge 3.7. Koloni PCR reaksiyon karışımı

PCR Bileşeni	Kullanılan Miktar (µl)
dH ₂ O	7,3
Primer R (10 pmol)	0,5
Primer F (10 pmol)	0,5
Tampon (10X)	1,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,3
dNTP (10 mM)	0,6
Taq Polimeraz (5 u/µl)	0,3
cDNA	Tek koloni
Toplam Reaksiyon Hacmi	≈12 µl

Çizelge 3.8. hALDH1A1 için koloni PCR reaksiyon şartları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94 °C / 10 dk / 1
Denatürasyon	94 °C / 1 dk / 35
Yapışma (Annealing)	59,5 °C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72 °C / 1 dk / 35
Son Uzama	72 °C / 5 dk / 1
Bekleme	+4 °C ∞

Çizelge 3.9. hALDH1A3 için koloni PCR reaksiyon şartları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94 °C / 10 dk / 1
Denatürasyon	94 °C / 1 dk / 35
Yapışma (Annealing)	60 °C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72 °C / 1 dk / 35
Son Uzama	72 °C / 5 dk / 1
Bekleme	+4 °C ∞

Çizelge 3.10. hALDH2 için koloni PCR reaksiyon şartları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön Denatürasyon	94 °C / 10 dk / 1
Denatürasyon	94 °C / 1 dk / 35
Yapışma (Annealing)	61 °C / 30 sn / 35
Uzama (Extension)	72 °C / 1 dk / 35
Son Uzama	72 °C / 5 dk / 1
Bekleme	+4 °C ∞

3.4.7. Plazmid izolasyonu

Koloni PCR'ın ardından rekombinant vektörü aldığı doğrulanan koloniler seçilerek bir gece LB sıvı besiyerinde büyütüldü. Bu besiyerlerinden daha sonra çapraz PCR yapmak ve ekspresyon konağına transforme etmek için rekombinant vektör izole edildi. İzolasyon için DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (17096, IntronBio) kullanıldı. İzolasyon aşağıda belirtilen şekilde yapıldı;

Bir gece 37°C'de LB ortamında büyütülmüş besiyerinden 1-5 ml alınıp 13000 rpm'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı.

1. Pelet üzerine 250 µl Resuspension Solution eklenip çözdürüldü.

2. Daha sonra 250 µl Lysis Solution eklenip hafifçe 10 kez tersyüz edildi. Oda sıcaklığında 3 dakika beklendi.
3. Yine aynı tüpe 350 µl Neutralization Buffer eklenip hafifçe tersyüz edildi. 5 dakika buzda bekletildi.
4. 10 dk 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Sıvı faz spin kolonuna transfer edildi.
5. Kolon takılı tüp 13000 rpm'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım atıldı.
6. Kolon üzerine saf etanol eklenmiş 700 µl Wash Solution bırakıldı.
7. 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Alta geçen sıvı kısım altıldı.
8. Aynı kolon bu sefer bir şey eklenmeden etanolün uzaklaştırılması için 1 dk boş santrifüj edildi.
9. Kolon yeni bir tüpe alındıktan sonra kolon merkezine 50 µl Elution Buffer eklendi. 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dk santrifüj edildi.
10. Kolon atıldıktan sonra plasmid içeren elüsyon sıvısı -20°C'de saklandı.

3.4.8. Çapraz Kontrol PCR Reaksiyonu

SUMO sisteminde A-T klonlama yapıldığı için gen ürünü bazen ters bir şekilde bağlanabilmektedir. İzolasyon sonrası elde edilen plazmitlerden PCR yapılarak genin vektöre doğru bir şekilde bağlanıp bağlanmadığı kontrol edildi. Bu işlemlerde vektör için primer olarak Çizelge 3.11'da belirtilen ve ekspresyon kiti ile ticari olarak temin edilen primerler kullanıldı. Koloni PCR'da pozitif sonuç veren kolonilerden izole edilen plazmitlerin kalıp DNA olarak kullanıldığı 4 farklı PCR kombinasyonu Çizelge 3.12-14'de belirtilen şekilde tasarlandı.

Çizelge 3.11. SUMO vektörüne ait primer bilgileri

Primer	Sekans (5'-3')	Tm	Uzunluk (bp)
SUMO Forward	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG	60	23
T7 Reverse	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	60	20

Çizelge 3.12. ALDH1A1 için plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları

Reaksiyon	Kalıp DNA	Forward primer	Reverse Primer	Uzunluk (bp)
1	Plazmit	Genin kendi primerleri		1505
2	Plazmit	Vektör	Gen	1610
3	Plazmit	Gen	Vektör	1658
4	Plazmit	Vektör	Vektör	1763

Çizelge 3.13. ALDH1A3 için plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları

Reaksiyon	Kalıp DNA	Forward primer	Reverse Primer	Uzunluk (bp)
1	Plazmit	Genin kendi primerleri		1538
2	Plazmit	Vektör	Gen	1643
3	Plazmit	Gen	Vektör	1691
4	Plazmit	Vektör	Vektör	1796

Çizelge 3.14. ALDH2 için plazmitten yapılan kontrol PCR reaksiyonları

Reaksiyon	Kalıp DNA	Forward primer	Reverse Primer	Uzunluk (bp)
1	Plazmit	Genin kendi primerleri		1412
2	Plazmit	Vektör	Gen	1517
3	Plazmit	Gen	Vektör	1565
4	Plazmit	Vektör	Vektör	1670

3.4.9. Pozitif sonuç veren bakterilerin gliserolde stoklanması

Bu aşamada doğru vektörü alan koloniler daha sonra tekrar kullanılmak üzere stoklandı. Bunun için tüm PCR kontrollerinde pozitif sonuç veren koloniler sıvı LB ortamında büyütüldükten sonra üzerlerine %15'lik gliserol eklenildi. Gliserol+hücre karışımı

alikuatlara ayrıldıktan sonra sıvı azot içerisinde ani dondurma işlemine tabi tutularak ardından hemen -80°C 'ye alınıp stoklandı

3.4.10. Rekombinant plazmidin konağa transformasyonu

Bu aşamanın gerçekleştirilmesinde yine pET SUMO sisteminde önerilen yol takip edilmiştir;

Bu aşamanın gerçekleştirilmesinde pET-SUMO protokolü kullanılmıştır;

- a. -80°C 'de saklanan *E.coli* BL21(DE3) One Shot® buzda yavaş yavaş çözündürüldü.
- b. Çözündükten sonra hücrelere $10\ \mu\text{L}$ plazmid eklendi.
- c. Bakteri ~ 30 dk buzda inkübasyona bırakıldı.
- d. 30 saniye 42°C 'de bekletilip daha sonra hemen buza alındı.
- e. Buza alınan tüpe steril kabinde $250\ \mu\text{L}$ S.O.C. besiyerinden eklenildi.
- f. Tüpün ağzı sıkıca kapatılarak, 37°C 'de 200 rpm de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- g. İnkübasyondan sonra ürün, $10\ \text{mL}$ LB sıvı besiyerine $50\ \mu\text{L}$ kanamisin bulunan tüpe alındı ve 37°C 'de 200 rpm de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

3.4.11. Pilot (Deneme) ekspresyon

Rekombinant vektöre transforme olmuş hücrelerin fazla miktarda sıvı besiyerinde büyütüldüğü ve indükleyici bir ajanla ekspresyon seviyesinin etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla izlenen yol şu şekildedir;

1. İki adet otoklav şişesine $200\ \text{mL}$ LB sıvı besiyeri hazırlandı ve otoklavlandı.
2. Otoklav sonrası her bir ortama 1'er mL kanamisin eklendikten sonra 5'er mL transformasyona uğratan hücre eklendi. Şişenin ağzı pamukla tıkandı.
3. 37°C 'de 2,5 saat çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.

4. Şişelerin birine hiçbir şey eklenmedi. Diğer şişeye 1 mM konsantrasyona sahip IPTG eklenildi.
5. IPTG eklenen şişeden 2 saatte bir olacak şekilde numune alındı. Alınan örnekler santrifüj edildi ve süpernatant atılırken pelletler -20°C 'ye konuldu.

3.4.12. Pilot ekspresyon sonrası hücrelerin parçalanması

Liziz işlemi için toplanan örneklerden elde edilen pelletler üzerine uygun miktarda liziz tamponu eklendikten sonra yavaş yavaş erimesi beklenmiştir. Örnekler 3 defa sıvı azotla dondurulup 42°C de çözüldü. 4°C 'de $23000 \times g$ 'de 5 dakika numuneler santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve peletler western blot yöntemiyle ekspresyon işlemini teyit etmek için saklandı.

3.4.13. Western blot analizi

Nükleik asitlerin veya proteinlerin elektriksel yük karakterlerinden yararlanılarak uygun hareket ettirildikten sonra bir destek materyaline transfer edilip göreceli olarak miktarlarının belirlendiği tekniğe genel olarak blotlama adı verilmektedir. Söz konusu moleküllerden proteinlerin kalitatif veya kantitatif tayinine yardımcı olan western blot yöntemi ile hücre veya doku lizati gibi karmaşık ortamlarda spesifik proteinlerin kolay ve kesin bir şekilde ayırt edilmesi söz konusudur. Yöntem;

1. Karışımdaki proteinlerin SDS poliakrilamid jel lektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül kütlelerine göre ayrılmasını takiben nitroselüloz veya PVDF membran üzerine transfer edildiği blotlama basamağı,
2. Membran üzerinde protein bulunmayan bölgelerin maskelendiği bloklama basamağı,
3. Hedef proteine afinite gösterebilecek antikorlarla inkibasyon basamağı,
4. Antikorla hibridizasyon sonrası membrandaki proteinlerin sahip olduğu moleküler ağırlık ve kısmi miktarının belirlenmesi için farklı yöntemlerle görüntüleme basamağı olmak üzere 4 temel işlemten oluşmaktadır (Erdoğan vd 2014).

Proteinin molekül kütlesine göre ayırımının yapılabilmesi için ayırma (Çizelge 3.15) ve yığma (Çizelge 3.16) olmak üzere iki kısımdan oluşan denatüre edici bir jel yapıldı. Çalışmada 15 mL %12'lik ayırma jeli ve 4 ml yığma jeli hazırlandı. İlk olarak ayırma jeli iki cam plaka arasına döküldü. Oluşan hava kabarcıkları izopropanol kullanılarak engellendi. Yaklaşık 15-20 dk polimerizasyon beklendikten sonra jel ters çevrilerek izopropanol uzaklaştırıldı ve yığma jeli yüklenip tekrar polimerize olmasına izin verildi.

Çizelge 3.15. SDS jel Elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri

Jel Yüzdesi	%6	%8	%9	%10	%12
Didestile Su	7,9 ml	6,9 ml	6,45 ml	5,9 ml	4,9 ml
%30 Akrilamid	3 ml	4 ml	4,5 ml	5 ml	6 ml
1 M Tris pH:8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
%10 SDS	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
%10 Amonyum persülfat	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	0,012 ml	0,009 ml	0,075 ml	0,006 ml	0,006 ml
Toplam	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml

Çizelge 3.16. SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme jeli değerleri

Toplam	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
Didestile Su	0,68 ml	1,4 ml	2,1 ml	2,7 ml	3,4 ml
%30 Akrilamid	0,17 ml	0,33 ml	0,5 ml	0,67 ml	0,83 ml
1M Tris pH:6,8	0,13 ml	0,25 ml	0,38 ml	0,5 ml	0,63 ml
%10 SDS	0,01 ml	0,02 ml	0,03 ml	0,04 ml	0,05 ml
%10 Amonyum persülfat	0,01 ml	0,02 ml	0,03 ml	0,04 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,002 ml	0,003 ml	0,004 ml	0,005 ml

1X SDS yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler 95°C'de 10 dk kaynatılıp 10 dk buzda bekletildi. Jel ve numuneler hazırlandıktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirilip tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Numuneler yüklendikten sonra ilk önce 30 dk 50 voltta daha sonra 90 dk 120 voltta yürütüldü.

Yürütme işleminden sonra jel kasetinden çıkarılan jelin yığıma jeli kısmı kesilerek uzaklaştırıldı. Ayrıma jeli transfer tamponu içerisine bırakıldı. Transfer membranı 5 dk metanol ve 5 dk 1X transfer çözeltisi ile muamele edildi. Blotlama cihazına sırasıyla 2 parça blot kağıdı, membran ve yine 2 parça blot kağıdı bırakılıp transfer çözeltisi ile iyice ıslatıldı. Cihaz kapatılıp 1 watt elektriksel alan altında 75 dk blotlama işlemi yapıldı.

Blotlamanın ardından PVDF membran 10 dk PBS ile yıkandı. 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi olarak %5'lik yağsız süt tozu (skim milk powder) ile muamele edilip 4°C'de 1 gece antikor ile inkübasyona bırakıldı. Membran 5 kez 5 dk PBS ile yıkandı. Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlandı. Son olarak membranın filmi çekildi.

3.5. Biyokimyasal Metotlar

3.5.1. Bakteri hücre lizatının hazırlanması

1. IPTG ile indüklenmiş 500 ml'lik kültür 8000 xg 'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Çökelekler uzaklaştırılarak üzerine 8 ml liziz tamponu ilave edildi.
3. Üzerine 8 mg lizozim eklenerek 30 dakika buzda inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonucunda buz içerisinde 20 saniye sonikasyon 40 saniye bekleme olarak şekilde sonikasyon işlemi yapıldı. Bu işlem 4-5 kere tekrar edildi.
5. Lizat 8000 xg 'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

3.5.2. Doğal şartlar altında kolondan rekombinant proteinlerin saflaştırılması

3.5.2.1. ProBond™ kolonun hazırlanması

Protein saflaştırması, bir karışımdan tek bir tip proteininin izole edilmesi için izlenen bir süreçtir. İlgili proteinin işlevi, diğer proteinlerle etkileşimi ve yapısının kimliklendirilmesi için bu proteinin saflaştırılması şarttır (Waugh 2005). Rekombinant

proteinler, farklı kromatografi teknikleri kullanılarak saflaştırılırlar. Rekombinant proteinler genelde afinite kromatografisi ile izole edilebilir (Li *et al.* 2004). Yöntem genelde doku veya mikrobiyal bir kültür gibi birden fazla protein içerebilecek kaynaklar için kullanılır. Çeşitli adımlar sonucunda ilgili protein bulunduğu ortamdaki diğer protein ve protein olmayan bileşenlerden tamamen ayrılır. Ayırıştırma basamağında proteinlerin sahip olduğu fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerden yararlanılır. Proteinin üretimini sağlayan vektörlerde bulunan ekstra aminoasitler kolayca tanınmayı sağlayan afinite kuyruğu olarak görev yaparlar (Young *et al.* 2012). Bu kuyruğa sahip olmayan protein ve diğer moleküller kolona tutunmadan geçerler. Hedef proteinin kolonla olan ilişkisini bozacak bir çözelti eklendiği zaman bu protein artık tutunamayacak ve kolondan ayrılacaktır.

Nikel şelatlayıcı reçine 6Xhis-tag'a sahip vektörlerin; bakteri, böcek ve memeli hücrelerinde eksprese edilmiş rekombinant proteinin saflaştırılması amacıyla kullanılır. Bu reçine 6Xhis-tag'a sahip rekombinant füzyon proteinleri için yüksek seçicilik sağlar. Nikel şelatlayıcı reçinelerde ligant olarak Ni^{+2} ile üçlü koordinasyon bölgesi oluşturan iminodiasetik asit (IDA), dörtlü koordinasyon bölgesi oluşturan nitriloasetik asit (NTA) ve beşli koordinasyon bölgesi oluşturan tris karboksimetiletilediamin (TED) kullanılmaktadır.

Rekombinant proteinin doğal şartlar altında saflaştırılması için öncelikle kolon materyali hazırlandı. Bu işlem için; 10 mL'lik saflaştırma kolonuna 2 mL ProbondTM nikel şelatlayıcı reçine dökülerek kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. 6 mL steril saf su ilave edilip reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspansiyon edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı.

Doğal şartlar altında saflaştırma için 6 mL doğal bağlanma tamponu ilave edildi. Reçine ters çevrilerek ve kolona hafifçe vurularak yeniden süspansiyon edildi. Reçinenin yer çekimi ile kolona yerleşimi sağlandıktan sonra üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Son işlem tekrarlandı.

3.5.2.2 Ni-NTA afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Ekspresyon sonucunda elde edilen pelletler lizat tamponunda çözülerek Ni-NTA afinite kolonuna tatbik edildi ve kolon gradietli olarak 20 mM, 30 mM son olarakta 40 mM imidazol içeren 30'ar ml'lik yıkama tamponu ile yıkandı. Böylece diğer safsızlıklar ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Sonra 250 mM imidazol içeren 10 ml elüsyon tamponu kolona tatbik edildi ve SUMO-hALDH1A1, SUMO-hALDH1A3 ve SUMO-hALDH2 enzimleri kolondan elüe edildi. Elüatlar 1'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı.

3.5.3. Kantitatif Protein Tayini

Kantitatif protein miktarı tayini Bradford (1976) metodu ile gerçekleştirildi. Homojenatta ve Ni-NTA afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılan enzimde bulunan protein miktarı tayin edildi. Coomassie Brilliant Blue G-250 bu teknikte boya olarak kullanılan bir reaktiftir. Bu reaktif yapısında negatif yük bulundurur. Protein ise bulundurduğu pozitif yükten kaynaklı olarak boyanın negatif yüküne bağlanır. Boyanın 465 nm'de kırmızı ve 595 nm'de mavi olamk üzere iki formu bulunmaktadır. Proteinin boyaya bağlanması ile kırmızı form mavi forma dönüşür. Tekniğin bozucu olası faktörlere karşı hassasiyeti çok küçük (1-100 µg) seviyelerdedir. Mevcut reaksiyon büyük oranda tekrarlanabilmekte ve hızlı bir şekilde vuku bulmaktadır.

Protein tayini için uygulanan prosedür şu şekildedir;

- a) 1 mL'de 1 mg protein bulunduran BSA çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konuldu.
- b) Tüplerin hacimleri saf su kullanarak 100 µL tamamlandı ve her bir tüpe 4900 µL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklenerek tüp vorteks ile karıştırıldı.
- c) 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerden 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans bakıldı.

- d) Sonuçta elde edilen absorbans değerlerine karşı gelen μg protein miktarları ile standart bir grafik çizildi.
- e) Seyreltilmiş bakteri homojenatı ve Ni-NTA afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılan enzimden iki farklı tüpe sırasıyla 100'er μL alındı ve her iki tüpe 4900'er μL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklenerek tüp vorteks ile karıştırıldı.
- f) 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplerden 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans bakıldı. Yapılan işlem güvenilirlik açısından 3 kez tekrarlandı ve bu 3 ölçümün aritmetik ortalaması alınarak önceden çizilen standart grafik yardımıyla homojenatta ve saflaştırılan enzimde bulunan protein miktarları tayin edildi.

3.5.4. ALDH1A1 ve ALDH1A3 enzimlerinin dehidrogenaz aktivitesi ölçümü

Enzimlerin dehidrogenaz aktivitesi NAD^+ 'nin indirgenmesi sonucu oluşan absorbans artışı 340 nm'de üç dakika süreyle ölçüldü. Bunun için 1 ml'lik kvartz küvet içerisinde 200 mM Tris-HCl tamponu (pH=8,0), 100 μM all trans retinal 500 μM NAD^+ ve enzim olacak şekilde hazırlandı (Moretti *et al.* 2016). 340 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. NADH'in milimolar ekstinksiyon katsayısı aktivitenin hesaplanması için kullanıldı. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), aldehit dehidrogenaz tarafından all trans retinal varlığında indirgenir. NADH'in oluşum oranı aldehit dehidrogenaz aktivitesine bağımlı olup 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülebilir. Aldehit dehidrogenaz aktivitesinin üniteleri dakika başına okside olan all trans retinal'in mikro molünü verir.

$$\text{EÜ/ml} = \frac{\Delta\text{OD}}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_f$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır;

EÜ/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

OD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : $\beta\text{-NADH}$ 'ın 340 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_f : Seyreltme faktörü

Çizelge 3.17. ALDH1A1 ve ALDH1A3 enzimlerinin aktivite ölçümü için gerekli çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Küveti (µL)	Numune Küveti (µL)
0,5 M Tris-HCl (pH:8,0)	400	200
Saf su	475	455
β -NAD ⁺	100	210
All trans retinal	25	210
Enzim çözeltisi	-	20
Toplam hacim	1000	1000

3.5.5. ALDH2 enziminin esteraz aktivitesi Ölçümü

Enziminin esteraz aktivitesi 25°C'de 10 mM MgCl₂ içeren 50 mM KH₂PO₄ tamponu (pH=7,5) içerisinde paranitrofenil asetat'ın substrat olarak kullanılmasıyla (0,4 mM) belirlendi. Aktivite ölçümü paranitrofenilasetat ile ALDH2'nin reaksiyonu sonucu oluşan paranitrofenolat'ın 400 nm'de absorpsiyon vermesi esasına dayanır. Paranitrofenol'ün molar ekstinksiyon katsayısı (=16 mM⁻¹cm⁻¹) aktivitenin hesaplanması için kullanılır. (Neubauer *et al.* 2013). hALDH2 enzimi için aktivite hesabı aşağıdaki gibi yapıldı:

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{16} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_f$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır;

E \ddot{U} /ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

OD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

16 : *p*-nitrofenol asetatın molar ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

Çizelge 3.18. ALDH2 enziminin aktivite ölçümü için gerekli çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Küveti (μL)	Numune Küveti (μL)
0,25 M KH_2PO_4 (pH:7,5)	200	200
MgCl_2	100	100
Saf su	500	480
$\beta\text{-NAD}^+$	100	210
<i>p</i> -Nitrofenil asetat	100	210
Enzim çözeltisi	-	20
Toplam hacim	1000	1000

3.5.6. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin saflığının kontrolü

Saflaştırılan enzim, Laemmli metodu uygulanarak %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı (Laemmli 1970). Böylece enzimin saflık derecesi kontrol edilmiş olundu. İşlem şu şekilde gerçekleştirildi;

Elektroforezde kullanılan camlar başta su ile daha sonrada alkol ile temiz bir şekilde yıkandı. Elektroforez camları üst üste getirildi ve özel kısıkaçlarla sabitleştirildi. Kısıkaçlarla sabitlenen camlar plakalar, sızdırmayı engelleyen sünger bulunduran jel hazırlama standına yerleştirildi. Öncelikle ayırma jeli çözeltisi hazırlandı ve plakaların arasında kalan boşluğa dikkatli bir şekilde 0,6 cm kalana kadar dolduruldu. Plakalar arasındaki jelin donması için kısa bir süre beklenildi. Ayırma jelinin donduğundan emin olduktan sonra yığma jeli hazırlandı ve donan ayırma jelinin üstüne pipetle dikkatli bir şekilde dolduruldu. Numuneleri yüklemek için kuyucukların oluşması nedeniyle elektroforez için özel taraklar cam plakalara dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Yığma jeli de donduktan sonra taraklar dikkatli bir biçimde kuyucukları bozmadan yavaşça çıkartıldı. Tutuculardan çıkarılan içinde jel bulunan cam plakalar elektroforez tankına

özel cam plaka tutuculara sabitlendi ve bu da tanka yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu.

100 µL enzim örneği, 100 µL numune tamponu, 100 µL gliserolden oluşan enzim numunesi 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu numuneler ve standart protein dikkatli bir şekilde jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elektroforez tankı kapatıldı. 30 dk 80 voltta jel yürütüldü. Daha sonra akım 120 volt'a getirildi ve boya jelden akana kadar jel yürütüldü. Numunelerin yürümesinin takibi, numune tamponunda bulunan brom timol mavisi reaktifi ile yapıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra akım kesildi. Plakalar arasında bulunan jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel derhal sabitleştirme çözeltisine alındı. 20 dakika sabitleştirme çözeltisinde shaker ile karıştırılan jel, 20 dk sonunda sabitleştirme çözeltisinden çıkarıldı ve boyama çözeltisine alındı. Jel, 1 gece çalkalayıcıda çalkalandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra boya çözeltisinden çıkarılan jel son olarak yıkama çözeltisine alındı. Jelin rengi açılıp, protein bantları jelde iyice belirgin olana kadar jel shaker ile çalkalandı. Yıkama işlemi ardından görüntüleme cihazına alınan jelin fotoğrafı çekildi.

3.5.7. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin molekül kütlelerinin tayini

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için önceden 40 mL yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadex G-100, 500 ml saf su içine alındı. Bir gece boyunca jel şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH:7,5 tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 3 mL/saat olarak ayarlandı. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin molekül kütleleri tayininde kullanılacak olan

standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran (2 000 kDa), at dalak apoferritin (443 kDa), β-amilaz (200 kDa), maya alkol dehidrogenaz (150 kDa), sığır serum albumin (66 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidraz (29 kDa) kullanıldı. Dengelenen kolon içindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona 2'şer 2'şer standart protein çözeltilerinden tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç mL elüsyon tamponu 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl pH:7,5 ilave edilerek tekrar jele emdirildi.

Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 1'er mL olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. Standart proteinlerden sonra numune aynı şekilde kolona yüklendi. hALDH1A1 ve hALDH1A3 elüe edilirken tüplerde 340 nm'de aktivite ölçümleri yapıldı. hALDH2 için ise 400 nm de aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimlerin moleköl kütlelerini belirlemek için her bir standart protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve $\log M_K$ değerleri hesaplandı. K_{av} - $\log M_K$ grafiği bilgisayarda Excel programı yardımıyla çizildi. Son olarak hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin K_{av} değeri belirlendi ve K_{av} - $\log M_A$ grafiğinin doğru denklemi kullanılarak tabii moleköl ağırlığı hesaplandı.

K_{av} değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formöl kullanıldı.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

V_0 = Void hacim, V_e = Elüsyon hacmi, V_T = Kolon yatak hacmi

3.6. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için karakterizasyon çalışmaları

3.6.1. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar

hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için tampon çözeltiler hazırlandı ve her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı (Demir 2014).

3.6.2. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin optimum iyonik şiddet değerinin belirlenmesi için belli konsantrasyonlarda tampon çözeltiler hazırlandı ve her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı (Demir 2014).

3.6.3. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla ısıtmalı-soğutmali su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli tampon ve substrat çözeltileri hazırlandı ve çözeltileri bulunduran karışım küvet içerisine alındıktan sonra ilgili sıcaklığa ayarlanan su banyosuna alındı. 10°C aralıklarla 0°C-70°C arasında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi (Demir 2014).

3.7. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesi

hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda antibiyotik ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan tampon hacmi azaltılarak antibiyotik konsantrasyonu artırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.8. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

İnhibisyon çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler belirlendi. Bu antibiyotiklerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri hesaplanan antibiyotiklerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri için enzim aktivitesini yarıya indiren antibiyotik konsantrasyonu ile bulunan bu konsantrasyon değerinden az ve fazla iki antibiyotik konsantrasyonu kullanılarak toplamda beş substrat konsantrasyonu ile enzim aktivitesine bakıldı. Çalışmada kullanılan 5 farklı substrat konsantrasyonu önceden hazırlanan stok çözelti yardımıyla ön denemeler yaparak belirlendi. Sonuçta elde edilen tüm değerler ile her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafikte yarışmalı inhibisyon gösteren inhibitörlerin grafik denklemlerinden K_i değerinin hesabında;

$$K_M I = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

formülü kullanılırken; yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon gösteren inhibitörlerin grafik denklemlerinden K_i değerinin hesabında ise;

$$V_{max} = \frac{VI_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülü kullanıldı.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.1. İnternet Ortamından ALDH1A1 Genine Ait Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi

- ✓ İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) insan ALDH1A1 genine ait gen bölgesi (2378 nükleotid) belirlendi.
- ✓ Gene ait protein kodlama bölgesi (1505 nükleotid) tespit edildi.

NM_000689.4 Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 (ALDH1A1), mRNA

```
GCTGCATACACTTATCACAGGTTTTCGGCTTTGTAAATTAATTCATCTGCAAATAGTGCCTGTCTCC
AGGTACAAATTCGATGCTGGAGCACTGGTTTTCTTAAGGATTTAAGTTTAAAGTCAAAGGCTTCCTGC
CCTAGGTGTTACAAATAAGTAGTGTGCTTTTTCTTTTTTGGCTCTGAGTTTGTTCATCCAATCGTATC
CGAGTATGCAAATAAACTTTAGCCCGTGCAGATAAAAAAGGAACAAATAAAGCCAAGTGCCTATCA
GAACCAAATTGCTGAGCCAGTCACCTGTGTTCCAGGAGCCGAATCAGAAATGTCATCCTCAGGCACG
CCAGACTTACCTGTCTACTCACCGATTTGAAGATTCAATATACTAAGATCTTCATAAACAAATGAAT
GGCATGATTAGTGCAGTGGCAAGAAATTTCTGTCTTTAATCCTGCAACTGAGGAGGAGCTCTGCCA
GGTAGAAGAAGGAGATAAGGAGGATGTTGACAAGGCAGTGAAGGCCGCAAGACAGGCTTTTTAGATT
GGATCCCCGTGGCGTACTATGGATGCTTCCGAGAGGGGGCGACTATTATACAAGTTGGCTGATTTAA
TCGAAAGAGATCGTCTGCTGCTGGCGACAATGGAGTCAATGAATGGTGGAAAACCTCTATTCCAATGC
ATATCTGAATGATTTAGCAGGCTGCATCAAAACATTCGCGTACTGTGCAGTTGGGCTGACAAGATC
CAGGGCCGTACAATACCAATTGATGGAAATTTTTTACATATAACAAGACATGAACCTATTGGTGTAT
GTGGCCAAATCATTCTTTGGAATTTCCCGTTGGTTATGCTCATTGGAAGATAGGGCCTGCACTGAG
CTGTGGAAACACAGTGGTTGTCAAACCAGCAGAGCAAACCTCCTCTCACTGCTCTCCACGTGGCATCT
TTAATAAAAGAGGCAGGGTTTCTCTGAGTAGTGAATATTGTTCTGGTTATGGGCCACAGCAG
GGGCAGCCATTTCTCTCACATGGATATAGACAAAGTAGCCTTCACAGGATCAACAGAGGTTGGCAA
GTTGATCAAAGAAGCTGCCGGGAAAAGCAATCTGAAGAGGGTGACCCTGGAGCTTGGAGGAAAGAGC
CCTTGCATTGTGTTAGCTGATGCCGACTTGACAATGCTGTTGAATTTGCACACCATGGGGTATTCT
ACCACCAGGGCCAGTGTGTATAGCCGATCCAGGATTTTTGTGGAAGAATCAATTTATGATGAGTT
TGTTTGAAGGAGTGTGAGCGGGCTAAGAAGTATATCCTTGGAAATCCTCTGACCCAGGAGTCACT
CAAGGCCCTCAGATTGACAAGGAACAATATGATAAAATACTTGACCTCATGAGAGTGGGAAGAAAG
AAGGGGCCAAACTGGAATGTGGAGGAGGCCCGTGGGGGAATAAAGGCTACTTTGTCCAGCCCACAGT
GTTCTCTAATGTTACAGATGAGATGCGCATTGCCAAAGAGGAGATTTTTGGACCAGTGCAGCAAATC
ATGAAGTTTAAATCTTTAGATGACGTGATCAAAAAGACAAACAATACTTTCTATGGCTTATCAGCAG
GAGTGTTTACCAAAGACATTGATAAAGCCATAACAATCTCCTCTGCTCTGCAGGCAGGAACAGTGTG
GGTGAATTGCTATGGCGTGGTAAGTGCCAGTGCCCTTTGGTGGATTCAAGATGTCTGGAAATGGA
AGAGAAGTGGGAGAGTACGGTTTCCATGAATATACAGAGGTCAAAACAGTCAAGTGAATAATCTCTC
AGAAGAAGTCAATAAAGAAAATACAAGAGTGGAGAGAAGCTCTTCAATAGCTAAGCATCTCCTTACAG
TCACATAATATAGTAGATTTTTAAAGACAAAATTTTTCTTTTTCTTGTGATTTTTTAAACATAAGCTAAAT
CATATTAGTATTAATACTACCCATAGAAAAGTGGACATGTAGCTTCTTCTGAAAGAAATTTTGCCT
TCTGAAATGTGACCCCCAAGTCTATCCTAAATAAAAAAGACAAATTCGGATGTATGATCTCTCTA
GCTTTGTATAGTTATGTGATTTTCTTTGTAGTACTTTTGCAGGATAATAATTTTATAGAAAAGG
AACAGTTGCATTTAGCTTCTTTCCCTTAGTACTCTTGAAGTACTTAACATACACGTTAACTGCAGA
GTAAATTGCTCTGTTCCAGTAGTTATAAAGTCTTGGACTGTTTTGAAAAGTTTCTTAGGATGTCA
TGTCTGCTTGTCAAAGAAATAATCCCTGTAATATTTAGCTGTAAACTGAATATAAAGCTTAATAAA
AACAACTTGCATGATTCTTGTAAAAA
```

4.1.2. İnternet Ortamından ALDH1A3 Genine Ait Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi

- ✓ İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) insan ALDH1A3 genine ait gen bölgesi (3622 nükleotid) belirlendi.
- ✓ Gene ait protein kodlama bölgesi (1538 nükleotid) tespit edildi.

NM_000693.3 Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family member A3 (ALDH1A3), transcript variant 1, mRNA

GAGGCGGGCCGGCCGCCCTCCCCTCTCCTCCCCTCCCAGCCCGCCCTCCCCTCCTCCGGTCCCAGCA
 GCCAATTAGGCGGCCCCCTCGGGCGGGAGGCGTGGGGCGCTGCATAAAGCGGGCGGGGAGCTGCCACC
 CCGGGAGCGGGCTGCGCAGTGTCCGGGCCGAGCCGGTGCGCCGAGACTAGGGCGCCTCGGGCCAGG
 GAGCGCGGAGGAGCCATGGCCACCGCTAACCGGGCCGTGGAAAAACGGGCAGCCGGACAGGAAGCCGC
 CGGCCCTGCCCGCCCCATCCGCAACCTGGAGGTCAAGTTCACCAAGATATTTATCAACAATGAATG
 GCACGAATCCAAGAGTGGGAAAAAGTTTGTACATGTAACCCCTCAACTCGGGAGCAAATATGTGAA
 GTGGAAGAAGGAGATAAGCCCGACGTGGACAAGGCTGTGGAGGCTGCACAGTTGCCTTCCAGAGGG
 GCTCGCCATGGCGCCGGCTGGATGCCCTGAGTCGTGGGCGGCTGCTGCACCAGCTGGCTGACCTGGT
 GGAGAGGGACCGCGCCACCTTGCCCGCCCTGGAGACGATGGATACAGGGAAGCCATTTCTTCATGCT
 TTTTTTCATCGACCTGGAGGGCTGTATTAGAACCCTCAGATACTTTGCAGGGTGGGCAGACAAAATCC
 AGGGCAAGACCATCCCCACAGATGACAACGTGCTGTGCTTCACCAGGCATGAGCCCATTTGGTGTCTG
 TGGGGCCATCACTCCATGGAACCTCCCCCTGCTGATGCTGGTGTGGAAGCTGGCACCCGCCCCCTGC
 TGTGGGAACACCATGGTCCCTGAAGCCTGCGGAGCAGACACCTCTCACCGCCCTTTATCTCGGCTCTC
 TGATCAAAGAGGCCGGGTCCCCTCCAGGAGTGGTGAACATTTGTGCCAGGATTCGGGCCACAGTGGG
 AGCAGCAATTTCTTCTCACCCCTCAGATCAACAAGATCGCCTTCACCGGCTCCACAGAGTTGGAAAA
 CTGGTTAAAGAAGCTGCGTCCCAGCAATCTGAAGCGGGTGACGCTGGAGCTGGGGGGAAGAACC
 CCTGCATCGTGTGTGCGGACGCTGACTTGGACTTGGCAGTGGAGTGTGCCATCAGGGAGTGTCTTT
 CAACCAAGGCCAGTGTGTCACGGCAGCCTCCAGGGTGTTCGTGGAGGAGCAGGTCTACTCTGAGTTT
 GTCAGGCGGAGCGTGGAGTATGCCAAGAAACGGCCCCGTGGGAGACCCCTTCGATGTCAAAAACAGAAC
 AGGGGCCTCAGATTGATCAAAAAGCAGTTCGACAAAATCTTAGAGCTGATCGAGAGTGGGAAGAAGGA
 AGGGGCCAAGCTGGAATGCGGGGGCTCAGCCATGGAAGACAAGGGGCTCTTCATCAAACCCACTGTC
 TTCTCAGAAGTCACAGACAACATGCGGATTGCCAAAAGAGGAGATTTTCGGGCCAGTGCACCAATAC
 TGAAGTTCAAAGTATCGAAGAAGTGATAAAAAGAGCGAATAGCACCGACTATGGACTCACAGCAGC
 CGTGTTCACAAAAAATCTCGACAAAGCCCTGAAGTTGGCTTCTGCCTTAGAGTCTGGAACGGTCTGG
 ATCAACTGCTACAACGCCCTCTATGCACAGGCTCCATTTGGTGGCTTTAAAATGTCAGGAAATGGCA
 GAGAAGTAGGTGAATACGCTTTGGCCGAATACACAGAAGTGAAGAACTGCACCATCAAACCTGGCGA
 CAAGAACCCTGAAGGAAAGGCGGGGCTCCTTCTCAAACATCGGACGGCGGAATGTGGCAGATGAA
 ATGTGCTGGAGGAAAAAATGACATTTCTGACCTTCCCAGGACACATTTCTTCTGGAGGCTTTACATC
 TACTGGAGTTGAATGATTGCTGTTTTCTCTCACTCTCCTGTTTATTCACCAGACTGGGGATGCCATA
 TAGGTTGTCTGTGAAATCGCAGTCCCTGCCTGGGGAGGGAGCTGTTGGCCATTTCTGTGTTTTCCCTTT
 AAACCAGATCCTGGAGACAGTGAAGATACTCAGGGCGTGTAAACAGGGAGTGGTATTTGAAGTGTC
 AGCAGTTGCTTGAATGCTTTGCCGAATCTGACTCCAGTAAGAATGTGGGAAAACCCCTGTGTGTT
 CTGAAGCAGGGCTCTTGACCCAGCGGTCTCCTCAGGTGGACCTGCTTACAGAGCAAGCCACGCCT
 CTTTCCAGAGTGAAGGTGGGACCATTCTTGGGAAAGGATTCACAGTAAGTTTTTTGGTTTTTTGTT
 TTTTTTTTTCTTGTTTTTTAAAAAAGGATTTACAGTGAGAAAGTTTTTGGTTAGTGCAATACCGTGGA
 AGGGCGCCAGGGTCTTTGTGGATTGCATGTTGACATTGACCGTGAGATTCGGCTCAAACCAATACT
 GCCTTTGGAATATGACAGAATCAATAGCCCAGAGAGCTTAGTCAAAGACGATATCACGGTCTACCTT
 AACCAAGGCACTTTCTTAAGCAGAAAATATTGTTGAGGTTACCTTTGCTGCTAAAGATCCAATCTTC
 TAACGCCACAACAGCATAGCAAATCCTAGGATAATTCACCTCCTCATTTGACAAAATCAGAGCTGTAA
 TTCGCTTTAACAAATTACGCATTTCTATCACGTTCACTAACAGCTTATGATAAGTCTGTGTAGTCTT
 CCTTTTCTCCAGTTCTGTTACCAATTTAGATTAGTAAAGCGTACACAACCTGAAAAGACTGCTGTAA

TAACACAGCCTTGTTATTTTTTAAGTCCTATTTTGATATTAATTTCTGATTAGTTAGTAAATAACACC
 TGGATTCTATGGAGGACCTCGGTCTTCATCCAAGTGGCCTGAGTATTTCACTGGCAGGTTGTGAATT
 TTTCTTTTCTCTTTGGGGATCCAAATGATGATGTGCAATTTTCATGTTTTAACTTGGGAAACTGAAA
 GTGTTCCCATATAGCTTCAAAAACAAAACAAATGTGTTATCCGACGGATACTTTTATGGTTACTAA
 CTAGTACTTTTCTAATTGGGAAAGTAGTGCTTAAAGTTTGCAAATTAAGTTGGGGAGGGCAATAATAA
 AATGAGGGCCCGTAACAGAACCAGTGTGTGTATAACGAAAACCATGTATAAAAATGGGCCATCACCC
 TTGTCAGAGATATAAATTACCACATTTGCCTTCCCTTCATCAGCTAACACTTATCACTTATACTACC
 AATAACTTGTTAAATCAGGATTTGGCTTCATACACTGAATTTTCAGTATTTTATCTCAAGTAGATAT
 AGACACTAACCTTGATAGTGATACGTTAGAGGGTTCCTATTTCTTCCATTGTACGATAATGTCTTTAA
 TATGAAATGCTACATTATTTATAATTGGTAGAGTTATTGTATCTTTTTATAGTTGTAAGTACACAGA
 GGTGGTATATTTAACTTCTGTAATATACTGTATTTAGAAAATGAAAATATATATAGTGTTAGGTTTC
 ACTTCTTTTAAAGGTTTACCCCTGTGGTGTGGTTTTAAAAATCTATAGCCTGGGAAATCCGATCCTAG
 CTGCAGATCGCATCCCACAATGCGAGAATGATAAAAATAAAAATTTGGATATTTGAGAAAAAAAAAAAA
 AAAA

4.1.3. İnternet Ortamından ALDH2 Genine Ait Gen Bölgesinin ve Protein Kodlama Bölgesinin Belirlenmesi

- ✓ İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) insan ALDH2 genine ait gen bölgesi (1935 nükleotid) belirlendi.
- ✓ Gene ait protein kodlama bölgesi (1412 nükleotid) tespit edildi.

NM_001204889.1 Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 2 family(mitochondrial) (ALDH2), transcript variant 2, mRNA

ATTGGCTGCCGCGCGGGGCGGGGAGCGGGTTCGGCTCAGTGGCCCTGAGACCCTAGCTCTGCTCTCG
 GTCCGCTCGCTGTCCGCTAGCCCGCTGCGATGTTGCGCGCTGCCGCCCGCTTCGGGCCCCGCTGGG
 CCGCCGCTCTTGTTCAGCCGCGCCACCCAGGCCGTGCCTGCCCAACCAGCAGCCCCAGGTCCTTC
 TGCAACCAGATTTTCATAAACAATGAATGGCAGCATGCCGTCAGCAGGAAAACATTTCCCAACCTCA
 ATCCGCTCCACTGGAGAGGTCATCTGTTCAGGTAGCTGAAGGGGACAAGGCCCTGGGACCCCTGGACAA
 TGGCAAGCCCTATGTCATCTCCTACCTGGTGGATTTGGACATGGTCCCAAATGTCCTCCGGTATTAT
 GCCGGCTGGGCTGATAAGTACCACGGGAAAACCATCCCCATTGACGGAGACTTCTTCAGCTACACAC
 GCCATGAACCTGTGGGGGTGTGCGGGCAGATCATTCCGTGGAATTTCCCGCTCCTGATGCAAGCATG
 GAAGCTGGGCCAGCCTTGGCAACTGGAACGTGGTGTGTGATGAAGGTAGCTGAGCAGACACCCCTC
 ACCGCCCTCTATGTGGCCAACTGATCAAGGAGGCTGGCTTTCCCCCTGGTGTGGTCAACATTGTGC
 CTGGATTTGGCCCCACGGCTGGGGCCGCATTGCCTCCCATGAGGATGTGGACAAAAGTGGCATTAC
 AGGCTCCACTGAGATTGGCCCGTAATCCAGGTTGCTGCTGGGAGCAGCAACCTCAAGAGAGTGACC
 TTGGAGCTGGGGGGGAAGAGCCCCAACATCATCATGTGATGCGGATATGGATTGGGCCGTGGAAC
 AGGCCACTTCGCCCTGTTCTTCAACCAGGGCCAGTGTGCTGTGCGGGCTCCCGGACCTTCGTGCA
 GGAGGACATCTATGATGAGTTTGTGGAGCGGAGCGTTGCCCGGGCCAAGTCTCGGGTGGTCCGGAAAC
 CCCTTTGATAGCAAGACCGAGCAGGGGCCGAGGTGGATGAAACTCAGTTTAAAGAGATCCTCGGCT
 ACATCAACACGGGGAAGCAAGAGGGGGCGAAGCTGCTGTGTGGTGGGGGCATTGCTGCTGACCGTGG
 TTACTTCATCCAGCCACTGTGTTTGGAGATGTGCAGGATGGCATGACCATCGCCAAGGAGGAGATC
 TTCGGGCCAGTGATGCAGATCCTGAAGTTCAAGACCATAGAGGAGGTTGTTGGGAGAGCCAACAATT
 CCACCTAGCGGGCTGGCCGAGCTGTCTTCACAAAGGATTTGGACAAGGCCAATTACCTGTCCAGGC
 CCTCCAGGCGGGCACTGTGTGGTCAACTGCTATGATGTGTTTGGAGCCCAGTCACCCTTTGGTGGC
 TACAAGATGTGGGGAGTGGCCGGGAGTTGGCCGAGTACGGGCTGCAGGCATACACTGAAGTGAAAA
 CTGTCACAGTCAAAGTGCCTCAGAAGAACTCATAAAGATCATGCAAGCTTCTCCCTCAGCCATTGA

TGGAAAGTTTCAGCAAGATCAGCAACAAAACCAAGAAAAATGATCCTTGCCTGCTGAATATCTGAAAA
 GAGAAATTTTTCTACAAAATCTCTTGGGTCAAGAAAGTTCTAGAATTTGAATTGATAAACATGGTG
 GGTTGGCTGAGGGTAAGAGTATATGAGGAACCTTTTAAACGACAACAATACTGCTAGCTTTCAGGAT
 GATTTTTAAAAAATAGATTCAAATGTGTTATCCTCTCTCTGAAACGCTTCTATAACTCGAGTTTAT
 AGGGGAAGAAAAAGCTATTGTTTACAATTATATCACCATTAAGGCAACTGCTACACCCTGCTTTGTA
 TTCTGGGCTAAGATTCATTAAAAACCTAGCTGCTCTTAACCTACAAAAA

4.1.4. hALDH1A1 Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri

"MSSSGTPDLPVLLDLDLKIYTKIFINNEWHDSVSGKKFPVFNPAATEEELCQVEE
 GDKEDVDKAVKAARQAFQIGSPWRTMDASERGRLLYKLADLIERDRLLLATM
 ESMNGGKLYSNAYLNDLAGCIKTLRYCAGWADKIQGRTIPIDGNFFTYTRHEPI
 GVCQGQIIPWNFPLVMLIWKIGPALSCGNTVVVKPAEQTPLTALHVASLIKEAGFP
 PGVVNIVPGYGPTAGAAISSHMDIDKVAFTGSTEVGKLIKEAAGKSNLKRVTLE
 LGGKSPIVLADADLDNAVEFAHHGVFYHQGCCIAASRIFVEESYDEFVRRSV
 ERAKKYILGNPLTPGVTQGPQIDKEQYDKILDIESGKKEGAKLECGGGPWGK
 GYFVQPTVFSNVTDEMRIAKEEIFGPVQQIMKFKSLDDVIKRANNTFYGLSAGV
 FTKDIDKAITISSALQAGTVWVNCYGVVSAQCPFGGFKMSGNGRELGEYGFHE
 YTEVKTVTVKISQKNS"

4.1.5. hALDH1A3 Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri

"MATANGAVENGQPDRKPPALPRPIRNLEVKFTKIFINNEWHESKSGKKFATCN
 PSTREQICEVEEGDKPDVDKAVEAAQVAFQRGSPWRRLDALSRGRLHQLADL
 VERDRATLAALETMDTGKPFLLHAFFIDLEGCIRTLRYFAGWADKIQGKTIPTDD
 NVVCFTRHEPIGVCGAITPWNFLLMLVWKLAPALCCGNTMVLKPAEQTPLTA
 LYLGSLIKEAGFPPGVVNIVPGFGPTVGAAISSHPQINKIAFTGSTEVGKLVKEAA
 SRSNLKRVTLELGGKNPCIVCADADLDLAVECAHQGVFFNQQQCCTAASRVFV
 EEQVYSEFVRRSVEYAKKRPVGDVDFVTEQGPQIDQKQFDKILELIESGKKEG
 AKLECGGSAMEDKGLFIKPTVFSEVTDNMRIAKEEIFGPVQPILKFKSIEEVIKRA
 NSTDYGLTAAVFTKNLDKALKLASALES GTVWVNCYNALYAQAPFGGFKMSG
 NGRELGEYALAEYTEVKTVTIKLGDKNP"

4.1.6. hALDH2 Enziminin Translasyon Olan Aminoasitleri

“MLRAAARFGPRLGRRLLSAAATQAVPAPNQQPEVFCNQIFINNEWHDAVSRK
TFPTVNPSTGEVICQVAEGDKALETLDNGKPYVISYLVLDLDMVLKCLRYYAGW
ADKYHKGKTIPIDGDFFSYTRHEPVGVCQIIPWNFPLLMQAWKLGPALATGNV
VVMKVAEQTPLTALYVANLIKEAGFPPGVVNIVPGFGPTAGAAIASHEDVDKV
AFTGSTEIGRVIQVAAGSSNLKRVTLELGGKSPNIIMSDADMDWAVEQAHFALF
FNQGGQCCAGSRTFVQEDIYDEFVRSVARAKSRVVGPNPFDKTEQGPQVDET
QFKKILGYINTGKQEGAKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVQDGMTIAKEEIFG
PVMQILKFKTIEEVVGRANNSTYGLAAAVFTKDLKANYLSQALQAGTVVWN
CYDVFGAQSPPGGYKMSGSGRELGEY GLQAYTEVKTVTVKVPQKNS”

4.2. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Genlerine Ait Primerlerin Belirlenmesi

Primerler protein kodlama bölgesinin başından ve sonundan tüm geni kapsayacak biçimde seçildi. Tasarlanan primerler data banklarda bulunan DNA sekansları ile blastlanarak insan ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 genleri ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edildi.

Çizelge 4.1. hALDH1A1 genine ait primer bilgileri

Primer	Sekans (5'-3')	Tm	Uzunluk (bp)
Forward	ATGTCATCCTCAGGCACGC	59	19
Reverse	TGGAAACCGTACTCTCCCAG	60	20

Çizelge 4.2. hALDH1A3 genine ait primer bilgileri

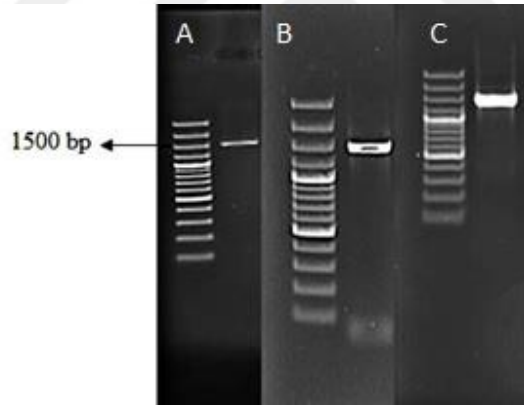
Primer	Sekans (5'-3')	Tm	Uzunluk (bp)
Forward	ATGGCCACCGCTAACGGG	61	18
Reverse	TCAGGGGTTCTTGTCGCCA	59	19

Çizelge 4.3. hALDH2 genine ait primer bilgileri

Primer	Sekans (5'-3')	Tm	Uzunluk (bp)
Forward	AACCAGCAGCCCGAGGTC	61	18
Reverse	TGCCTGCAGCCCGTACTC	61	18

4.3. cDNA Kütüphanesinden hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Genlerinin PCR İle Çoğaltılması

Ticari bir firmadan hazır olarak satın alınan insan beyin cDNA'sı kullanılarak gene özgü primerler ile PCR işlemi yapıldı. ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 primerlerinin bağlanma sıcaklığı sırasıyla 59,5, 60 ve 61°C olarak belirlendi.

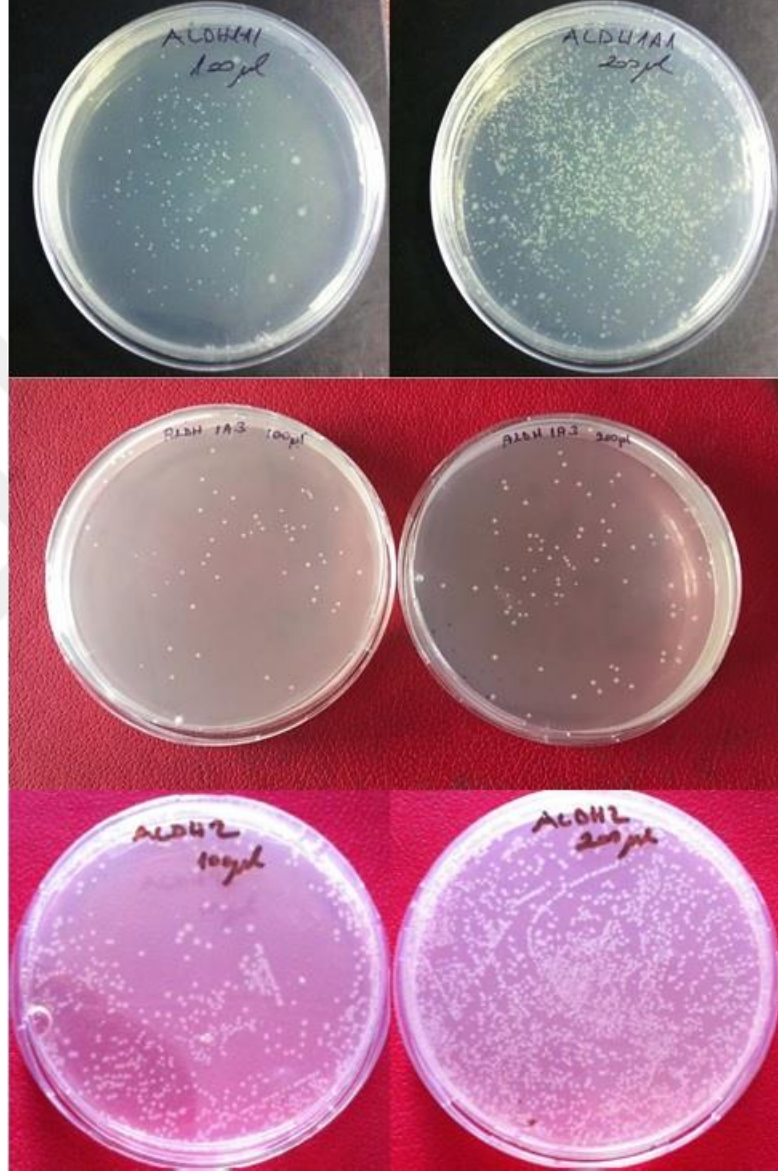
**Şekil 4.1.** Agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

*A-) ALDH1A1 B-)ALDH1A3 C-) ALDH2

4.4. Rekombinant Vektörün Elde Edilmesi ve Konak Organizmaya Transformasyonu

Oluşturulan primerler PCR'da çoğaltıldıktan sonra ilgili gen bölgesinin (cDNA) vektöre (pET SUMO) aktarılması için ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen rekombinant vektör, konak mikroorganizmaya aktarılarak işlemin doğru bir şekilde yapıldığını kontrol etmek için kanamisin içeren besi

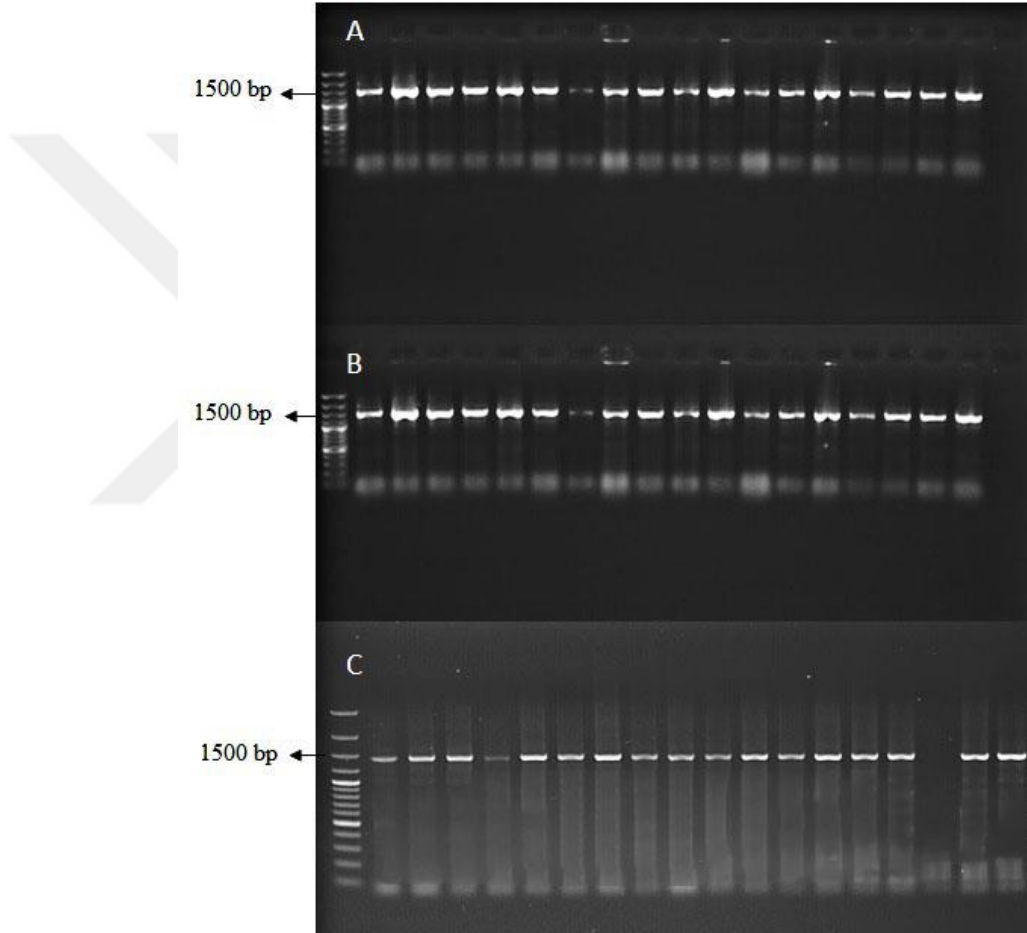
yerlerinde büyüme bırakıldı. 37°C’de gece boyu süren inkübasyon sonrası farklı miktarlarda ekim yapılan petrilerin tümünde koloni oluşumu gözlemlendi.



Şekil 4.2. Farklı miktarlarda ekim yapılan besiyerlerinde oluşan koloniler (ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2)

4.5. Koloni PCR

İlk transformasyon sonrası elde edilen kolonilerin hangisinin rekombinant vektörü taşıdığını belirlemek amacıyla seçilip numaralandırıldıktan sonra PCR'da template olarak kullanıldı. Seçilen kolonilerden gene ait primerlerle PCR reaksiyon yapıldı.

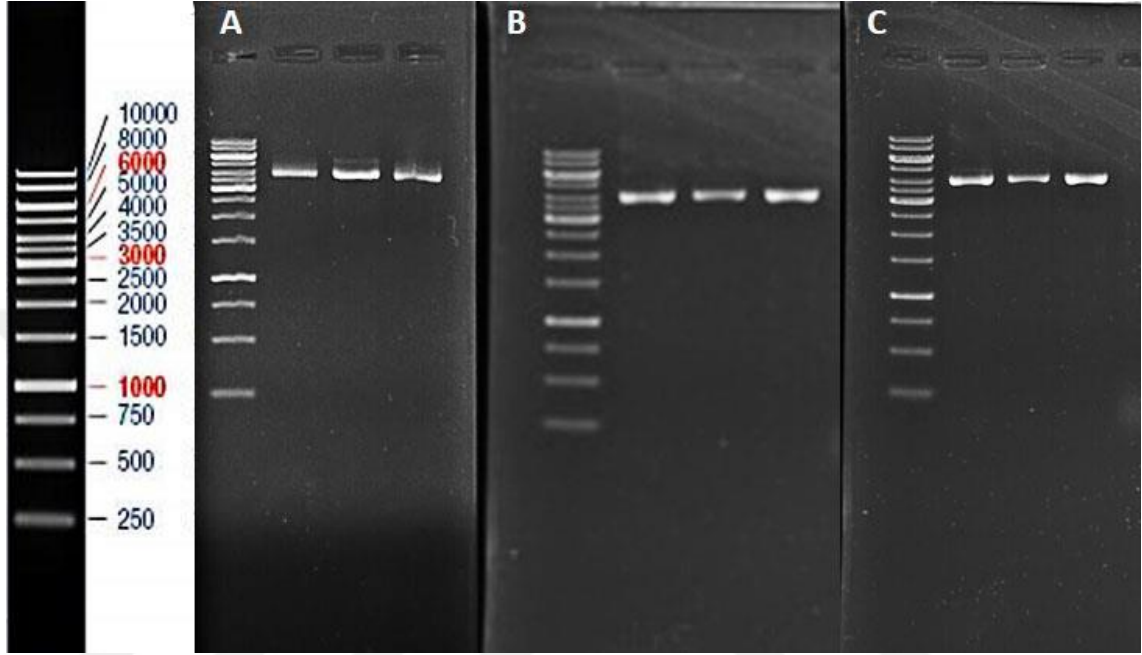


Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezinde yürütülen koloni PCR ürünleri
*(A: ALDH1A1; B: ALDH1A3; C: ALDH2)

4.6. Plazmid İzolasyonu ve Çapraz PCR

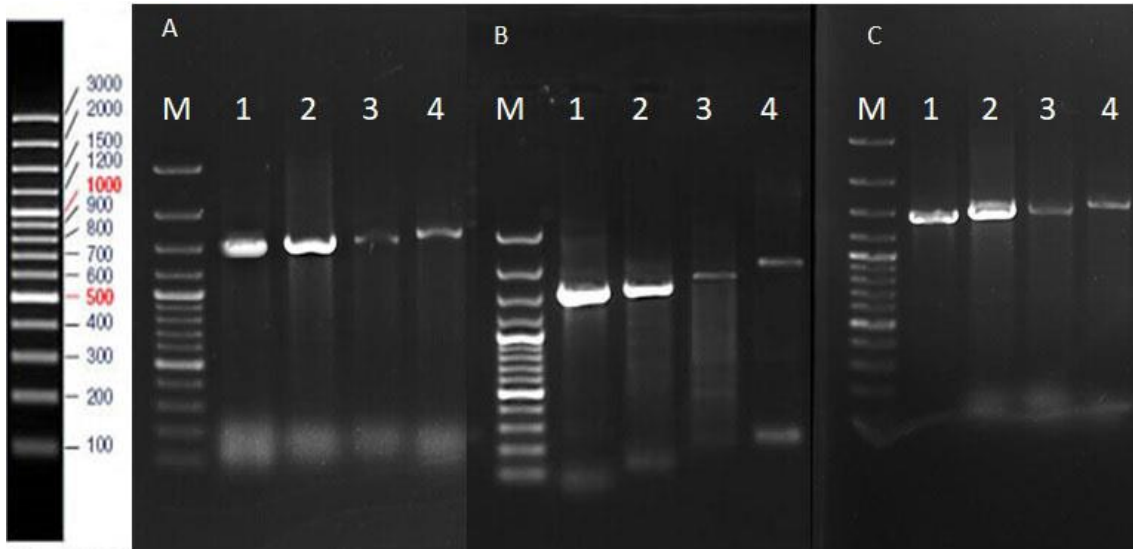
Koloni PCR'da pozitif sonuç veren koloniler bir gece antibiyotik içeren sıvı LB ortamında büyütüldükten sonra plazmid izolasyonunda kullanıldı. İzolasyon sonrası elde edilen plazmidlerden 4 farklı PCR yapılarak genin doğru bir şekilde insört olup

olmadığı kontrol edildi. Sonuçta, koloni PCR verilerine paralel olarak her iki koloniden elde edilen plazmidlerin geni doğru şekilde aldığı teyit edildi.



Şekil 4.4. Plazmit izolasyonu

*A: ALDH1A1, B:ALDH1A3, C: ALDH2

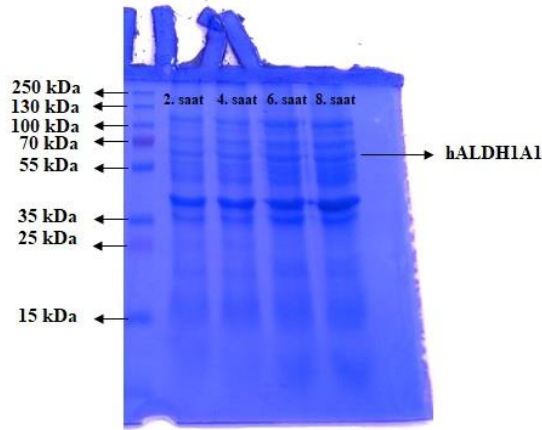


Şekil 4.5. Çapraz PCR

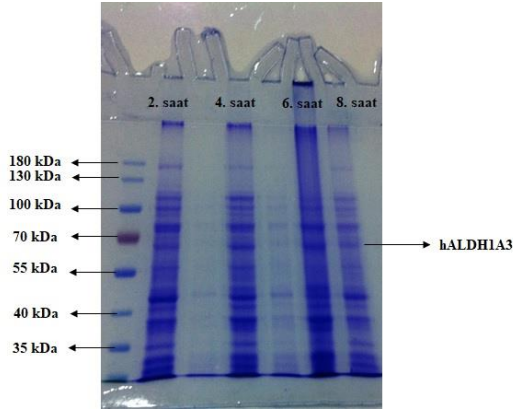
(*M: Marker (100 bp), , 1 numaralı kuyu; genin forward ve revers primerleriyle yapılan PCR sonucu, 2 numaralı kuyu; vektörün revers genin forward primerleriyle yapılan PCR sonucu, 3 numaralı kuyu; vektörün forward genin revers primerleriyle yapılan PCR sonucu, 4 numaralı kuyu; vektörün forward ve vektörün revers primerleriyle yapılan PCR sonucu. (A: ALDH1A1; B: ALDH1A3; C: ALDH2)

4.7. IPTG Kullanılarak İstenilen Genin Pilot Ekspresyonu

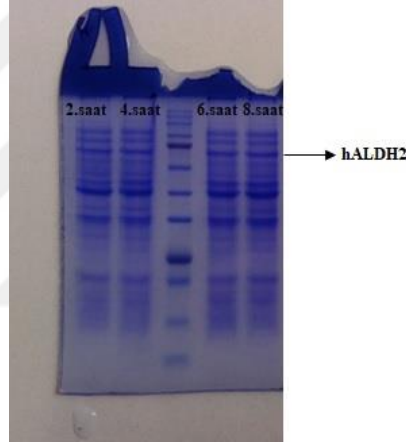
İçerisinde pET-SUMO-hALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 plasmidlerini taşıyan *E.coli* (BL21DE3) bakteri hücreleri, içinde 50 µL kanamisin bulunan 10 mL'lik LB besiyerine ekildi. LB 37°C'de 200 rpm'de bir gece bekletildi ve taze kültür elde edildi. 1 gece sonra bu kültürden 2'şer mL alınarak içinde 1 mL kanamisin bulunan 200 mL'lik 2 ayrı sıvı besi yerine tekrar ekim yapıldı. 2 saat sonra OD₆₀₀ değeri ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 için sırasıyla 0,545, 0,578, 0,594 olarak ölçüldü. 2 saatten sonra 50 mM IPTG stoğundan son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde alınarak bakterilerin bulunduğu besiyerlerinin birine eklendi ve 8 saat 37°C'de 230 rpm'de çalışıldı. 8 saatin sonunda iki saatte bir örnek alınan bakteriler 15 mL'lik falkon tüplere alındı ve 11000xg'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Peletler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Peletler 500 µL liziz tamponunda çözüldü. 3 defa sıvı azotla dondurulup 42°C'de çözüldü. 4°C'de 23000 xg'de 5 dakika numuneler santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve peletler atıldı. Süpernatant SDS-PAGE'de görüntülendi (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).



Şekil 4.6. Belirli saat aralıklarında ekspresyon profili sergileyen hALDH1A1'in SDS-PAGE fotoğrafı



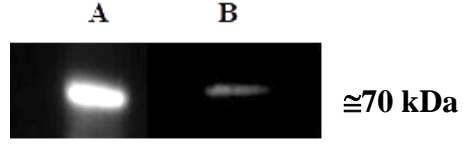
Şekil 4.7. Belirli saat aralıklarında ekspresyon profili sergileyen hALDH1A3'in SDS-PAGE fotoğrafı



Şekil 4.8. Belirli saat aralıklarında ekspresyon profili sergileyen hALDH2'in SDS-PAGE fotoğrafı

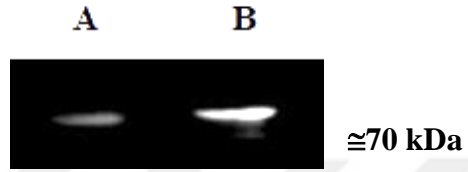
4.8. Western blot analizi

Western blot analizi kullanılarak hem hedef proteinin ekspresyon işlemi sonrasında olup olmadığı kontrol edildi. IPTG ile indüklenen *E. coli* hücrelerinden elde edilen homojenatlarda rekombinant proteinin daha fazla miktarda mevcut olduğu görüldü. Enzimler yaklaşık 70 kDa da ışığa verdi. ALDH2 enzimi için lizatta elde edilen santrifüj sonrası hem çökelekte hem de süpernatantta protein olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.9. hALDH1A1 ve hALDH1A3 Western blot sonucu

* A: hALDH1A1; B: hALDH1A3

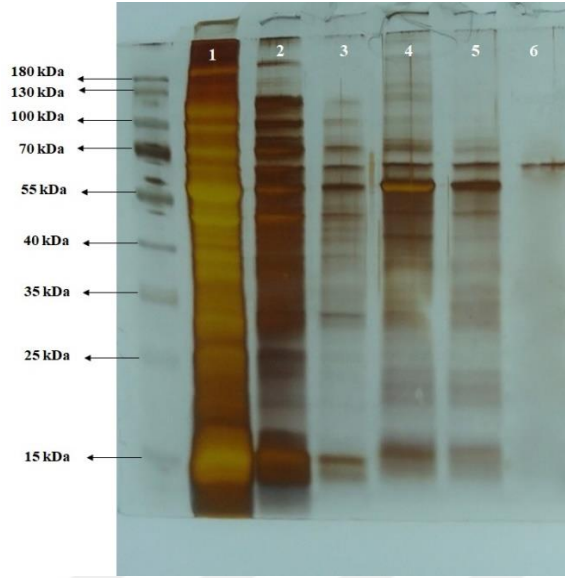


Şekil 4.10. hALDH2 Western blot sonucu

* A: Süpernatant; B: Çökelek

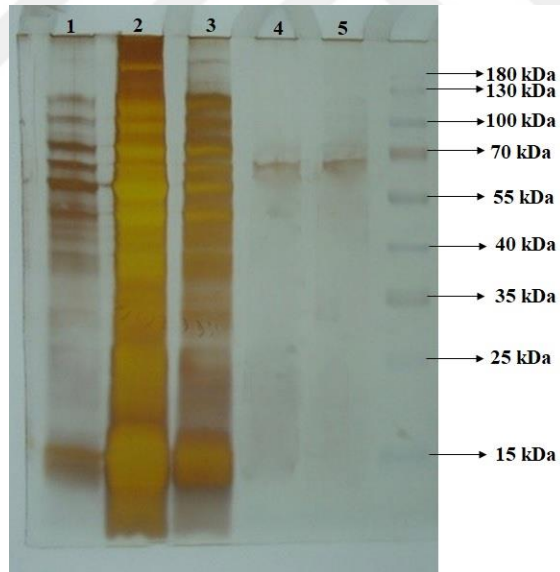
4.9. Doğal Şartlar Altında Ni-NTA Afinite Kolonundan Proteinin Saflaştırılması

Diyaliz işleminden sonra 8 mL'lik lizat kolona yüklendi. Bağlanma tamponuna 10 mM imidazol koyuldu. Kolon bir gece karışmaya bırakıldı. Kolonun yıkama işlemi gradientli olarak 20, 30 ve 40 mM imidazol ile gerçekleştirildi. 250 mM imidazol içeren elüsyon tamponuyla elüe işlemi yapıldı. Elüsyon sonucu 280 nm'de ki absorbansı yüksek çıkan elüatlar için SDS-PAGE yapıldı ve üç enzim içinde tek bant görüldü (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13).



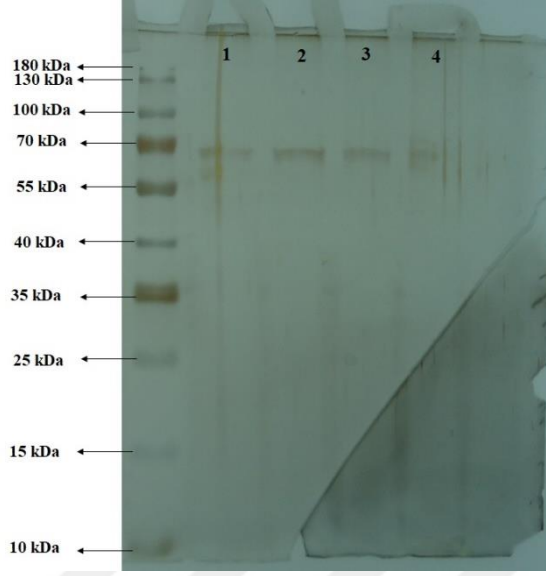
Şekil 4.11. Safılaştırılan SUMO-hALDH1A1 enziminin SDS- PAGE fotoğrafı

*1; Lizat, 2; Kolona tutunmayan kısım, 3; Yıkama-1, 4; Yıkama-2, 5; Yıkama-3 6; SUMO-hALDH1A1 füzyon proteini.



Şekil 4.12. Safılaştırılan SUMO-hALDH1A3 enziminin SDS- PAGE fotoğrafı

*1; Yıkama-3; 2; Lizat, 3; Kolona tutunmayan kısım, 4-5; SUMO-hALDH1A3 füzyon proteini.



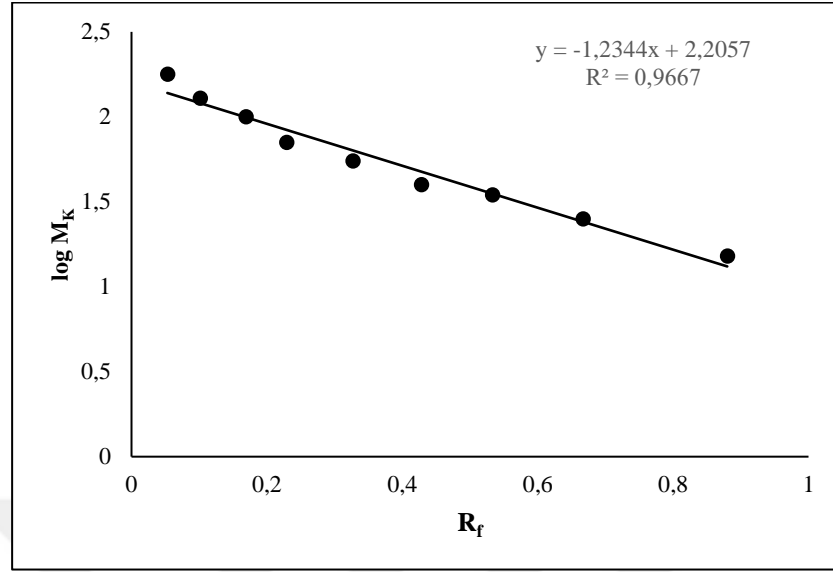
Şekil 4.13. Safılaştırılan SUMO-hALDH2 enziminin SDS- PAGE fotoğrafı
*1-4; SUMO-hALDH2 füzyon proteini

4.10. Diyaliz

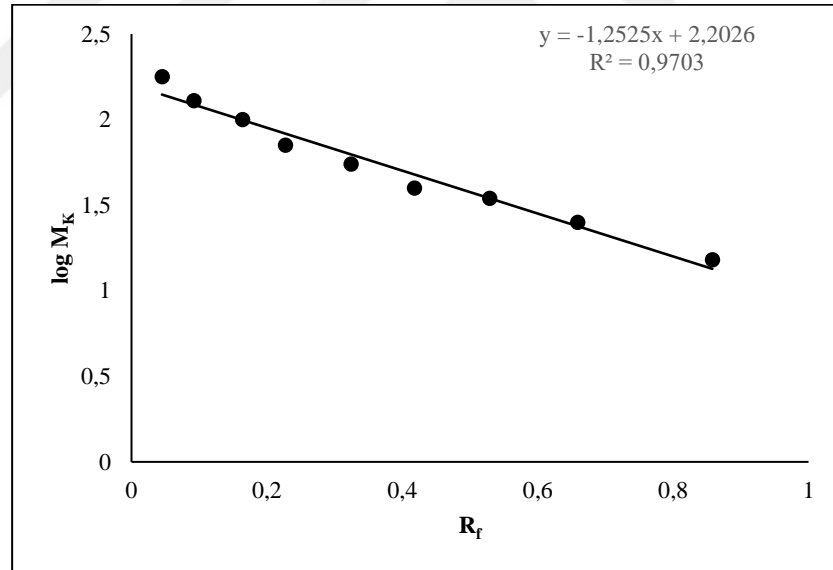
Kolondan alınan numune, diyaliz torbasına alındı ve imidazolün uzaklaştırılması için 5 mM Na-fosfat (pH: 8,0) tampon çözeltisine karşı 2 saat diyaliz edildi. Diyaliz işlemi +4°C’de gerçekleştirildi.

4.11. SUMO-hALDH1A1, SUMO-hALDH1A3, ve SUMO-hALDH2 füzyon proteinlerinin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

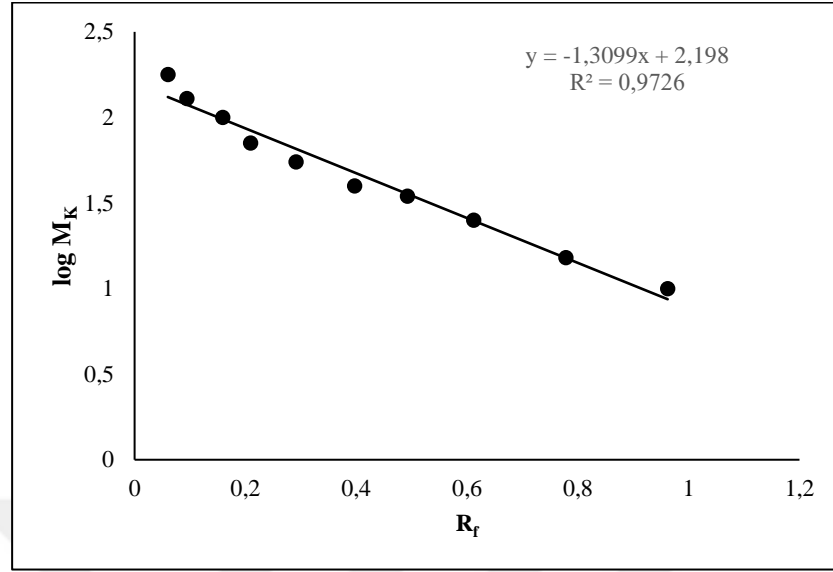
Safılaştırılan enzimlerin ve her bir standart protein için jelde yürüme mesafeleri ölçüldü ve R_f değerleri hesaplandı. R_f - $\log M_k$ değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.14-4.16.). Grafikten faydalanılarak enzimlerin molekül kütlesi hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 için sırasıyla 68,45; 69,31 ve 67,85 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.14. Saflaştırılan hALDH1A1 enzimin $R_f/\log M_K$ grafiği



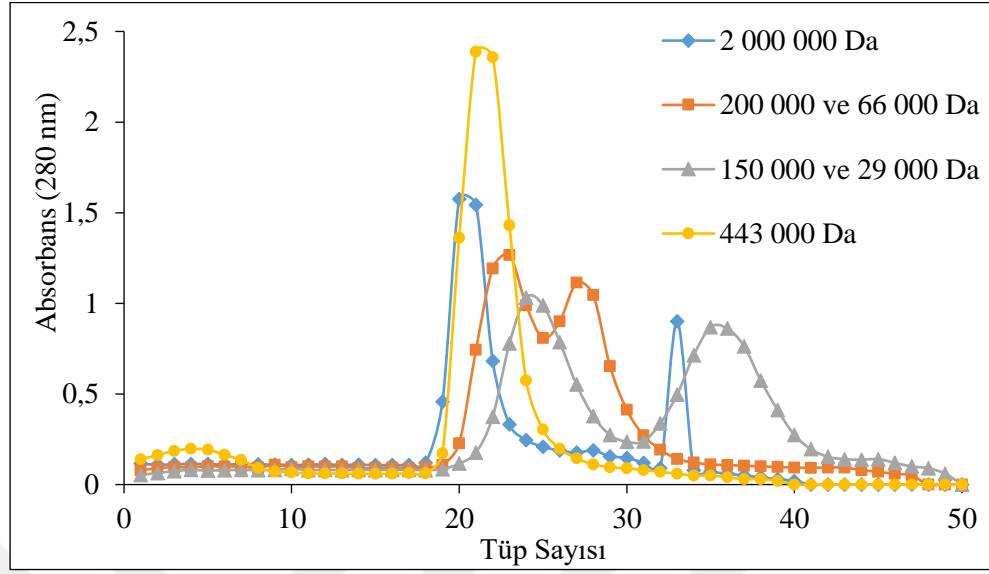
Şekil 4.15. Saflaştırılan hALDH1A3 enzimin $R_f/\log M_K$ grafiği



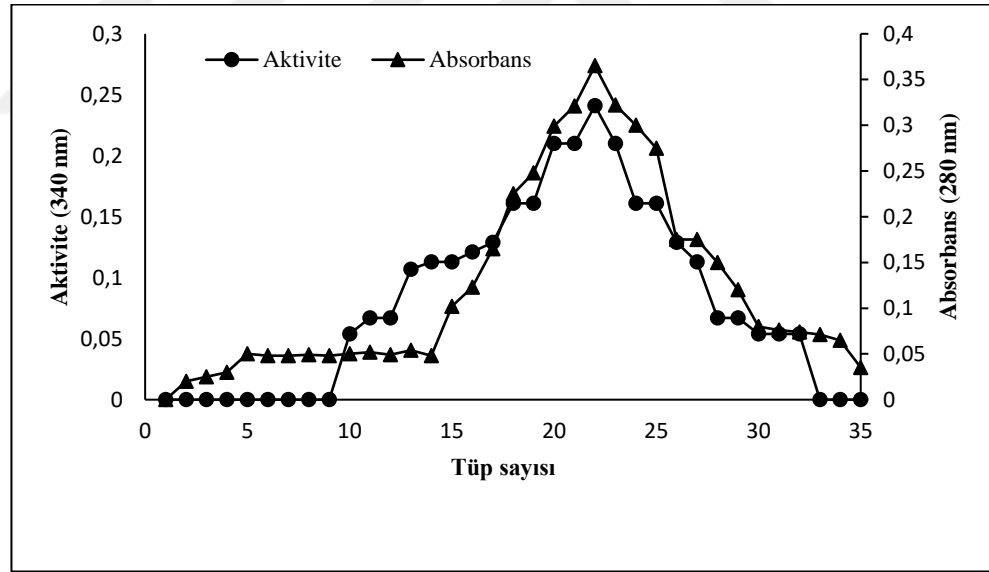
Şekil 4.16. Saflaştırılan hALDH2 enzimin R_f/log M_K grafiği

4.12. Jel filtrasyon kromatografisi ile hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin tabii molekül kütlesi tayini sonuçları

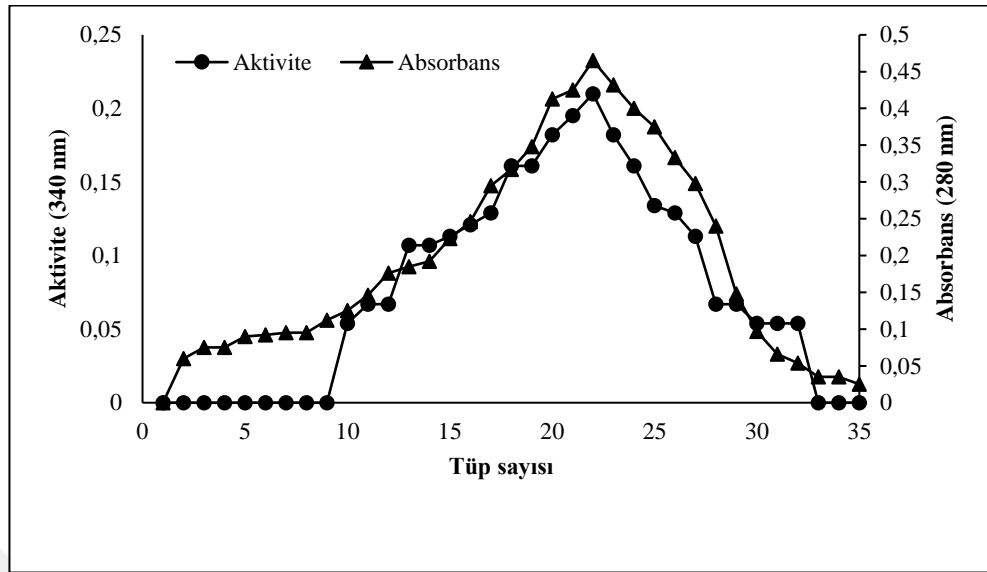
Enzimin molekül ağırlığını bulmak için, jel filtrasyon kolonundan proteinler geçirildi. Elüe edilen numunelerde 280 nm’de absorbans ölçümü yapılarak Şekil 4.17’deki grafik çizildi. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin elüsyon işleminden sonra tüp sayısına karşı aktivite değerleri ve 280 nm’de absorbans değerleri grafiği çizildi (Şekil 4.18-4.20). Standart proteinler için K_{av} değerleri hesaplandı ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 4.21’deki K_{av}-log M_K grafiği çizildi. Enzimlerin K_{av} değerleri hesaplanarak Şekil 4.21’deki grafikte yerine konulduğunda enzimlerin molekül kütlesi çizelgede verilen değerler olarak hesaplandı.



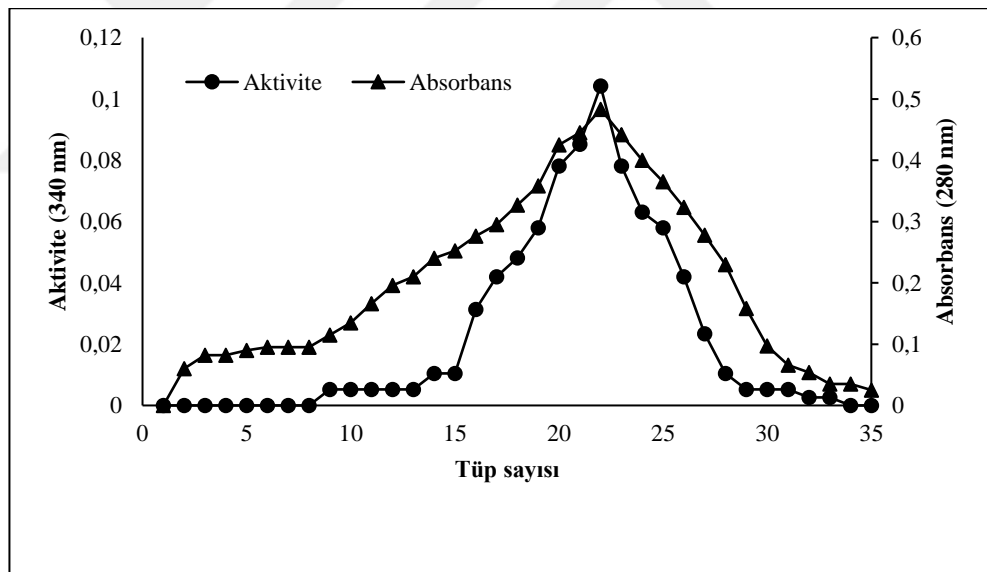
Şekil 4.17. Jel filtrasyon kolonundan alınan standart proteinlerin tüp sayısına karşılık 280 nm'deki absorptans değerleri



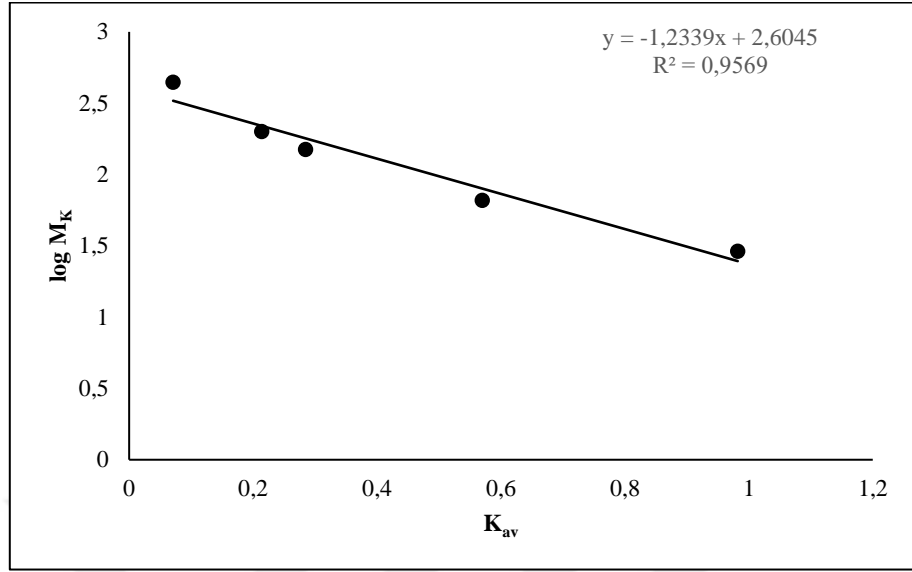
Şekil 4.18. Jel filtrasyon kolonundan alınan hALDH1A1 enziminin elüsyon grafiği



Şekil 4.19. Jel filtrasyon kolonundan alınan hALDH1A3 enziminin elüsyon grafiği



Şekil 4.20. Jel filtrasyon kolonundan alınan hALDH2 enziminin elüsyon grafiği



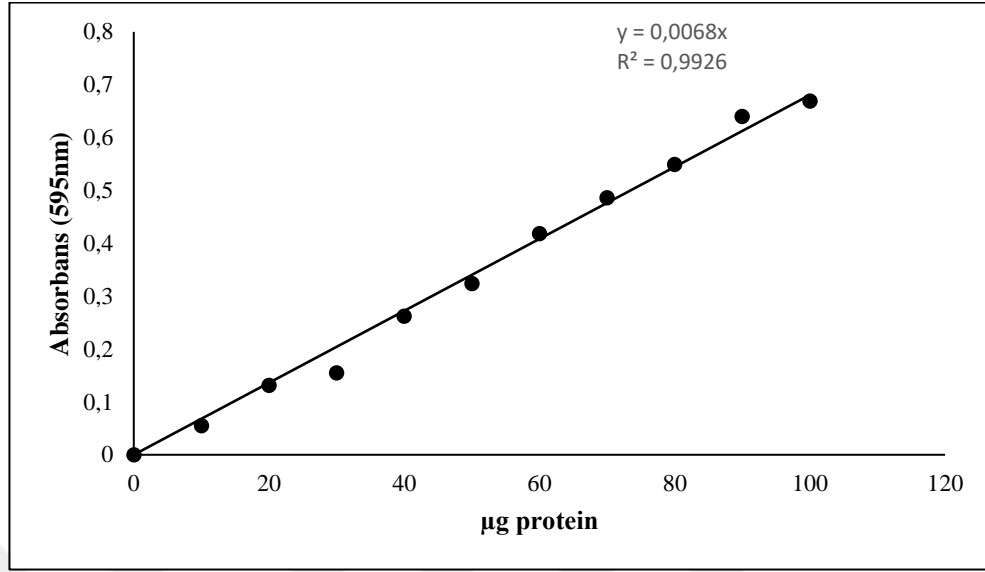
Şekil 4.21. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu çizilen K_{av} - $\log M_K$ grafiği

Çizelge 4.4. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin jel filtrasyon sonucu molekül kütleleri

Enzim	K_{av} değeri	Molekül kütlesi (kDa)
hALDH1A1	0,130	277,97
hALDH1A3	0,125	281,83
hALDH2	0,133	275,42

4.13. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Hem homojenatta hemde saflaştırılan enzimde bulunan protein miktarını tayin etmek için Bradford yöntemi kullanıldı. Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı gibi çizilen standart grafik yardımıyla afinite kromatografisi tekniği kullanılarak yapılan saflaştırmayla elde edilen enzim çözeltisinin protein miktarı belirlendi.



Şekil 4.22. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik

Çizelge 4.5. SUMO-hALDH1A1 füzyon proteinin Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,204	0,543	8	1,632	4,344	0,376	100	1
Ni-NTA Afinite sonrası SUMO-h ALDH1A1	0,482	0,02	3	1,446	0,060	24,100	88,600	64,100

Çizelge 4.6. SUMO-hALDH1A3 füzyon proteinin Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,322	0,633	8	2,576	5,064	0,509	100	1
Ni-NTA Afinite sonrası SUMO-h ALDH1A3	0,509	0,045	4	2,036	0,180	11,311	79,04	22,22

Çizelge 4.7. SUMO-hALDH2 füzyon proteinin Ni-NTA afinite kolonu ile saflaştırılma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,083	0,518	8	0,667	4,144	0,161	100	1
Ni-NTA Afinite sonrası SUMO-h ALDH1A3	0,135	0,023	3	0,405	0,069	5,870	60,72	36,46

4.14. hALDH1A1, hALDH1A3 ve ALDH2 Enzimleri İçin Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin optimum pH'sını belirlemeye yönelik çalışmada pH'sı 5,0-8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat, pH'sı 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris-HCl, pH'sı 9,0-10,5 aralığında 50 mM Glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanılarak enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.8-4.15). Yapılan çalışmalar neticesinde hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimleri için en uygun optimum pH'nın 50 mM Glisin-NaOH pH=9,0 tamponu olduğu tespit edildi (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24) hALDH2 enzimi içinse 50 mM NaH₂PO₄ pH=8,0 tamponu olduğu tespit edildi (Şekil 4.25). *p*-nitrofenil asetat substratı pH=8,0'den sonra parçalanma eğilimi gösterdiğinden dolayı hALDH2 enzimi için bu pH'nın üstüne çıkılmamıştır.

4.14.1. hALDH1A1 enzimi için Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

4.14.1.a. NaH₂PO₄ tamponu için optimum pH çalışması

Çizelge 4.8. 50 mM NaH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,040
5,5	0,040
6,0	0,054
6,5	0,067
7,0	0,086
7,5	0,107
8,0	0,142

4.14.1.b. Tris-HCl tamponu için optimum pH çalışması

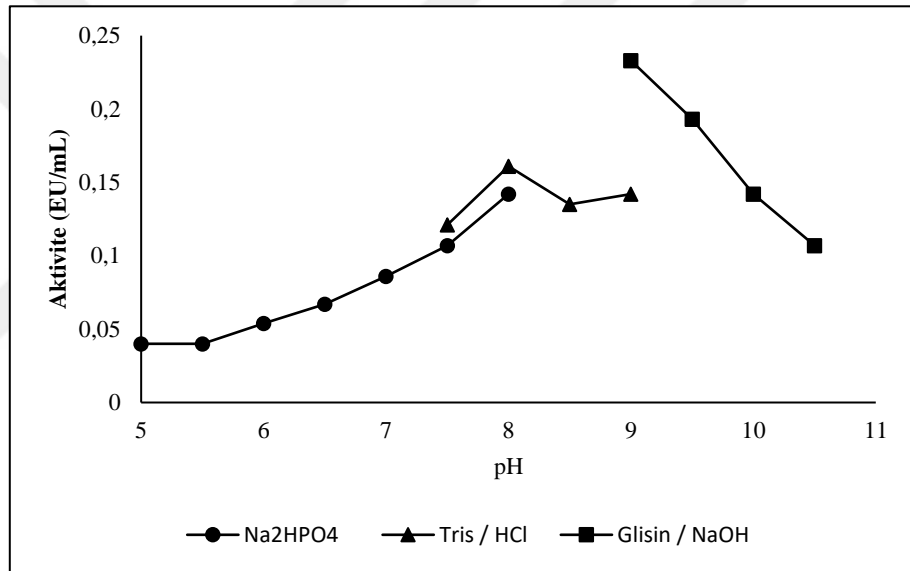
Çizelge 4.9. 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,5	0,121
8,0	0,161
8,5	0,135
9,0	0,142

4.14.1.c. Glisin/NaOH tamponu için optimum pH çalışması

Çizelge 4.10. 50 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
9,0	0,233
9,5	0,193
10,0	0,142
10,5	0,107



Şekil 4.23. 50 mM NaH₂PO₄, Tris-HCl ve Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak hALDH1A1 enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği

4.14.2. hALDH1A3 enzimi için Optimum pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

4.14.2.a. NaH₂PO₄ tamponu için optimum pH çalışması

Çizelge 4.11. 50 mM NaH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,032
5,5	0,040
6,0	0,048
6,5	0,054
7,0	0,075
7,5	0,096
8,0	0,107

4.14.2.b. Tris-HCl tamponu için optimum pH çalışması

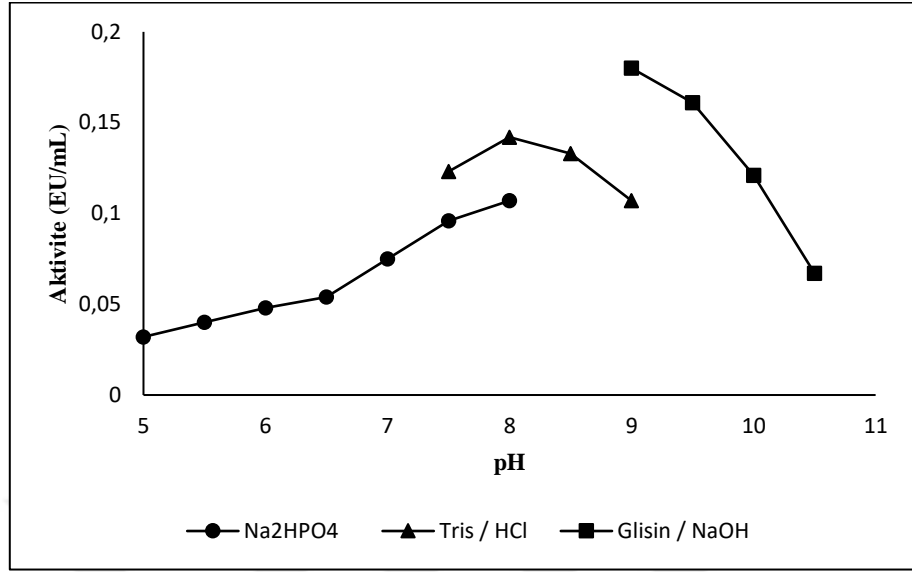
Çizelge 4.12. 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,5	0,123
8,0	0,142
8,5	0,133
9,0	0,107

4.14.2.c. Glisin/NaOH tamponu için optimum pH çalışması

Çizelge 4.13. 50 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
9,0	0,180
9,5	0,161
10,0	0,121
10,5	0,067



Şekil 4.24. 50 mM NaH₂PO₄, Tris-HCl ve Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak hALDH1A3 enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği

4.14.3. hALDH2 enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

4.14.3.a. NaH₂PO₄ tamponu için optimum pH çalışması

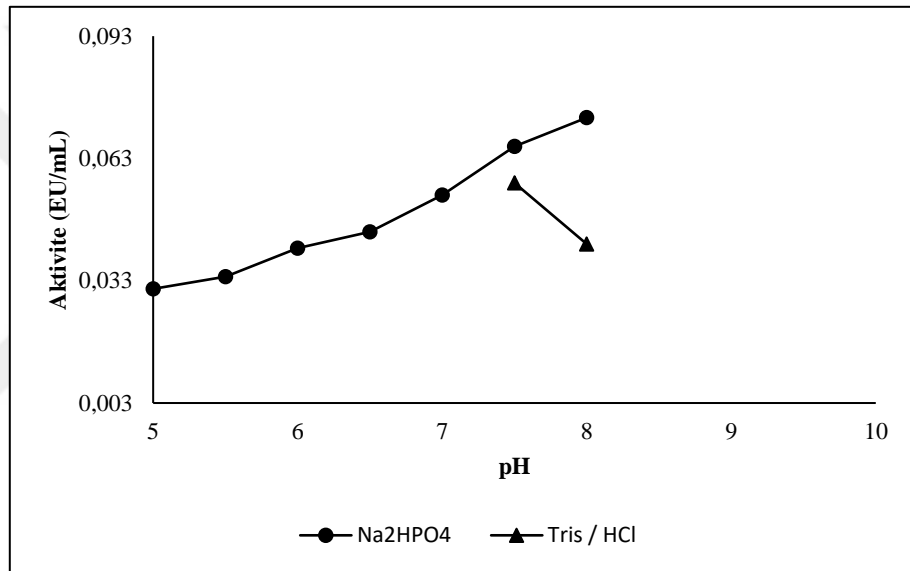
Çizelge 4.14. 50 mM NaH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak hALDH2 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,031
5,5	0,034
6,0	0,041
6,5	0,045
7,0	0,054
7,5	0,066
8,0	0,073

4.14.3.b. Tris-HCl tamponu için optimum pH çalışması

Çizelge 4.15. 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hALDH2 enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,5	0,057
8,0	0,042



Şekil 4.25. 50 mM NaH₂PO₄ ve Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak hALDH2 enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği

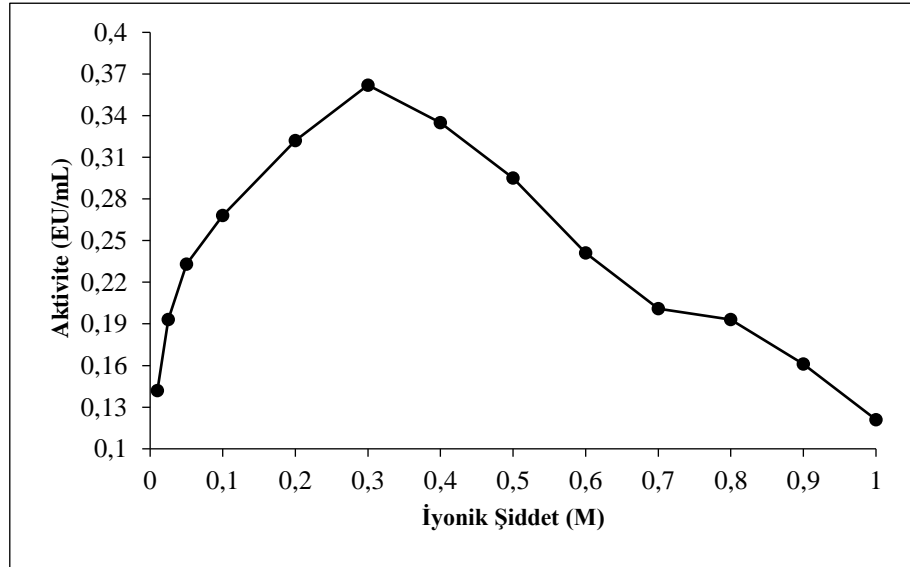
4.15. Optimum İyonik Şiddetin Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimlerinin optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla maksimum aktivite gösterdiği Glisin/NaOH pH= 9,0 tamponunda; hALDH2 enzimi içinse NaH₂PO₄ pH= 8,0 tamponunda 10,25,50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 mM'lık tampon çözeltiler hazırlandı. Enzimlerin aktivite ölçümleri farklı konsantrasyonlardaki tamponlarda yapıldı ve konsantrasyonuna (mM) karşı aktivite değerlerinden (EU/mL) oluşan grafik çizildi (Çizelge 4.16- 4.18, Şekil 4.26-4.28). Yapılan çalışmalar sonucu hALDH1A1 enzimi için en uygun optimum iyonik şiddetin

300 mM Glisin/NaOH, hALDH1A3 enzimi için en uygun optimum iyonik şiddetin 200 mM Glisin/NaOH, hALDH2 enzimi içinse en uygun optimum iyonik şiddetin 600 mM Na_2HPO_4 , olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.16. hALDH1A1 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

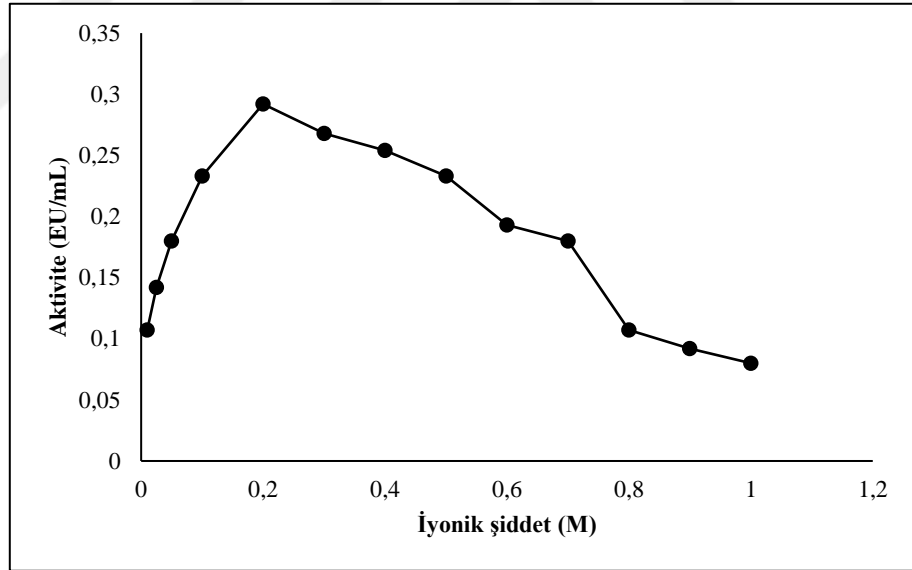
[Glisin/NaOH] (mM)	Aktivite (EU/mL)
10	0,142
25	0,193
50	0,233
100	0,268
200	0,322
300	0,362
400	0,335
500	0,295
600	0,241
700	0,201
800	0,193
900	0,161
1000	0,121



Şekil 4.26. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH=9,0) kullanılarak hALDH1A1 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

Çizelge 4.17. hALDH1A3 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Glisin/NaOH tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

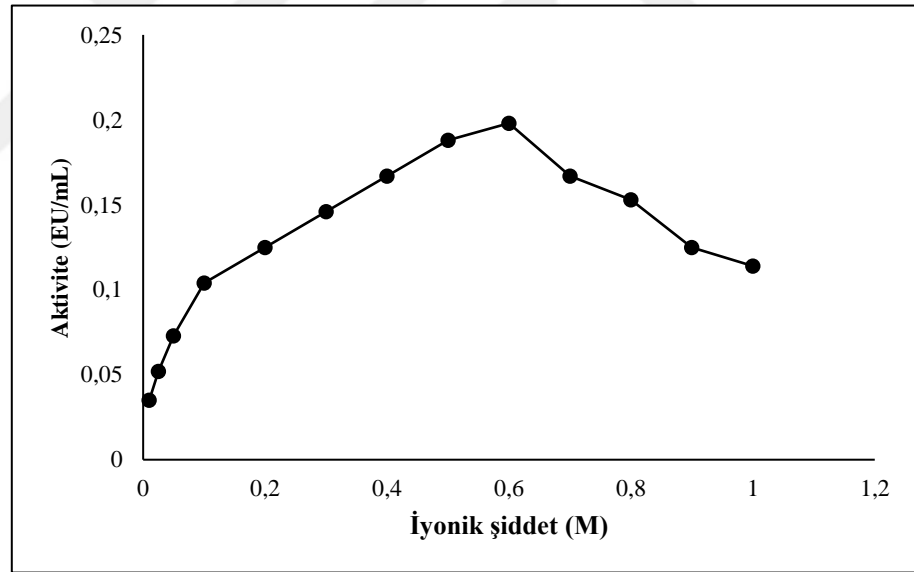
[Glisin/NaOH] (mM)	Aktivite (EU/mL)
10	0,107
25	0,142
50	0,180
100	0,233
200	0,292
300	0,268
400	0,254
500	0,233
600	0,193
700	0,180
800	0,107
900	0,092
1000	0,080



Şekil 4.27. Değişik konsantrasyonlardaki Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH=9,0) kullanılarak hALDH1A3 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

Çizelge 4.18. hALDH2 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için NaH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

$[\text{NaH}_2\text{PO}_4]$ (mM)	Aktivite (EU/mL)
10	0,035
25	0,052
50	0,073
100	0,104
200	0,125
300	0,146
400	0,167
500	0,188
600	0,198
700	0,167
800	0,153
900	0,125
1000	0,114



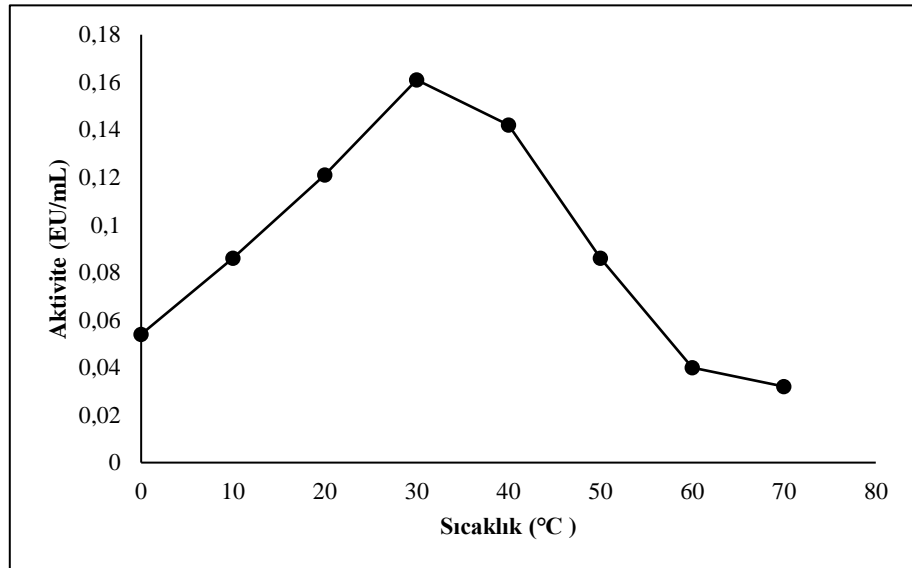
Şekil 4.28. Değişik konsantrasyonlardaki NaH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH=8,0) kullanılarak hALDH2 enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.16. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin optimum sıcaklıklarını belirlerken optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip tampon çözelti kullanıldı. 0°C-70°C arasında 10°C'lik sıcaklık farkı oluşturularak aktivite ölçümü yapıldı (Çizelge 4.19- 4.21 ve Şekil 4.29- 4.31). Sonuç olarak hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimleri için en uygun optimum sıcaklığın 30°C hALDH2 enzimi içinse 40°C olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.19. hALDH1A1 enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları

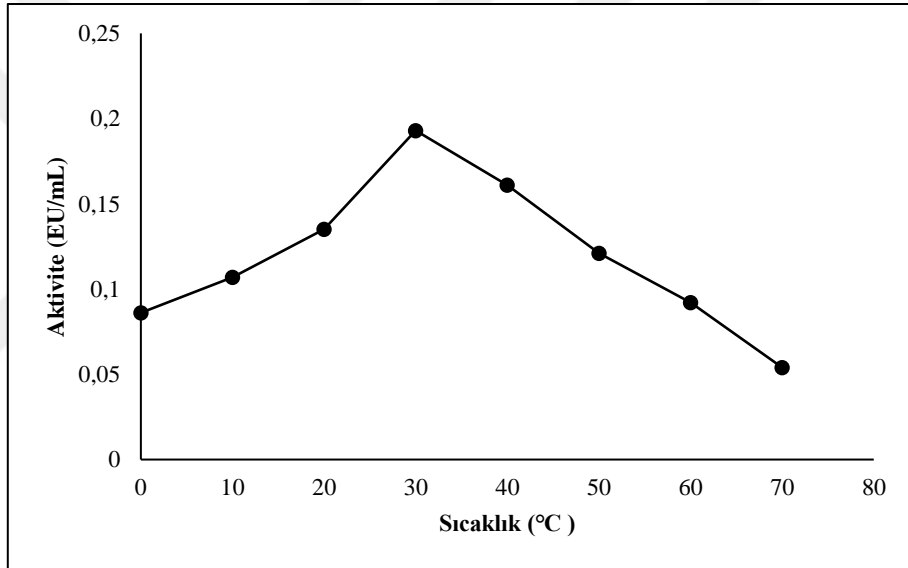
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/mL)
0	0,054
10	0,086
20	0,121
30	0,161
40	0,142
50	0,086
60	0,040
70	0,032



Şekil 4.29. hALDH1A1 enzimi için optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmasının sonucunda çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

Çizelge 4.20. hALDH1A3 enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları

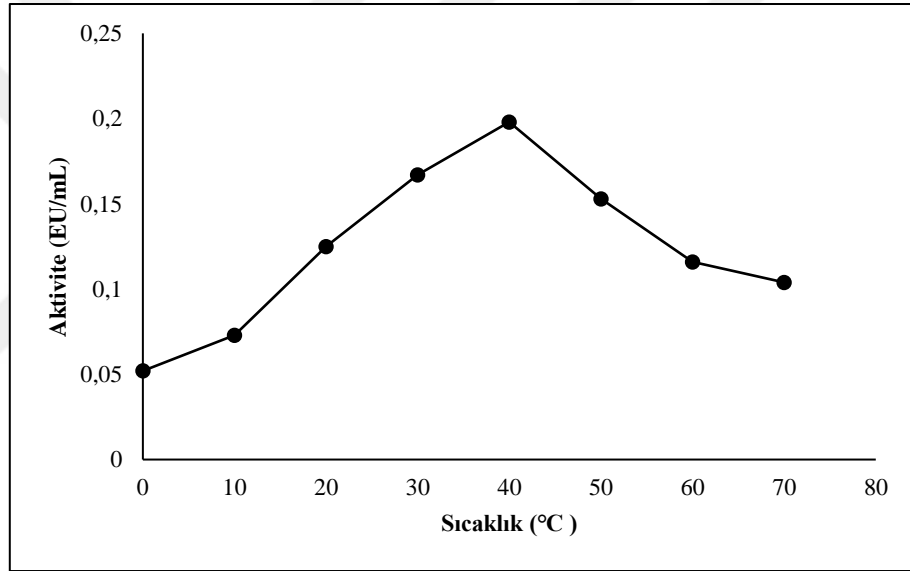
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/mL)
0	0,086
10	0,107
20	0,135
30	0,193
40	0,161
50	0,121
60	0,092
70	0,054



Şekil 4.30. hALDH1A3 enzimi için optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmasının sonucunda çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

Çizelge 4.21. hALDH2 enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan sıcaklık-aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/mL)
0	0,052
10	0,073
20	0,125
30	0,167
40	0,198
50	0,153
60	0,116
70	0,104



Şekil 4.31. hALDH2 enzimi için optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi çalışmasının sonucunda çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.17. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Enzimleri Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

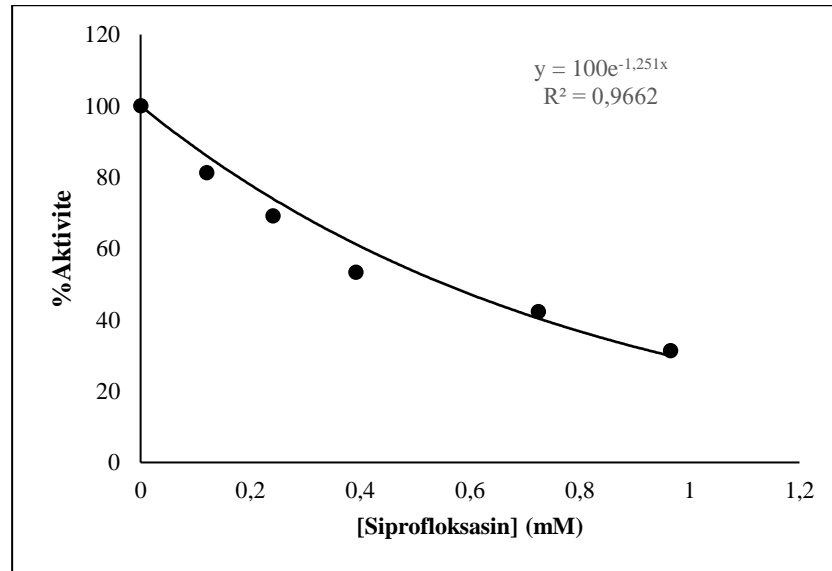
hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak bahsedilen enzimlerin aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri Çizelge 4.22-4.63'de verildi. Ayrıca konsantrasyona karşı % aktivite

olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.32- 4.73’da ve bu grafiklerden elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.64-4.66’da verildi.

4.17.1. hALDH1A1, enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Çizelge 4.22. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin’in etkisi

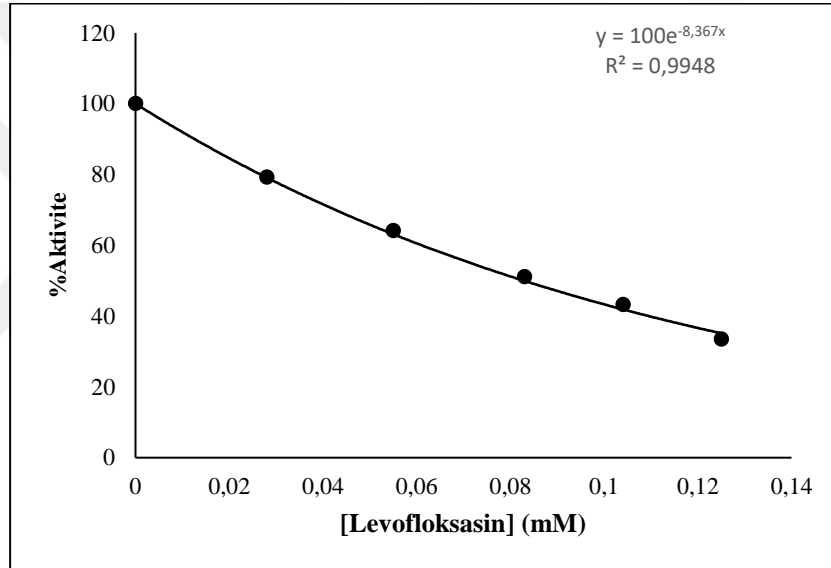
%Aktivite	[Siprofloksasin] mM
100	0
81,23	0,12
69,12	0,24
53,30	0,39
42,23	0,72
31,35	0,97



Şekil 4.32. Siprofloksasin’in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.23. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisi

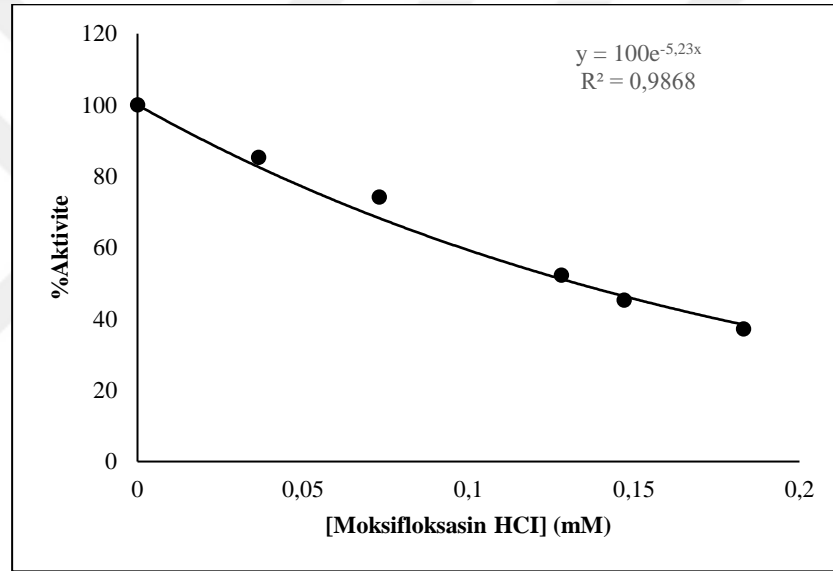
%Aktivite	[Levofloksasin] mM
100	0
79,25	0,028
64,12	0,055
51,13	0,083
43,23	0,104
33,45	0,125



Şekil 4.33. Levofloksasin'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

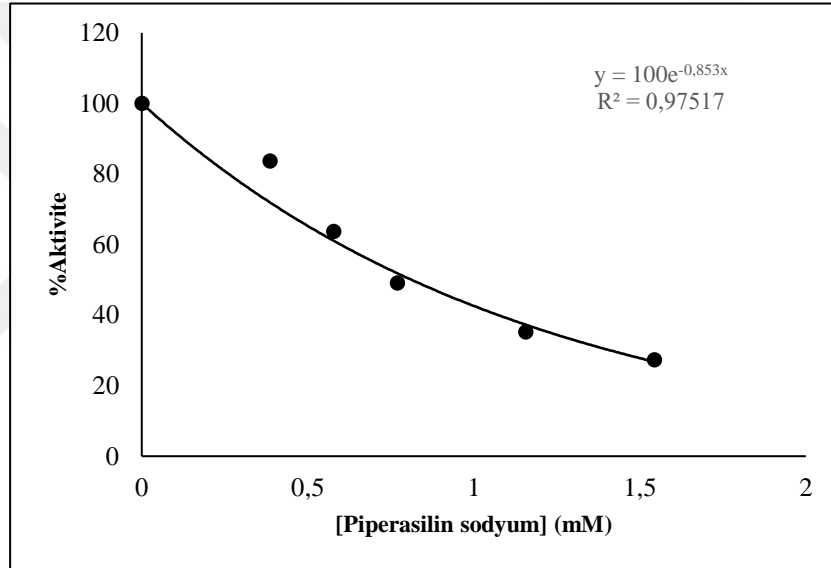
Çizelge 4.24. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi

%Aktivite	[Moksifloksasin HCl] mM
100	0
85,24	0,037
74,13	0,073
52,25	0,128
45,26	0,147
37,12	0,183

**Şekil 4.34.** Moksifloksasin HCl'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.25. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi

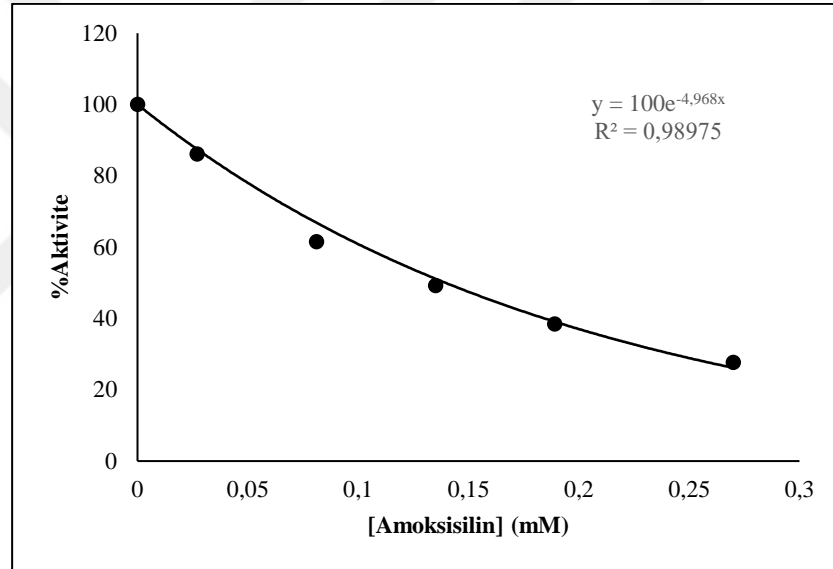
%Aktivite	[Piperasilin sodyum] mM
100	0
83,64	0,386
63,64	0,578
49,09	0,77
35,14	1,156
27,27	1,544



Şekil 4.35. Piperasilin sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.26. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine amoksisilin'in etkisi

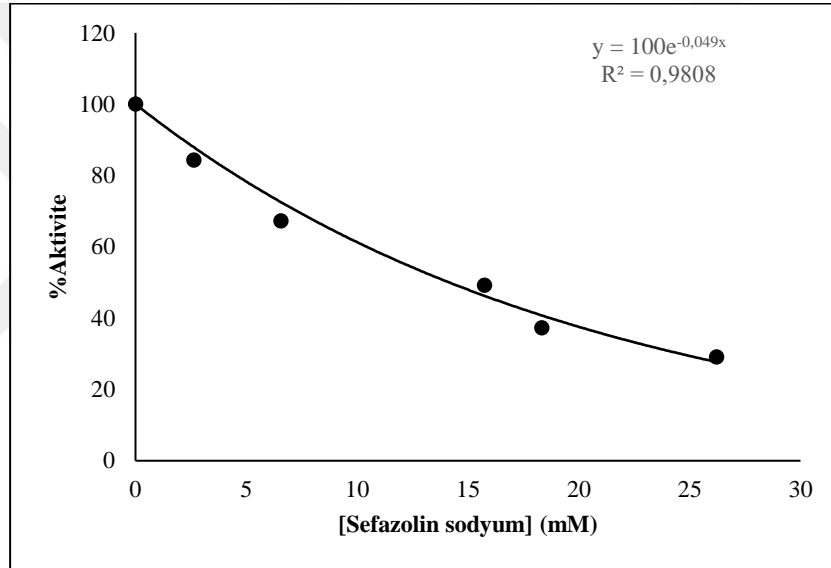
%Aktivite	[Amoksisilin] mM
100	0
86,15	0,027
61,54	0,081
49,23	0,135
38,46	0,189
27,69	0,27



Şekil 4.36. Amoksisilin'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.27. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi

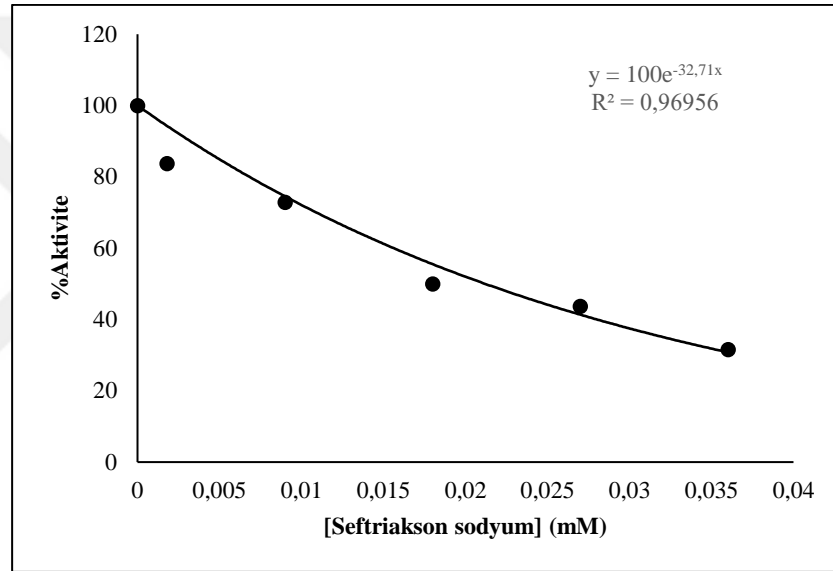
%Aktivite	[Sefazolin sodyum] mM
100	0
84,34	2,62
67,23	6,56
49,23	15,74
37,23	18,32
29,12	26,20



Şekil 4.37. Sefazolin sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.28. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisi

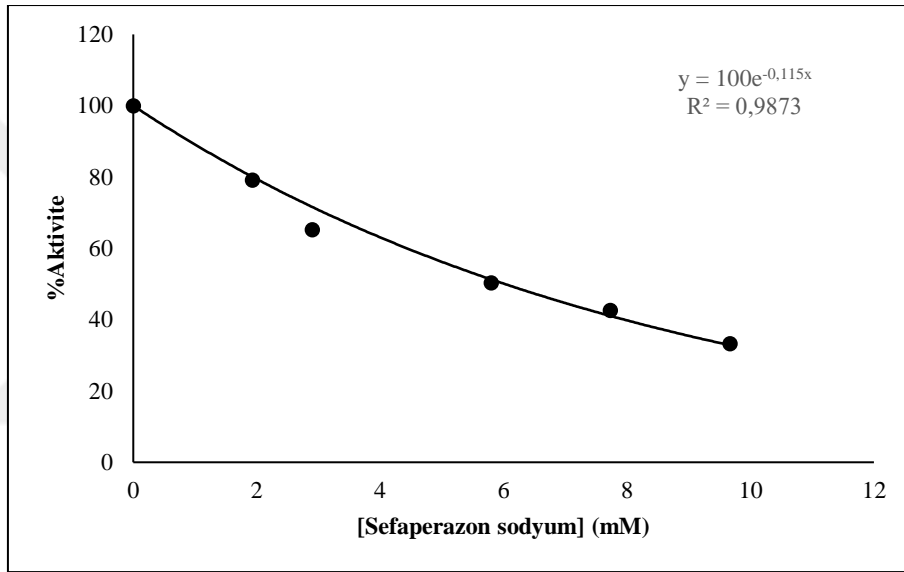
%Aktivite	[Seftriakson sodyum] mM
100	0
83,7	0,0018
72,83	0,009
50,00	0,018
43,67	0,027
31,52	0,036



Şekil 4.38. Seftriakson sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.29. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisi

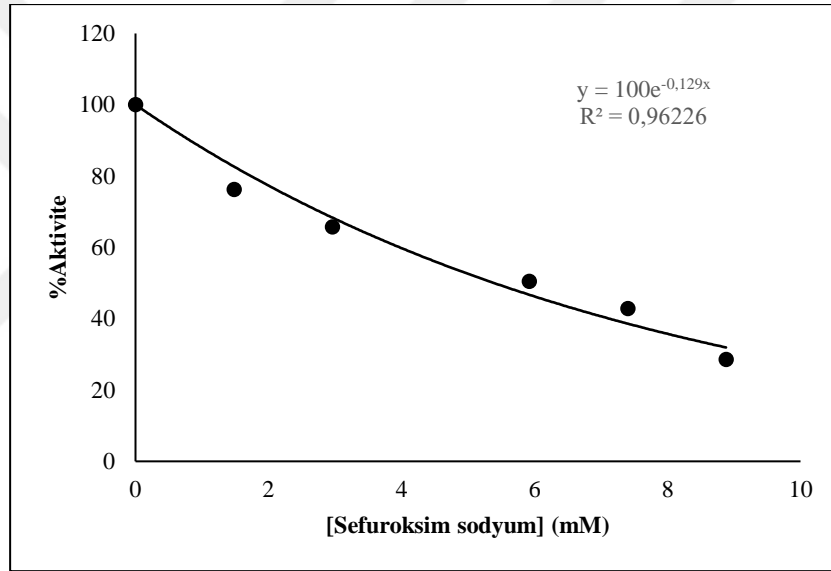
%Aktivite	[Sefaperazon sodyum] mM
100	0
79,13	1,93
65,24	2,90
50,34	5,80
42,56	7,73
33,24	9,67



Şekil 4.39. Sefaperazon sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.30. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi

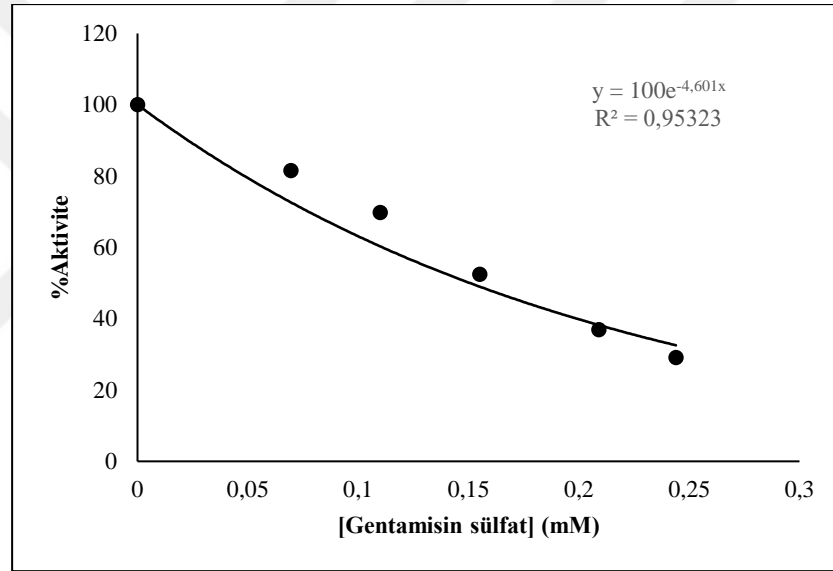
%Aktivite	[Sefuroksim sodyum] mM
100	0
76,19	1,48
65,71	2,96
50,48	5,92
42,86	7,40
28,57	8,88



Şekil 4.40. Sefuroksim sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.31. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisi

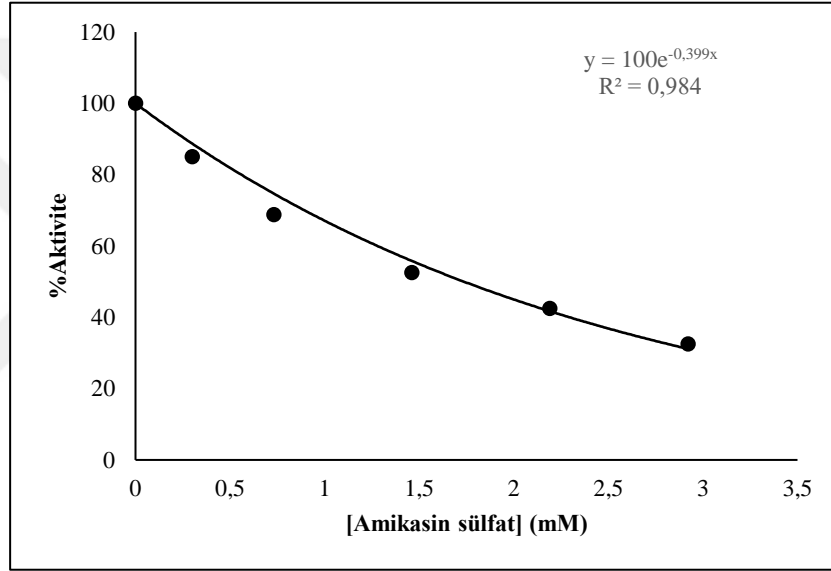
%Aktivite	[Gentamisin sülfat] mM
100	0
81,55	0,070
69,79	0,110
52,4	0,155
36,89	0,209
29,12	0,244



Şekil 4.41. Gentamisin sülfat'ın hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.32. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi

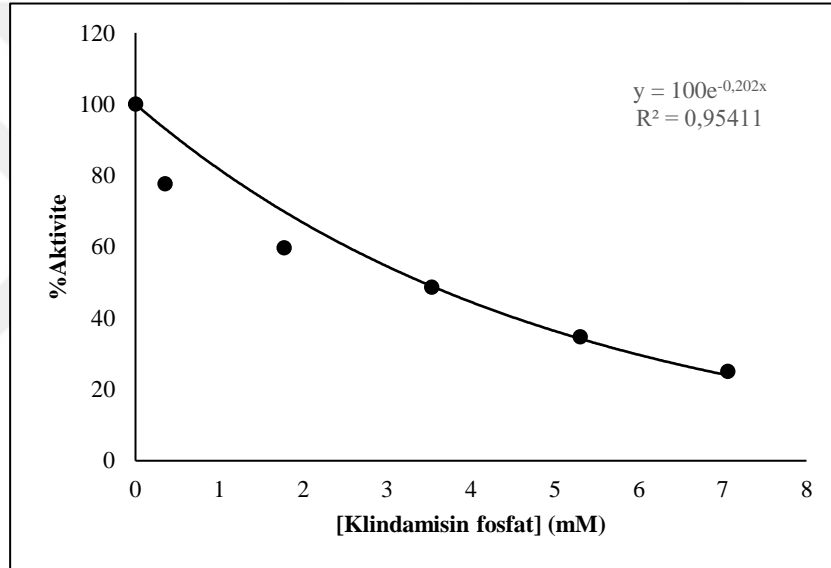
%Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
85	0,31
68,75	0,73
52,5	1,46
42,5	2,19
32,5	2,92



Şekil 4.42. Amikasin sülfat'ın hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.33. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisi

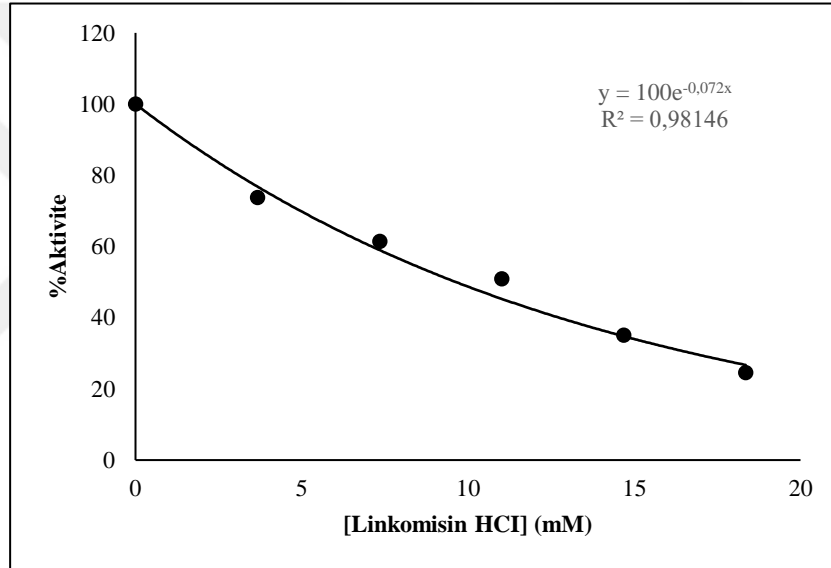
%Aktivite	[Klindamisin fosfat] mM
100	0
77,61	0,35
59,72	1,77
48,61	3,53
34,72	5,3
25	7,06



Şekil 4.43. Klindamisin fosfat'ın hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.34. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi

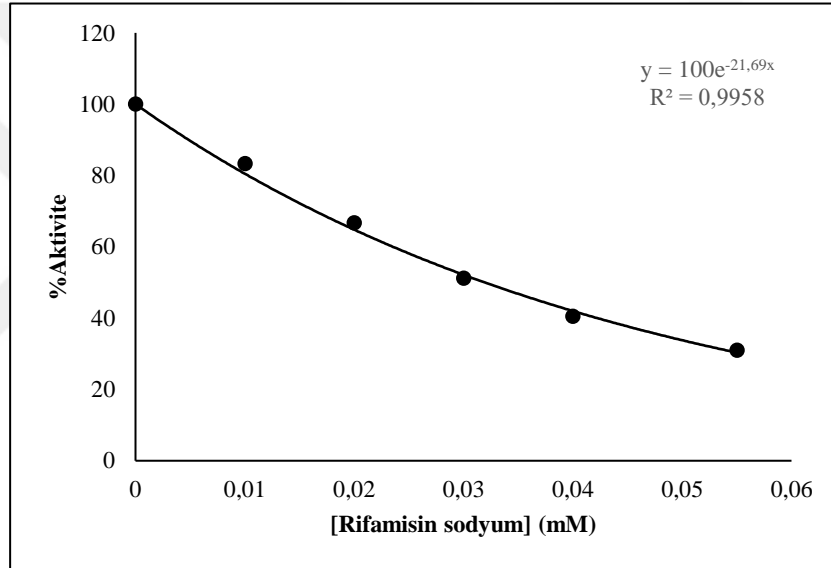
%Aktivite	[Linkomisin HCl] mM
100	0
73,68	3,67
61,40	7,34
50,88	11,01
35,09	14,68
24,56	18,35



Şekil 4.44. Linkomisin HCl'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.35. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyum'un etkisi

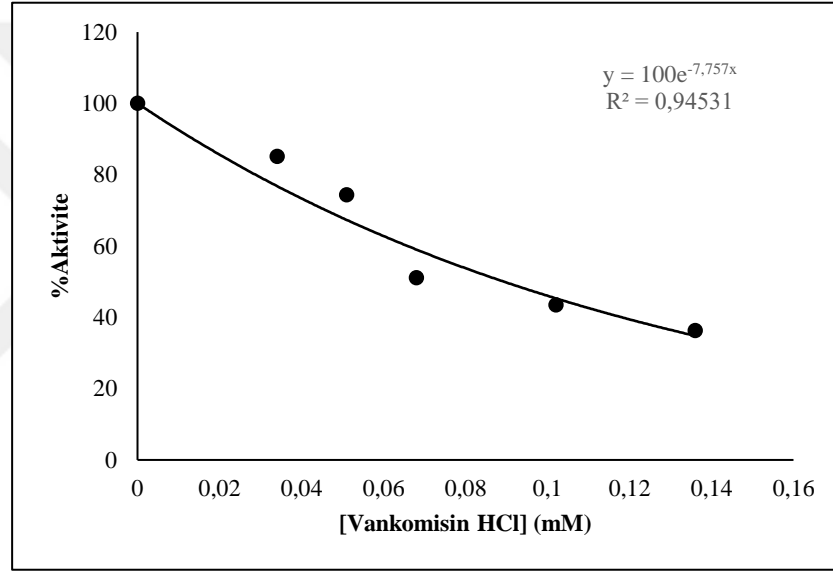
%Aktivite	[Klindamisin fosfat] mM
100	0
83,33	0,011
66,67	0,022
51,19	0,033
40,48	0,044
30,95	0,055



Şekil 4.45. Rifamisin sodyum'un hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.36. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisi

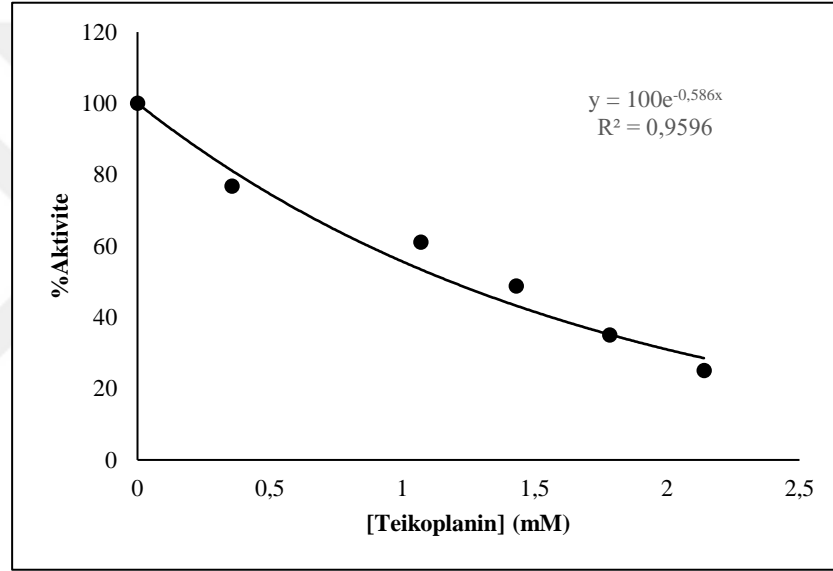
%Aktivite	[Vankomisin HCl] mM
100	0
85,12	0,034
74,32	0,051
51,12	0,068
43,45	0,102
36,27	0,136



Şekil 4.46. Vankomisin HCl'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.37. hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisi

%Aktivite	[Teikoplanin] mM
100	0
76,75	0,357
61,00	1,071
48,75	1,430
35	1,783
25	2,139

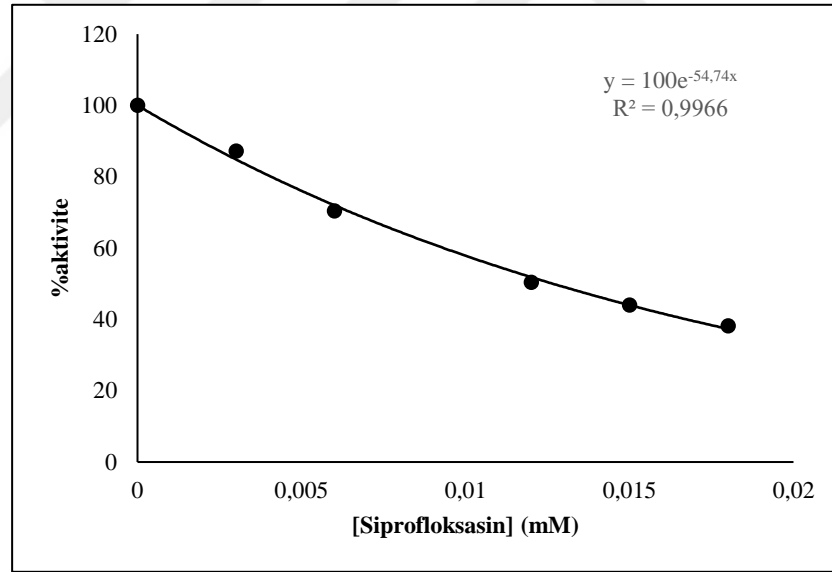


Şekil 4.47. Teikoplanin'in hALDH1A1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.17.2. hALDH1A1, Enzimi Üzerine Bazı antibiyotiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Çizelge 4.38. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisi

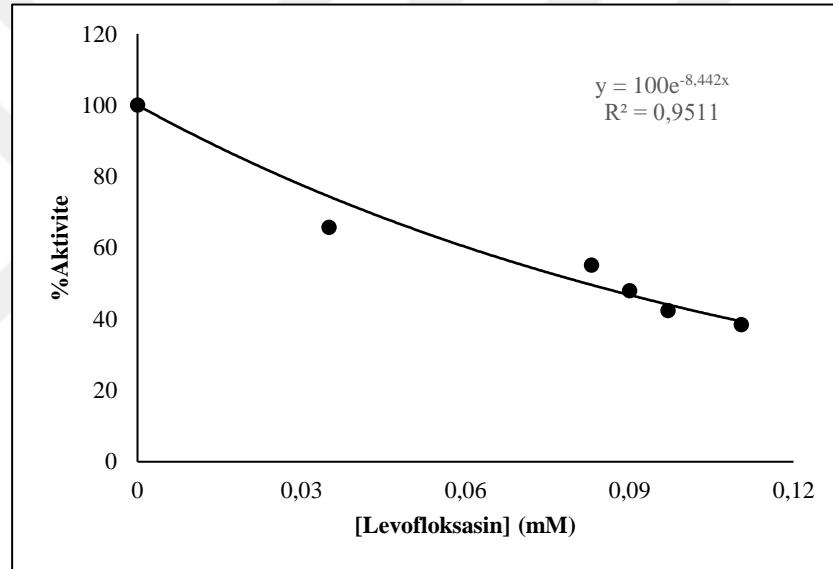
%Aktivite	[Siprofloksasin] mM
100	0
87,2	0,003
70,4	0,006
50,4	0,012
44	0,015
38,16	0,018



Şekil 4.48. Siprofloksasin'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.39. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisi

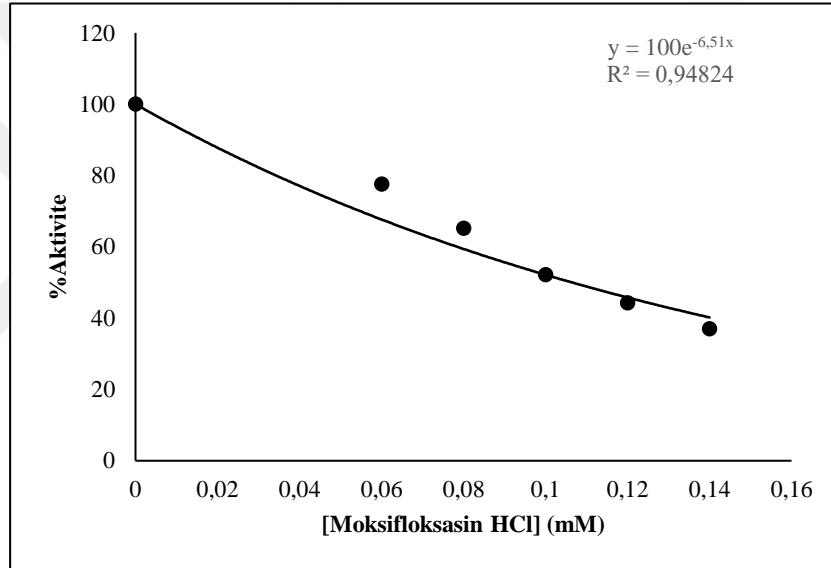
%Aktivite	[Levofloksasin] mM
100	0
87,2	0,003
70,4	0,006
50,4	0,012
44	0,015
38,16	0,018



Şekil 4.49. Levofloksasin'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

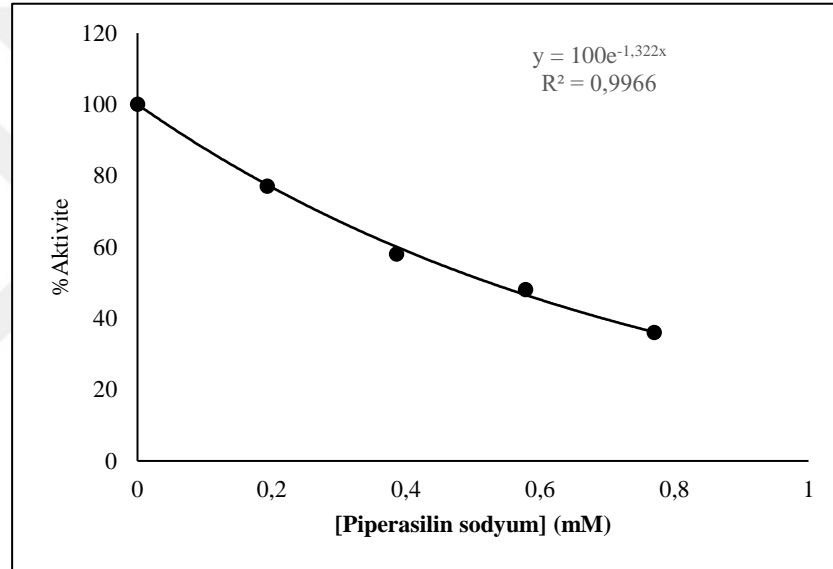
Çizelge 4.40. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi

%Aktivite	[Moksifloksasin HCl] mM
100	0
77,57	0,06
65,13	0,08
52,16	0,1
44,29	0,12
37	0,14

**Şekil 4.50.** Moksifloksasin HCl'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.41. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisi

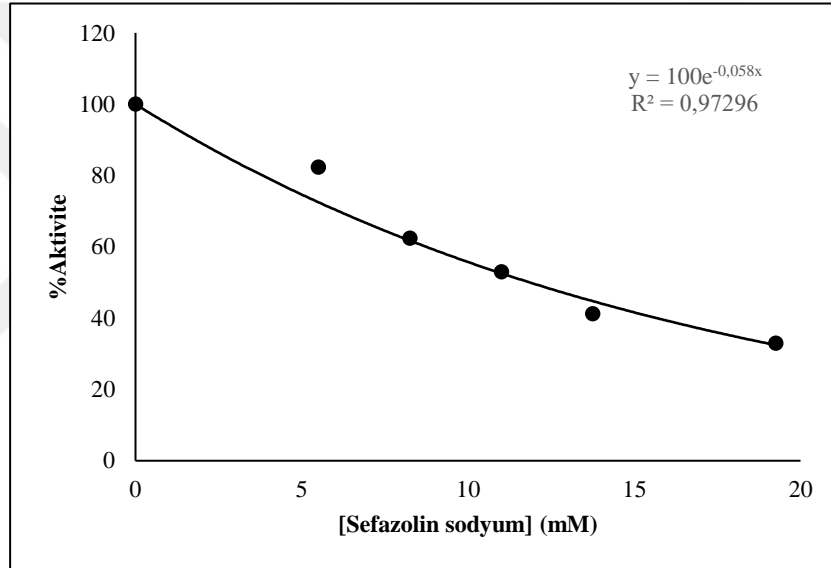
%Aktivite	[Piperasilin sodyum] mM
100	0
77,00	0,193
58,00	0,386
48,00	0,578
36,00	0,770
22,00	1,155



Şekil 4.51. Piperasilin sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.42. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi

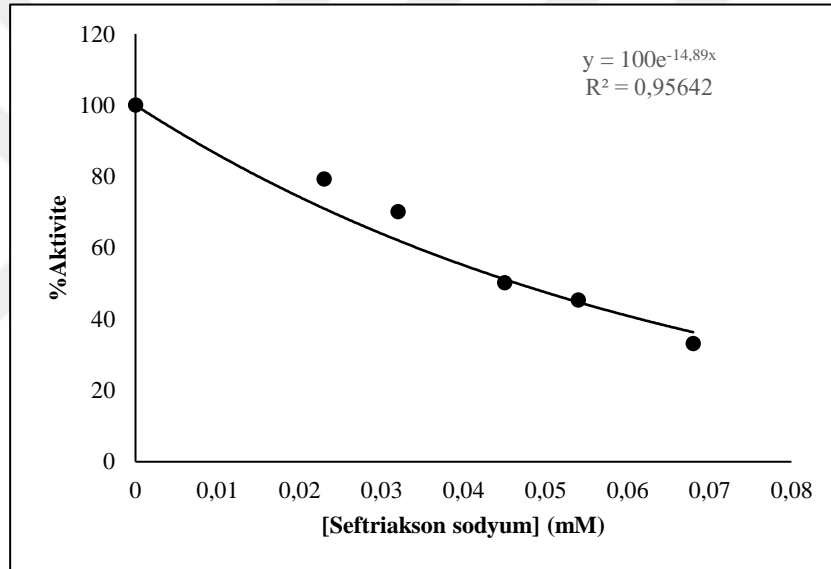
%Aktivite	[Sefazolin sodyum] mM
100	0
82,35	5,5
62,35	8,25
52,94	11,00
41,18	13,75
32,94	19,25



Şekil 4.52. Sefazolin sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.43. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisi

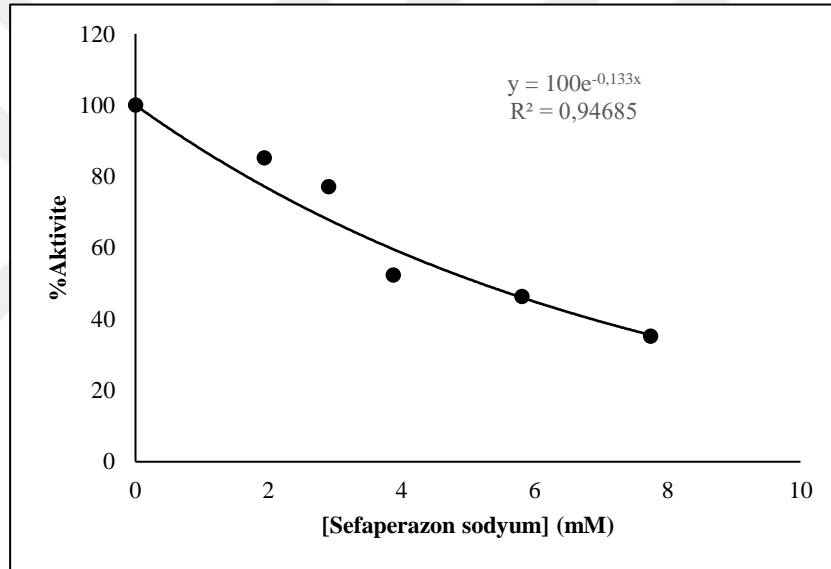
%Aktivite	[Seftriakson sodyum] mM
100	0
79,25	0,023
70,12	0,032
50,21	0,045
45,36	0,054
33,13	0,068



Şekil 4.53. Seftriakson sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.44. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisi

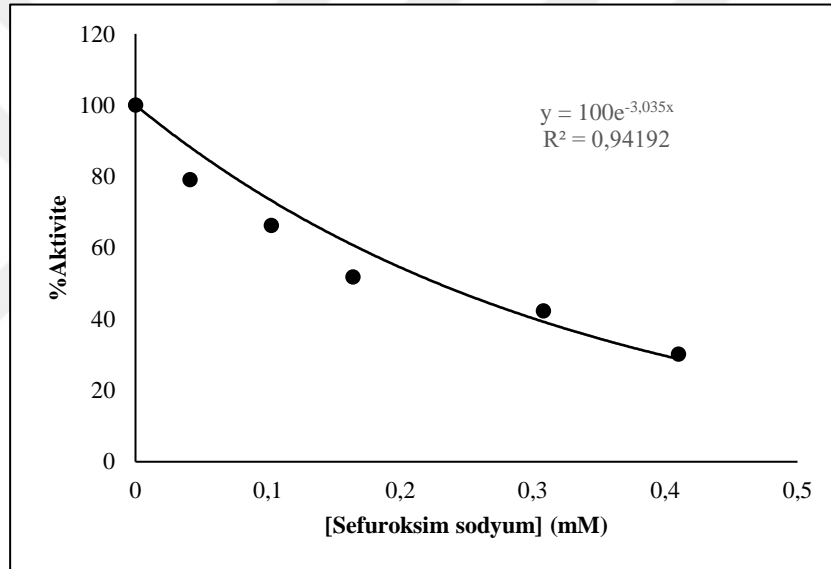
%Aktivite	[Sefaperazon sodyum] mM
100	0
85,17	1,936
77,13	2,904
52,34	3,872
46,34	5,808
35,15	7,744



Şekil 4.54. Sefaperazon sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.45. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi

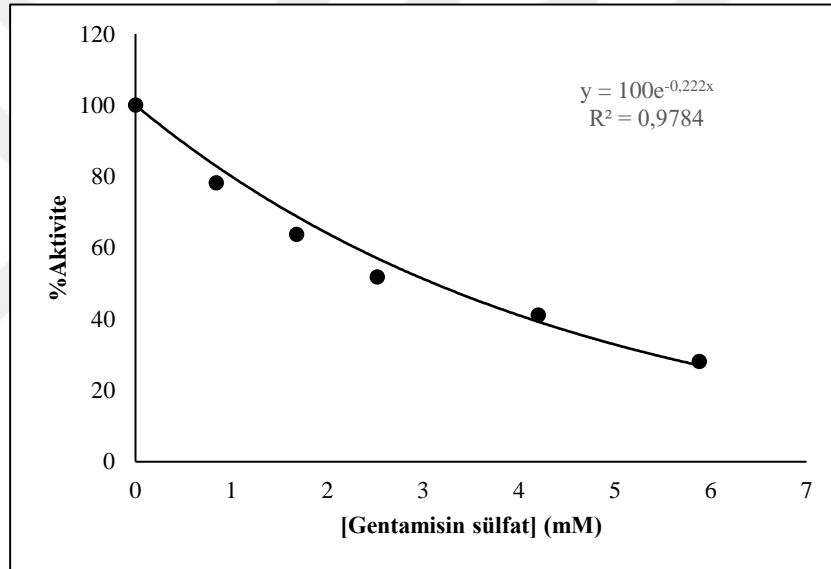
%Aktivite	[Sefuroksim sodyum] mM
100	0
79,12	0,041
66,28	0,102
51,79	0,164
42,27	0,308
30,14	0,410



Şekil 4.55. Sefuroksim sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.46. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisi

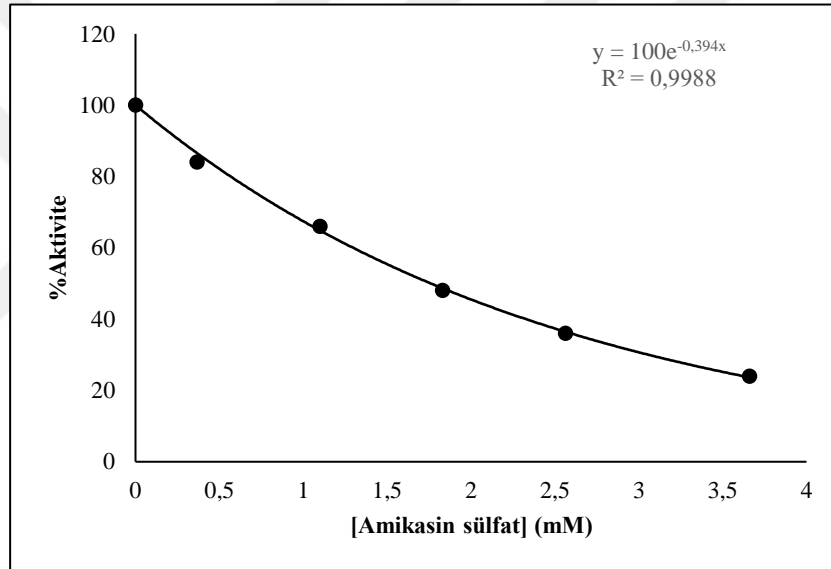
%Aktivite	[Gentamisin sülfat] mM
100	0
78,23	0,84
63,76	1,68
51,77	2,52
41,13	4,20
28,12	5,88



Şekil 4.56. Gentamisin sülfat'ın hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.47. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi

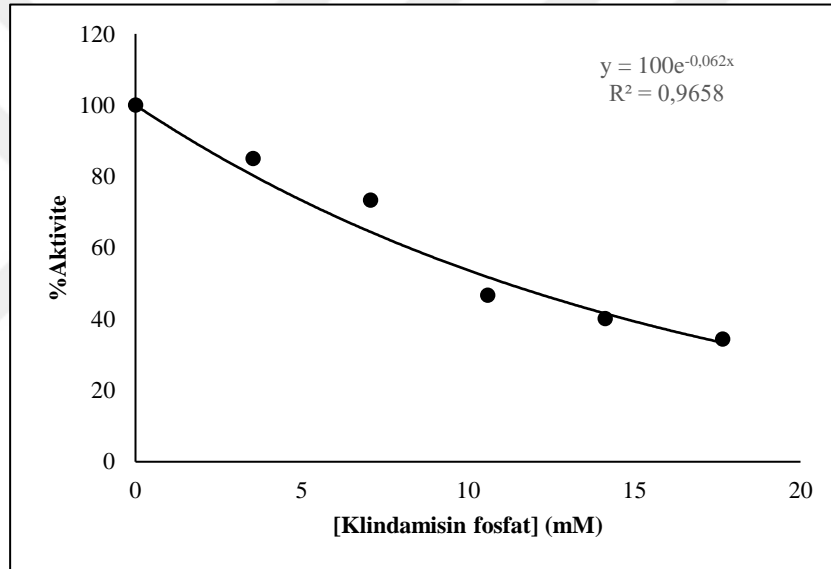
%Aktivite	[Amikasin Sülfat] mM
100	0
84	0,366
66	1,098
48	1,830
36	2,562
24	3,660



Şekil 4.57. Amikasin sülfat'ın hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

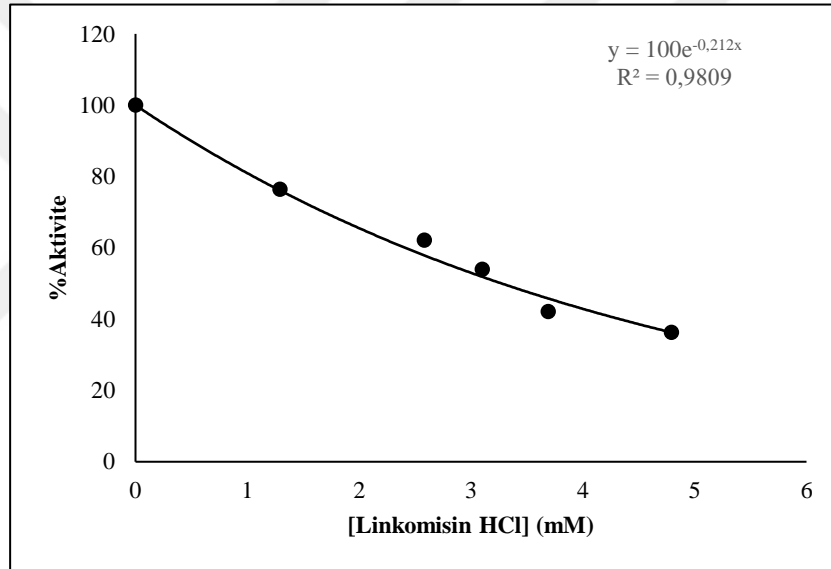
Çizelge 4.48. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisi

%Aktivite	[Klindamisin fosfat] mM
100	0
85	3,53
73,33	7,06
46,66	10,59
40,15	14,12
34,35	17,65

**Şekil 4.58.** Klindamisin fosfat'ın hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.49. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi

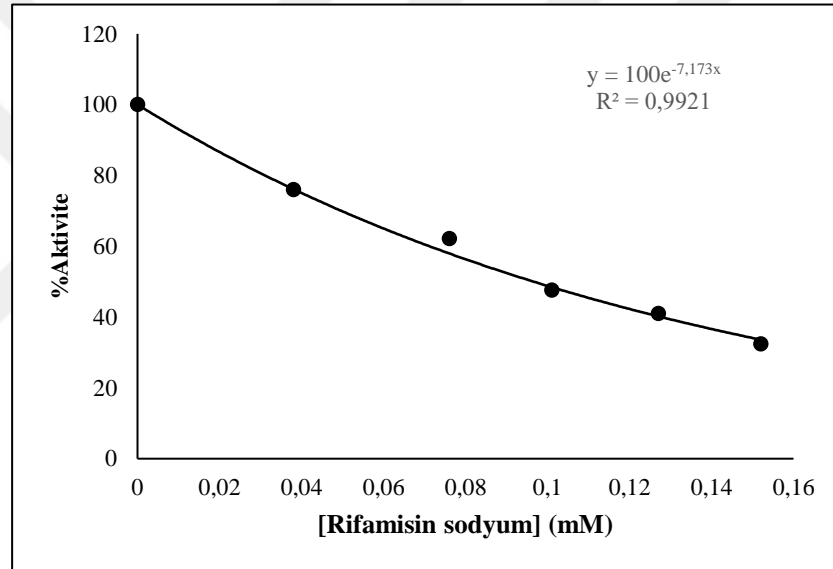
%Aktivite	[Linkomisin HCl] mM
100	0
76,43	1,29
62,15	2,58
53,98	3,10
42,13	3,69
36,25	4,79



Şekil 4.59. Linkomisin HCl'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.50. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine rifamisin sodyum'un etkisi

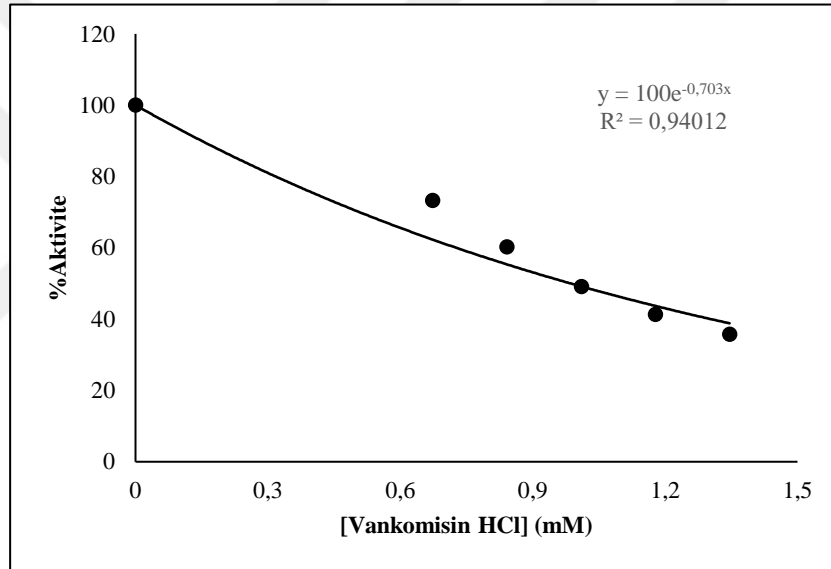
%Aktivite	[Rifamisin sodyum] mM
100	0
75,95	0,038
62,12	0,076
47,62	0,101
40,95	0,127
32,38	0,152



Şekil 4.60. Rifamisin sodyum'un hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.51. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisi

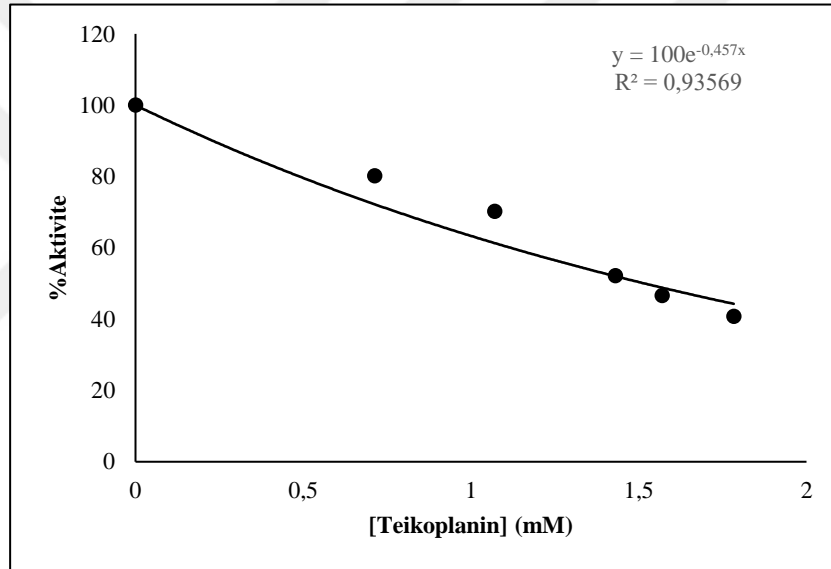
%Aktivite	[Vankomisin HCl] mM
100	0
73,25	0,673
60,26	0,841
49,13	1,01
41,27	1,178
35,74	1,346



Şekil 4.61. Vankomisin HCl'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.52. hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisi

%Aktivite	[Teikoplanin] mM
100	0
80,16	0,713
70,24	1,070
52,14	1,430
46,57	1,569
40,76	1,783

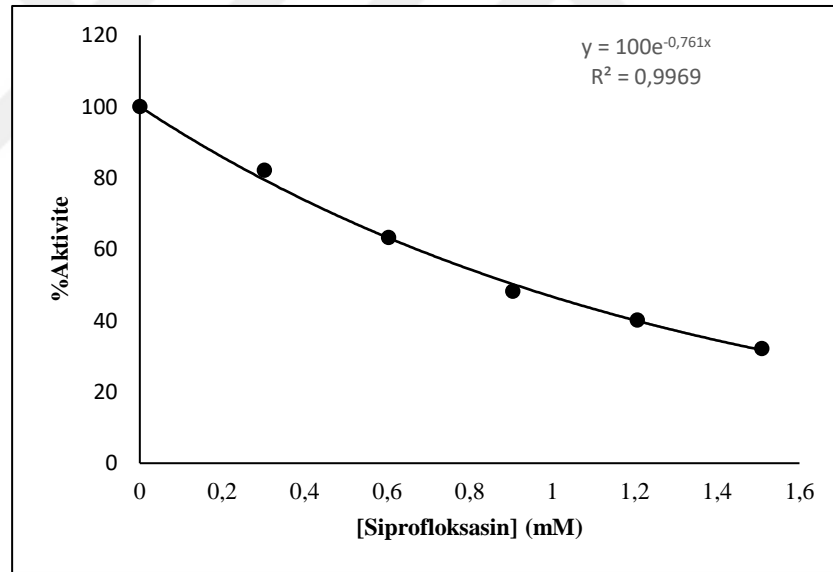


Şekil 4.62. Teikoplanin'in hALDH1A3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.17.3. hALDH2, enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Çizelge 4.53. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisi

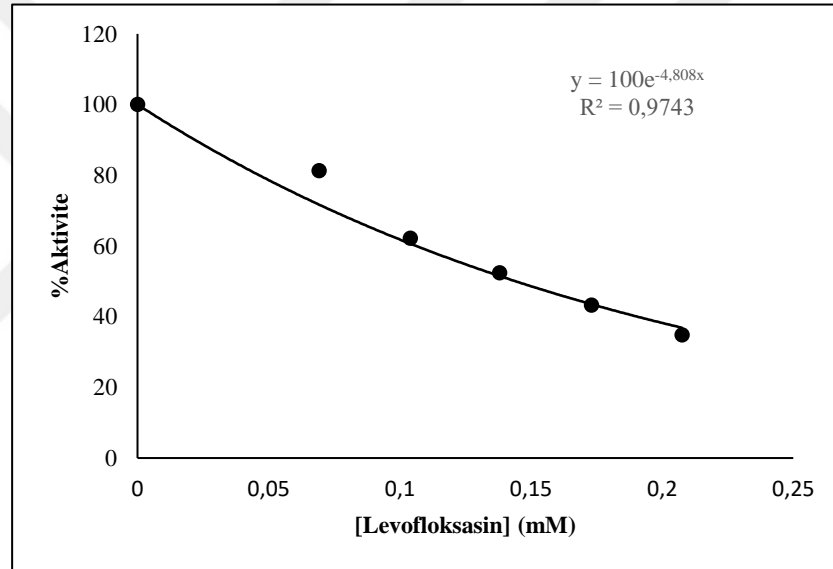
%Aktivite	[Siprofloksasin] mM
100	0
82,15	0,302
63,25	0,603
48,22	0,905
40,13	1,206
32,17	1,508



Şekil 4.63. Siprofloksasin'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.54. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisi

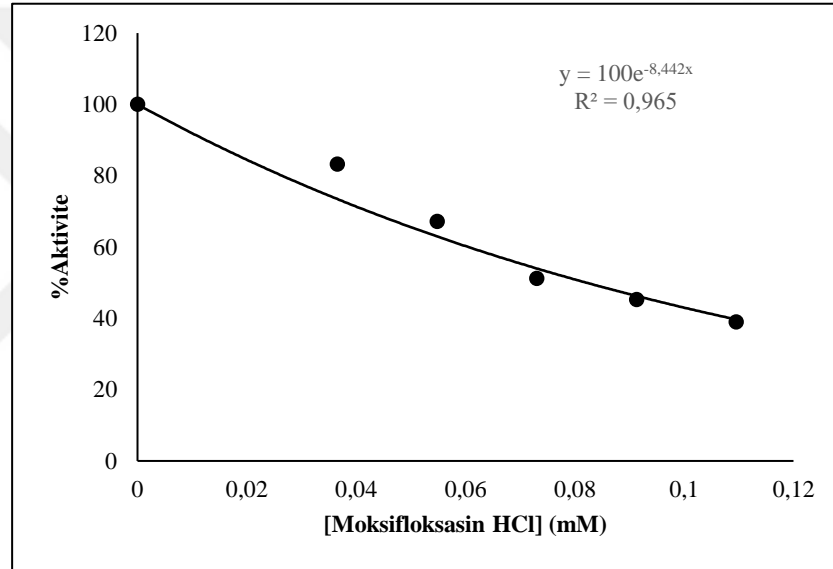
%Aktivite	[Levofloksasin] mM
100	0
81,23	0,069
63,13	0,104
52,34	0,138
42,21	0,173
34,78	0,208



Şekil 4.64. Levofloksasin'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.55. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisi

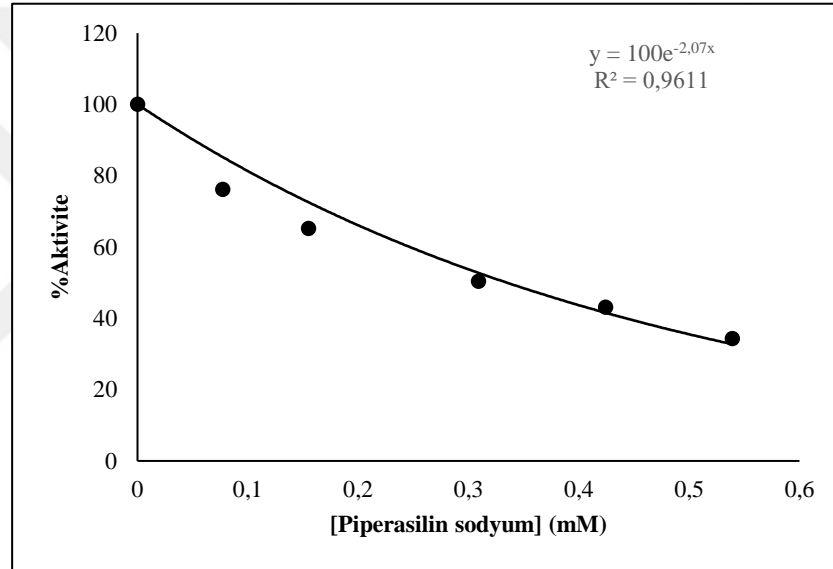
%Aktivite	[Moksifloksasin HCl] mM
100	0
83,25	0,037
67,12	0,055
51,13	0,073
45,21	0,091
38,97	0,110



Şekil 4.65. Moksifloksasin HCl'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.56. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisi

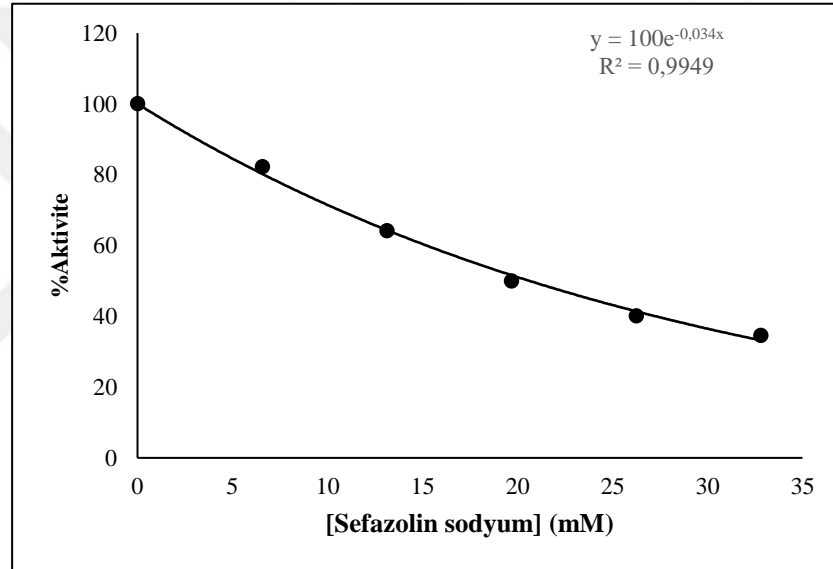
%Aktivite	[Piperasilin sodyum] mM
100	0
76,13	0,077
65,14	0,155
50,38	0,309
43,13	0,424
34,25	0,539



Şekil 4.66. Piperasilin sodyum'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.57. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisi

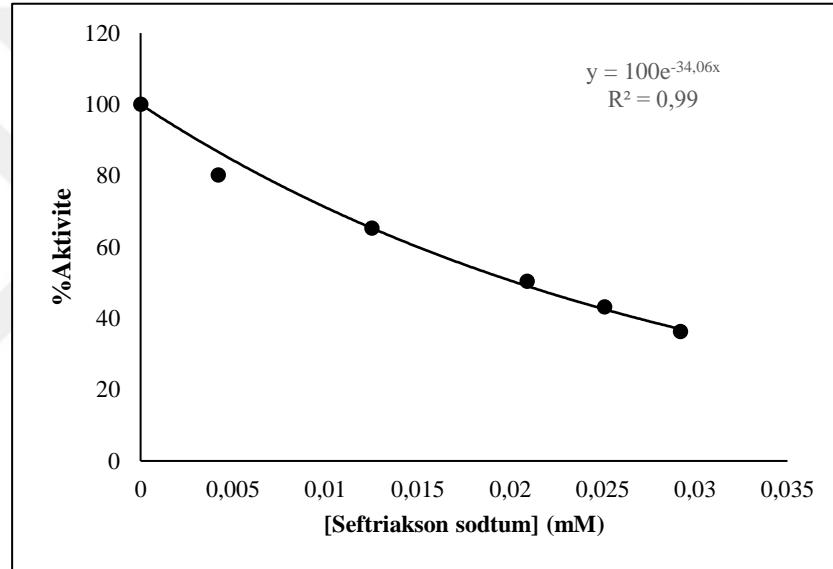
%Aktivite	[Sefazolin sodyum] mM
100	0
82,21	6,56
64,13	13,12
49,98	19,68
40,12	26,24
34,60	32,80



Şekil 4.67. Sefazolin sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.58. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisi

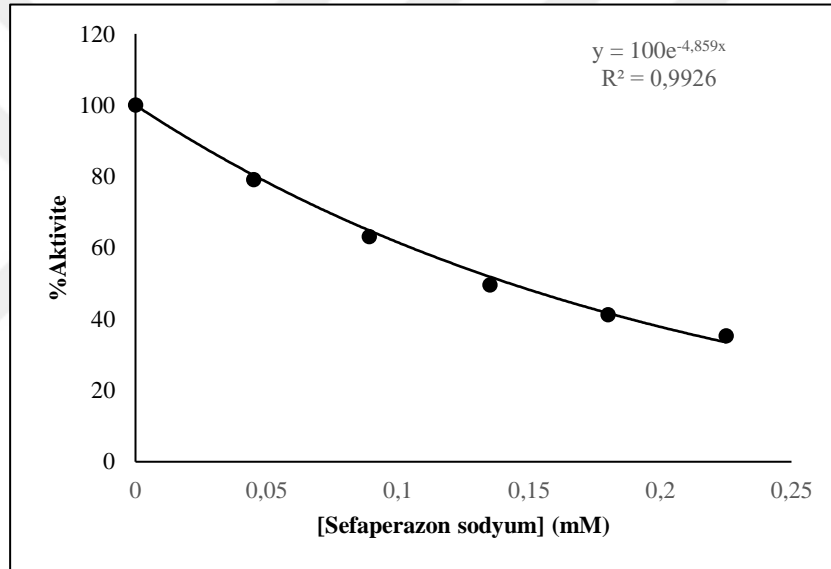
%Aktivite	[Seftriakson sodyum] mM
100	0
80,15	0,004
65,23	0,013
50,32	0,021
43,22	0,025
36,25	0,029



Şekil 4.68. Seftriakson sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.59. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisi

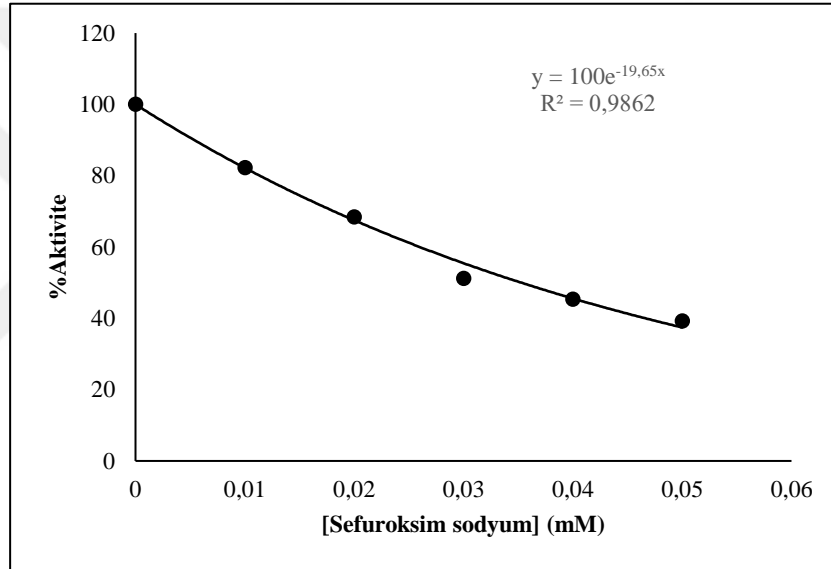
%Aktivite	[Sefaperazon sodyum] mM
100	0
79,12	0,045
63,15	0,089
49,54	0,135
41,23	0,180
35,26	0,225



Şekil 4.69. Sefaperazon sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.60. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisi

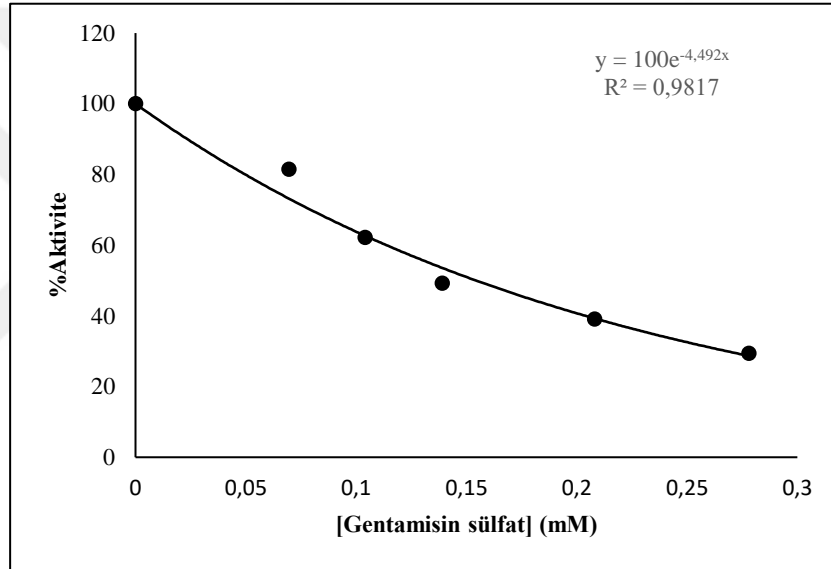
%Aktivite	[Sefuroksim sodyum] mM
100	0
82,25	0,010
68,44	0,020
51,13	0,030
45,32	0,040
39,26	0,050



Şekil 4.70. Sefuroksim sodyum'un hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

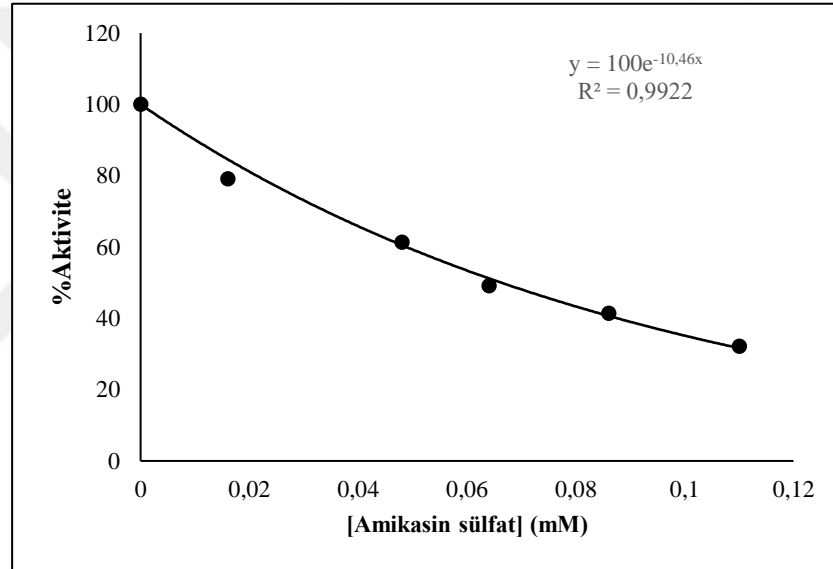
Çizelge 4.61. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisi

%Aktivite	[Gentamisin sülfat] mM
100	0
81,45	0,069
62,13	0,104
49,21	0,139
39,10	0,208
29,34	0,278

**Şekil 4.71.** Gentamisin sülfat'ın hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.62. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi

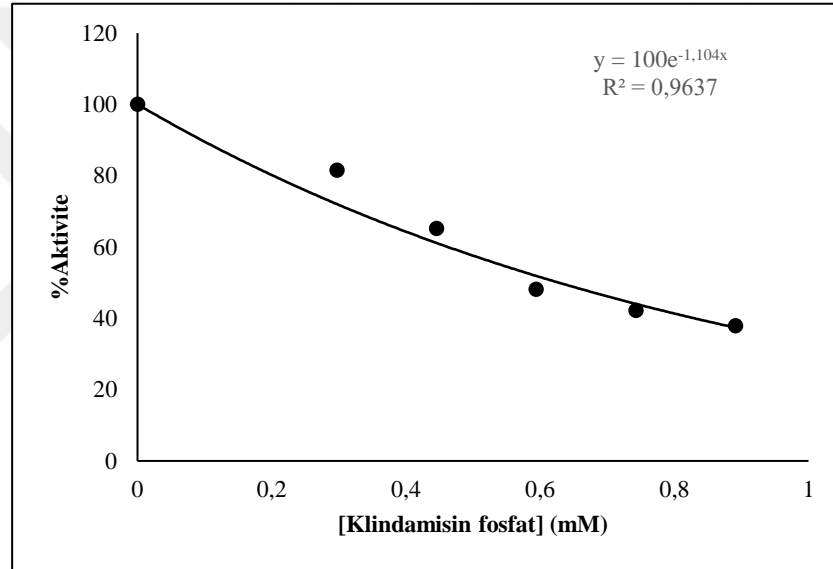
%Aktivite	[Amikasin sülfat] mM
100	0
79,13	0,016
61,34	0,048
49,13	0,064
41,34	0,086
32,15	0,110



Şekil 4.72. Amikasin sülfat'ın hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.63. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisi

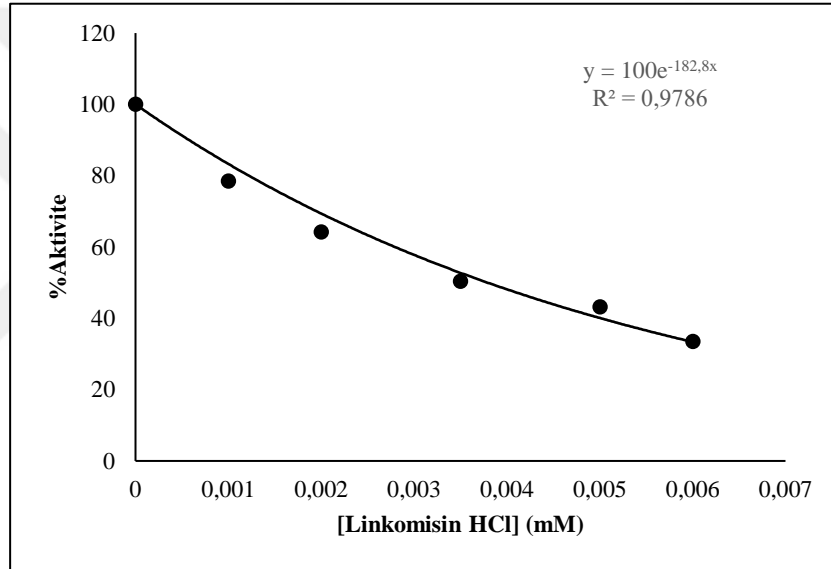
%Aktivite	[Klindamisin fosfat] mM
100	0
81,54	0,297
65,15	0,445
48,14	0,594
42,23	0,743
37,87	0,891



Şekil 4.73. Klindamisin fosfat'ın hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.64. hALDH2 enzim aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisi

%Aktivite	[Linkomisin HCl] mM
100	0
78,43	0,001
64,16	0,002
50,34	0,0035
43,14	0,005
33,46	0,006

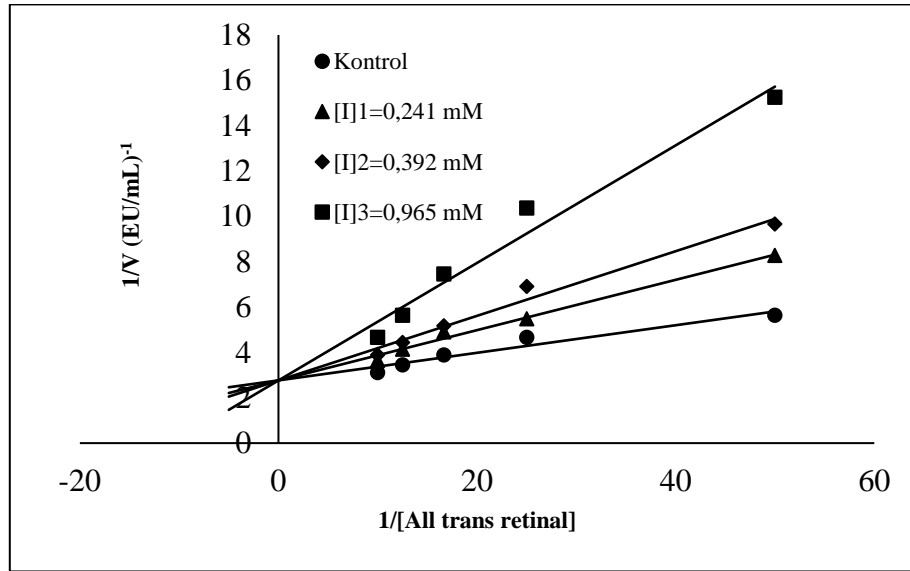


Şekil 4.74. Linkomisin HCl'in hALDH2 enzim aktivitesi üzerine etkisi

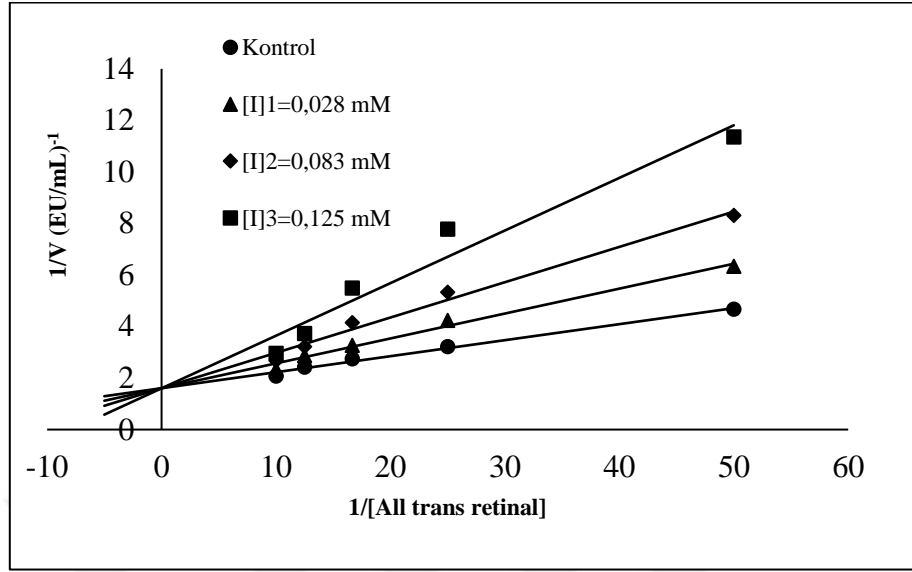
4.18. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 Enzimleri Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı antibiyotikler İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için K_i değerlerini belirlemek amacıyla sabit 3 uygun ilaç konsantrasyonu ve 5 substrat konsantrasyonu belirlenerek aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi, y ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren inhibitör yarışmalı, x ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren inhibitör ise yarışmasız olduğu için, elde edilen grafiklerdeki her bir doğrunun denkleminde K_i değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4.20 -4.23 ile Çizelge 4.17’de verildi.

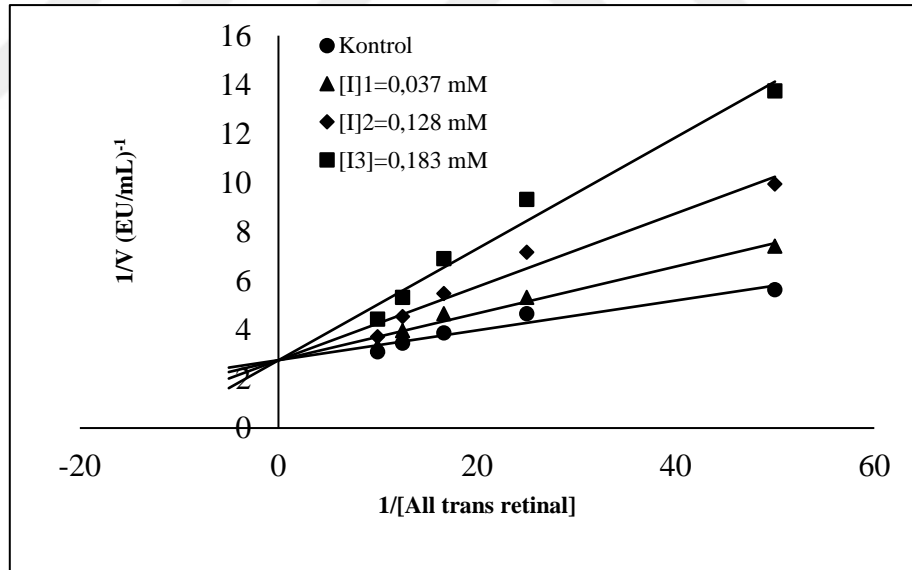
4.18.1. hALDH1A1, Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı antibiyotikler İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları



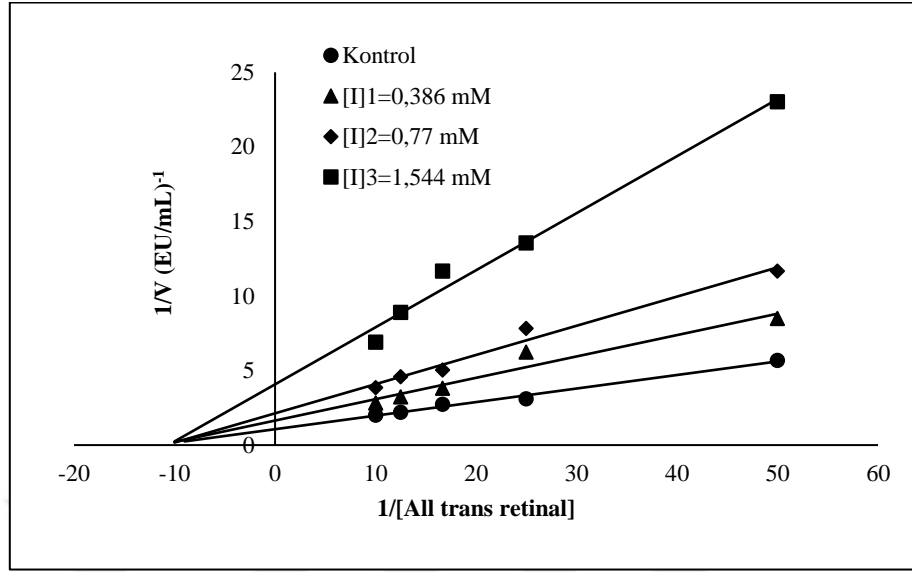
Şekil 4.75. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasin’in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



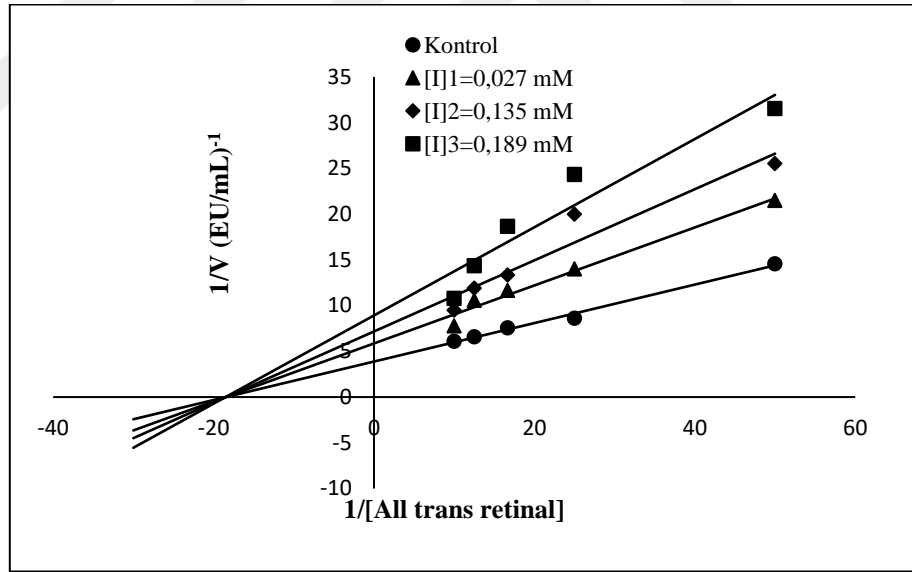
Şekil 4.76. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



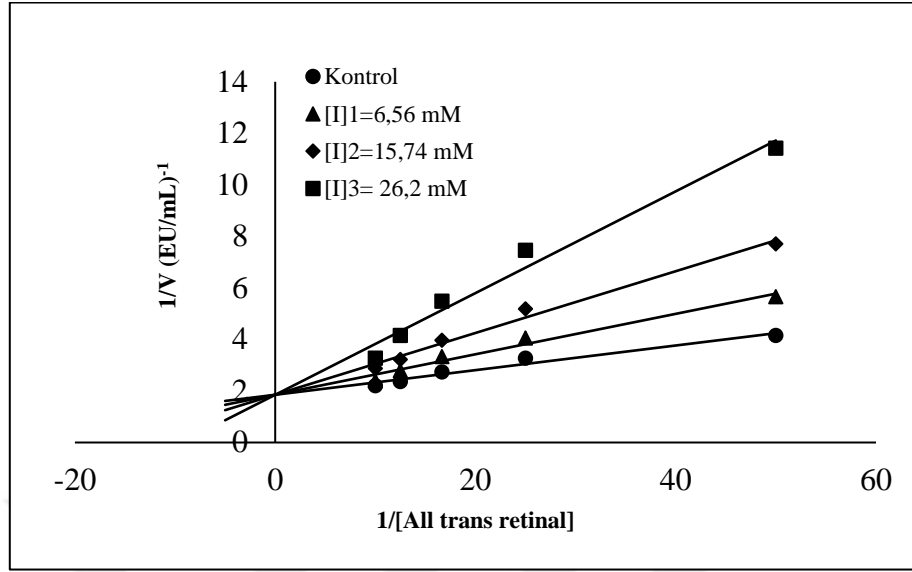
Şekil 4.77. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



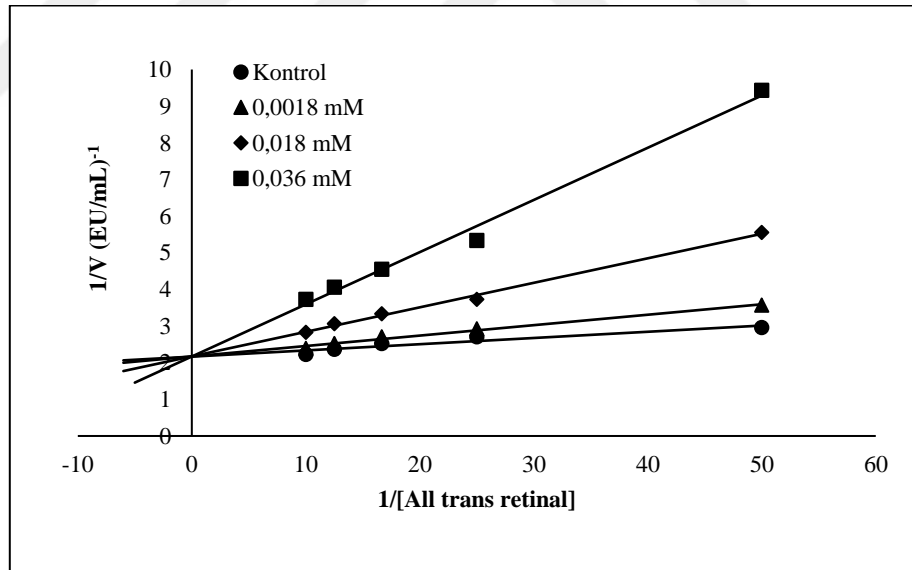
Şekil 4.78. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



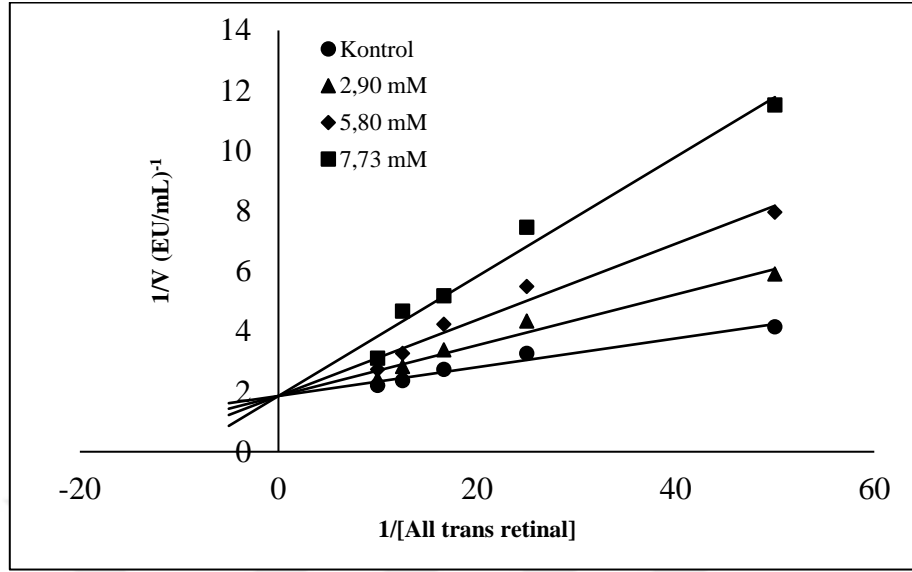
Şekil 4.79. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine amoksisilin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



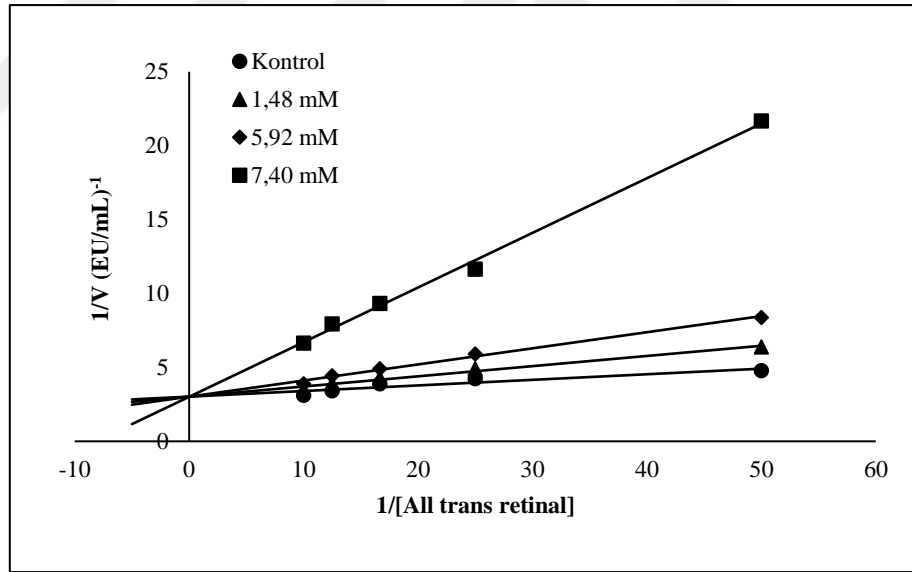
Şekil 4.80. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



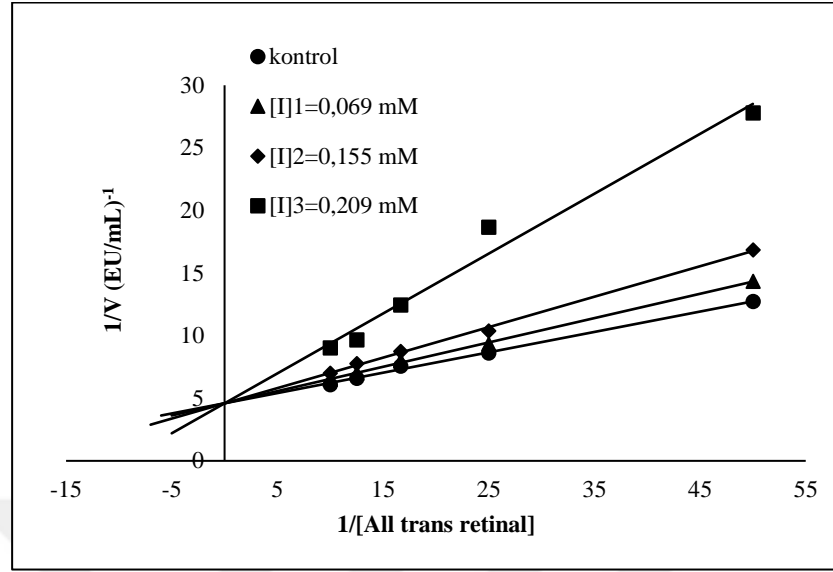
Şekil 4.81. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



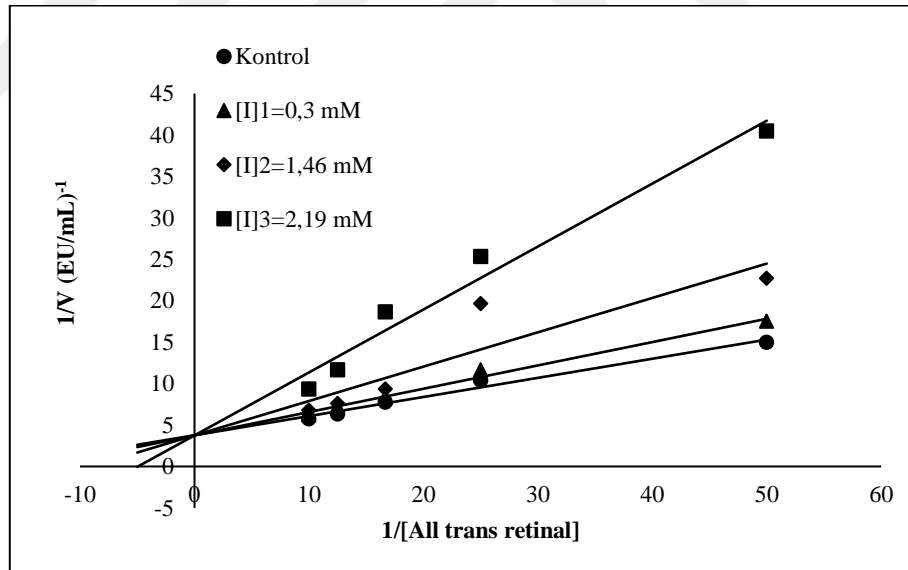
Şekil 4.82. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



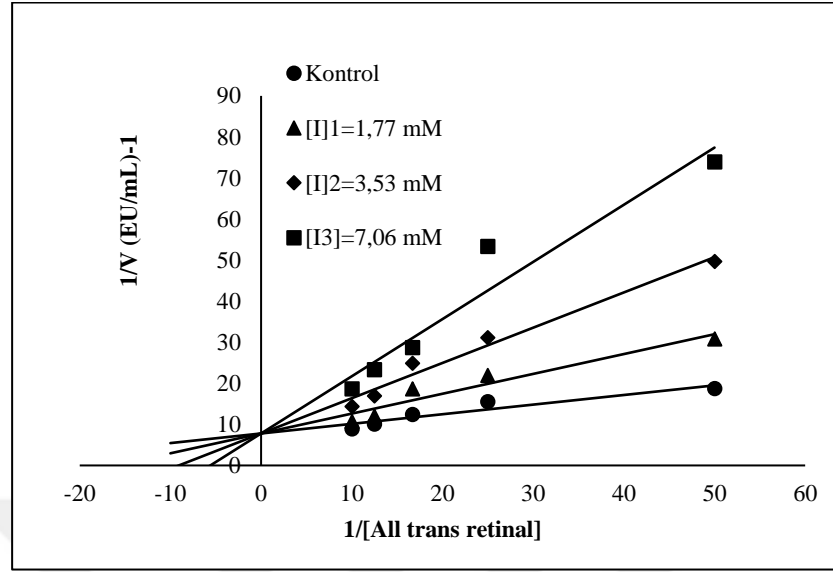
Şekil 4.83. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



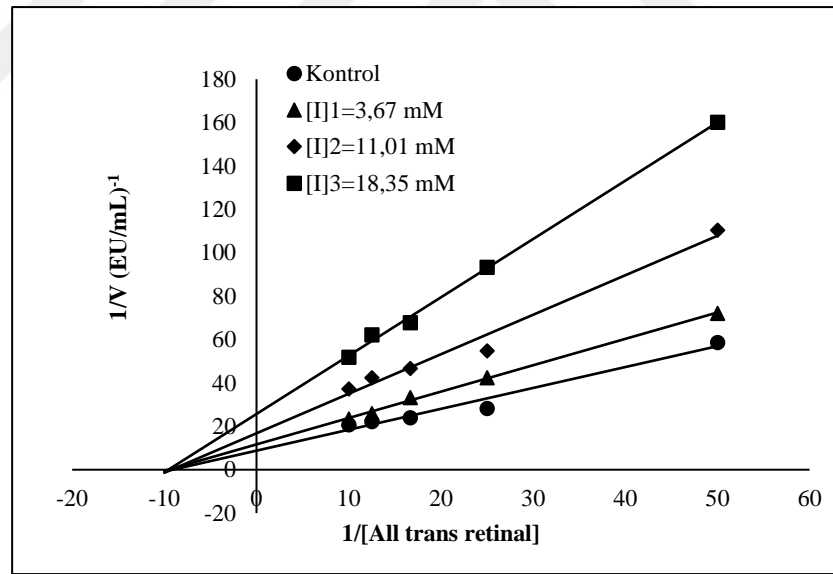
Şekil 4.84. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



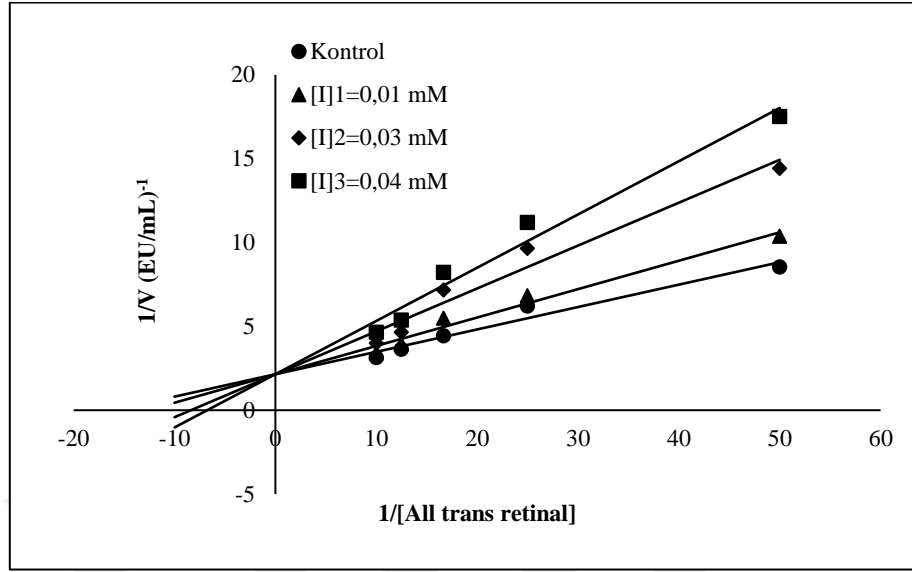
Şekil 4.85. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



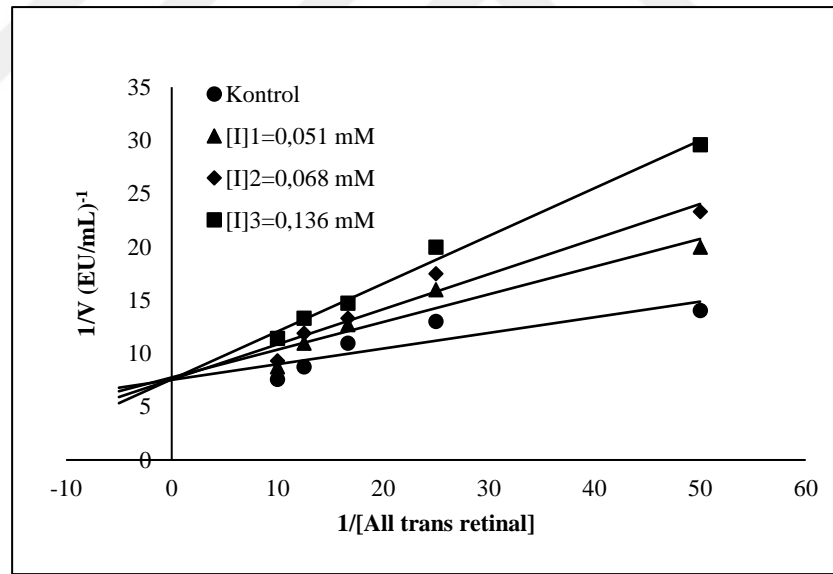
Şekil 4.86. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



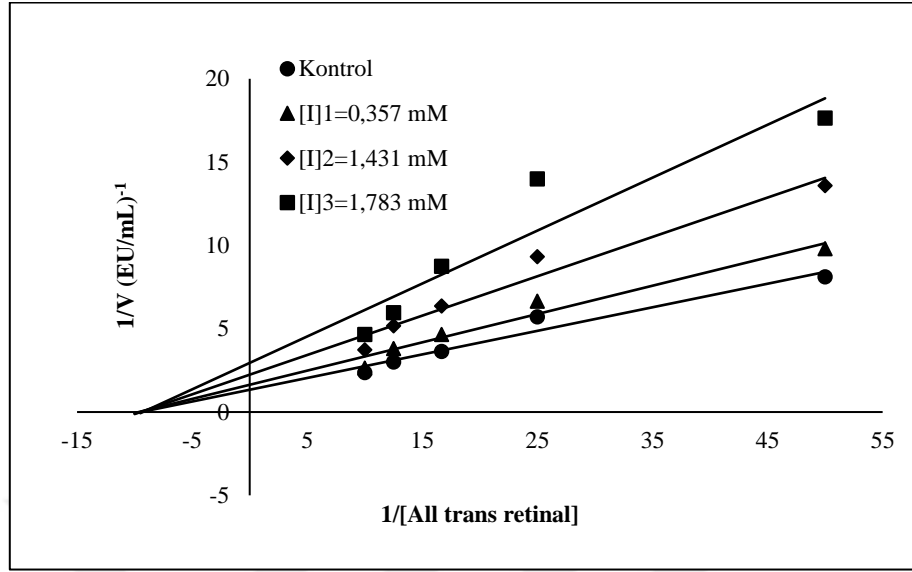
Şekil 4.87. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.88. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine rifampisin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

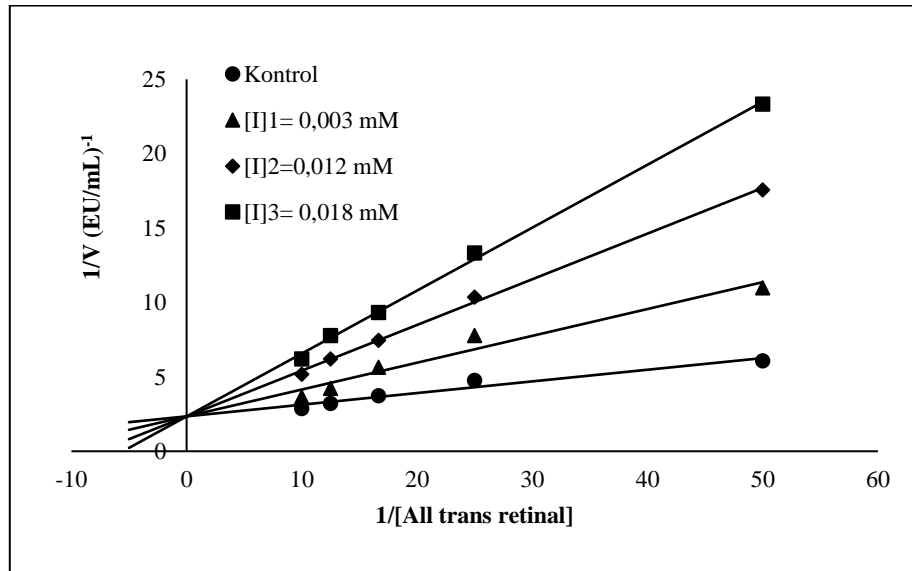


Şekil 4.89. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

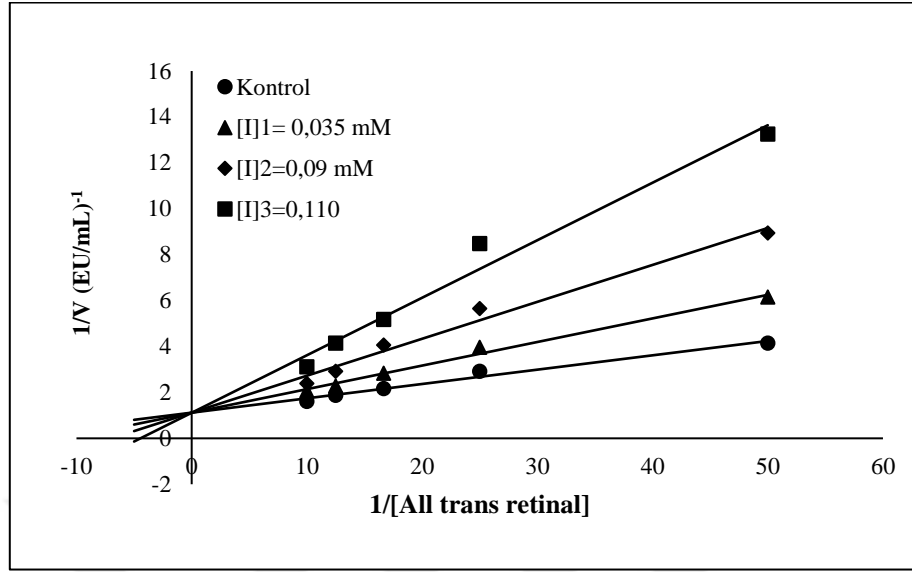


Şekil 4.90. hALDH1A1 enzimi aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

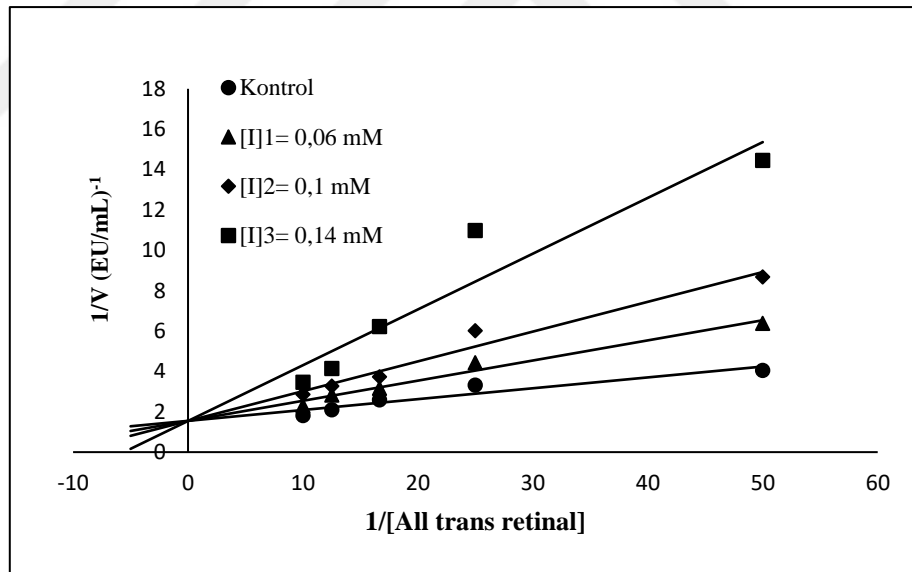
4.18.2. hALDH1A3, Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı antibiyotikler İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları



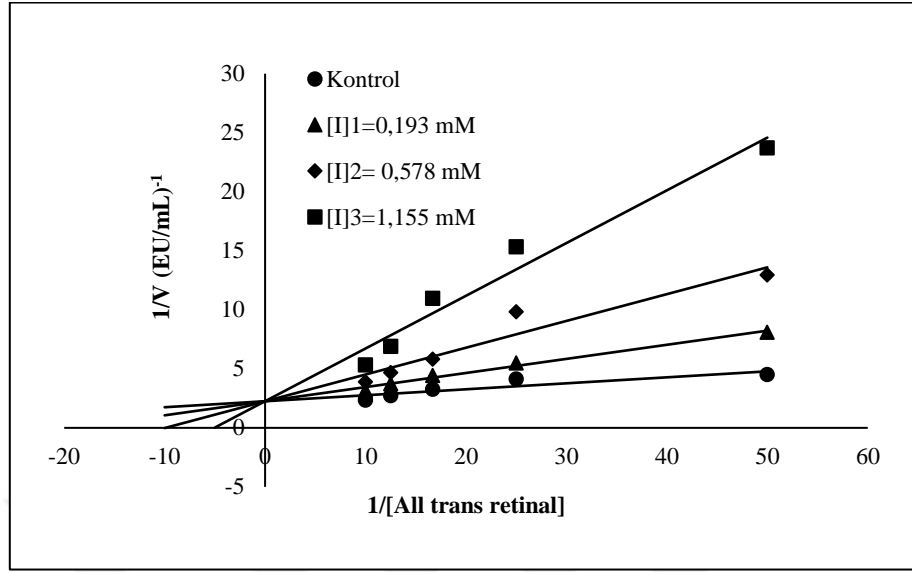
Şekil 4.91. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



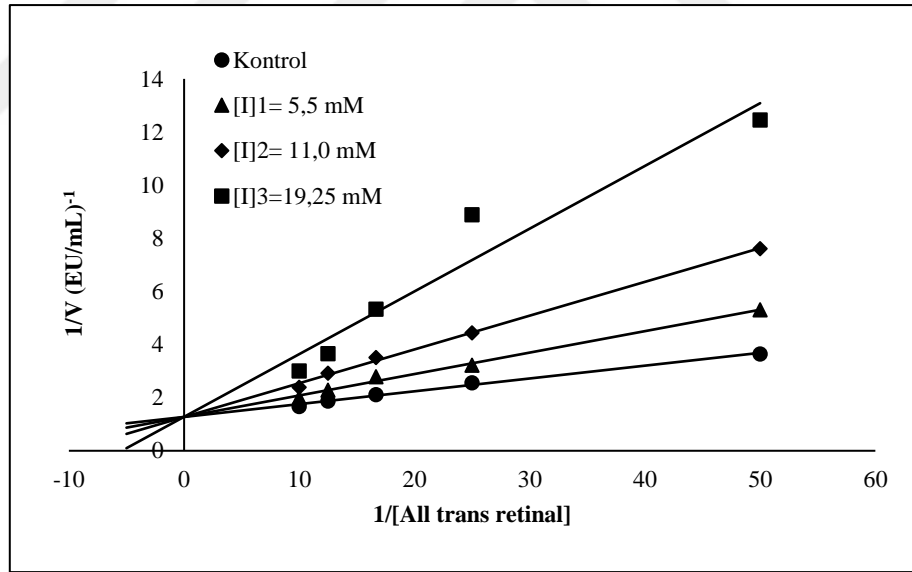
Şekil 4.92. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



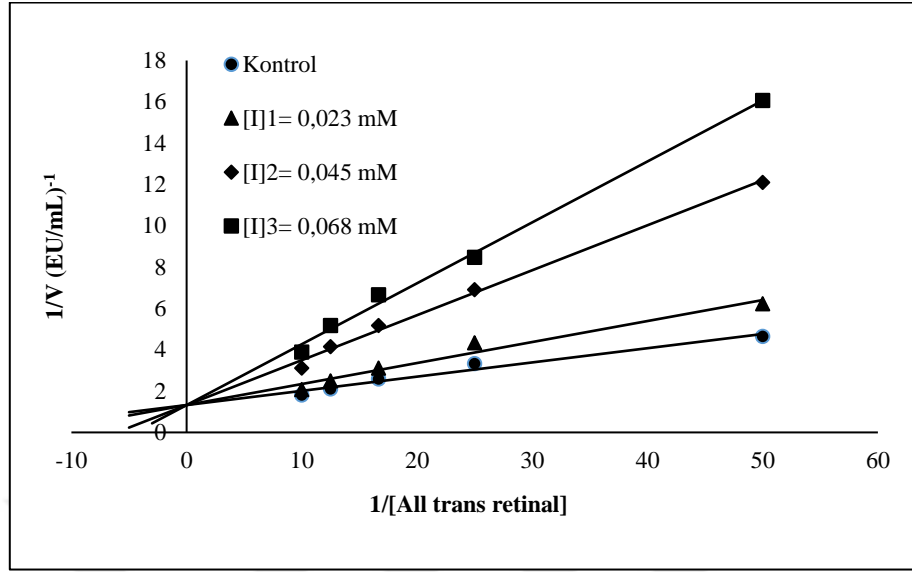
Şekil 4.93. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



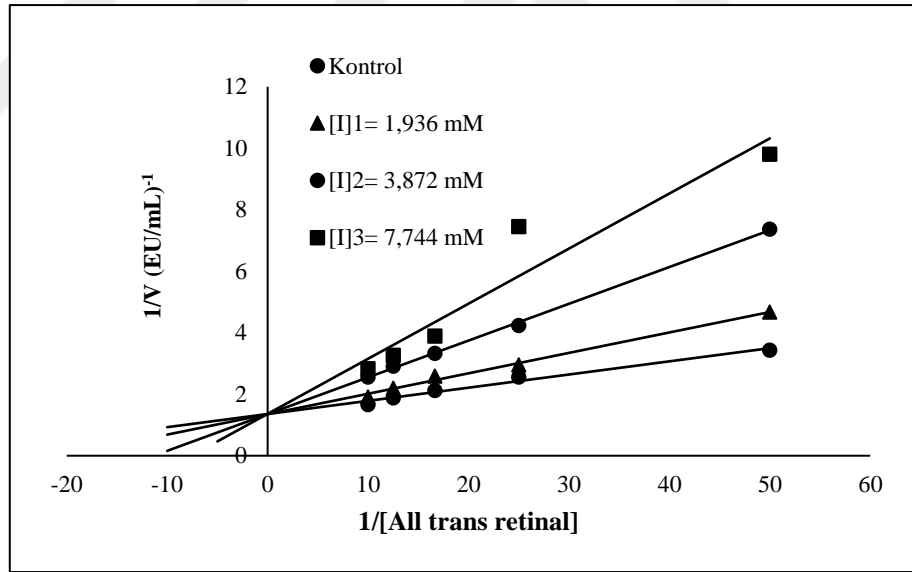
Şekil 4.94. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



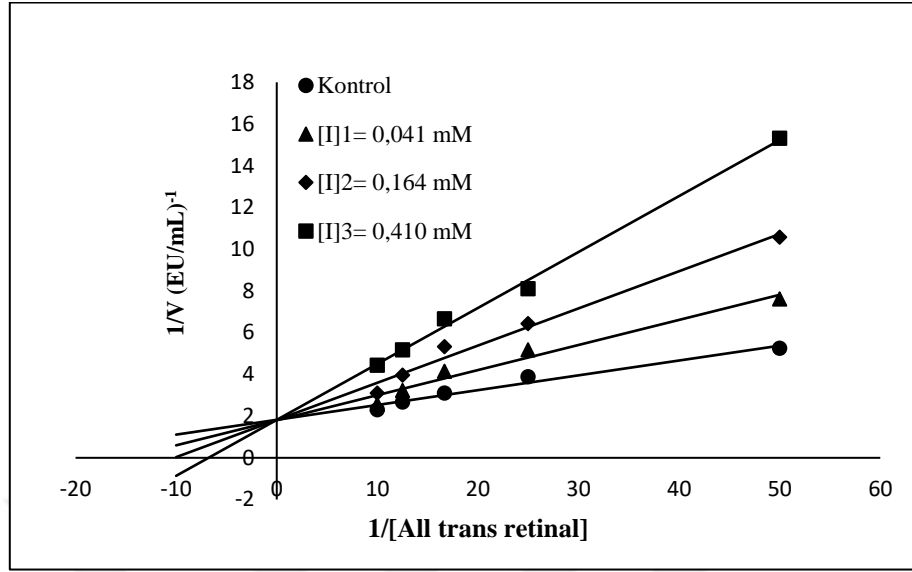
Şekil 4.95. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



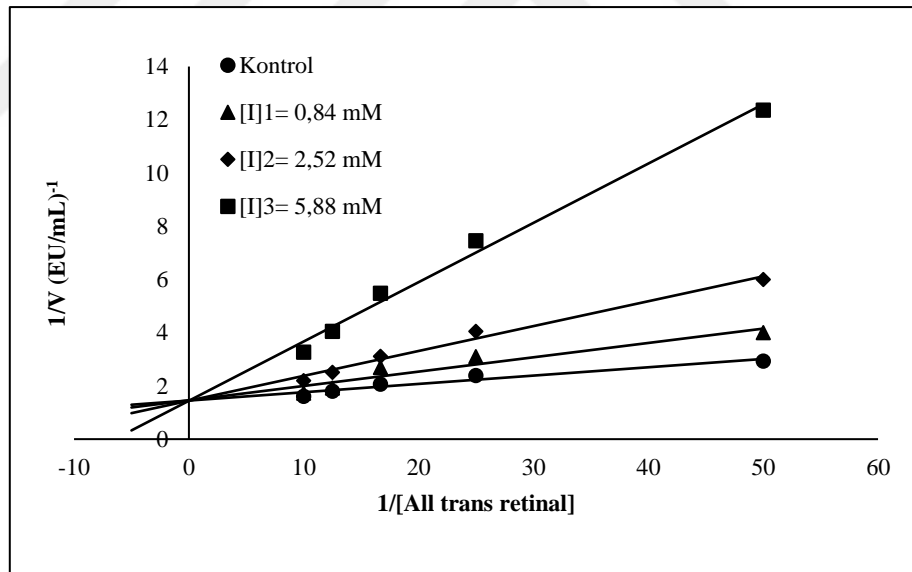
Şekil 4.96. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



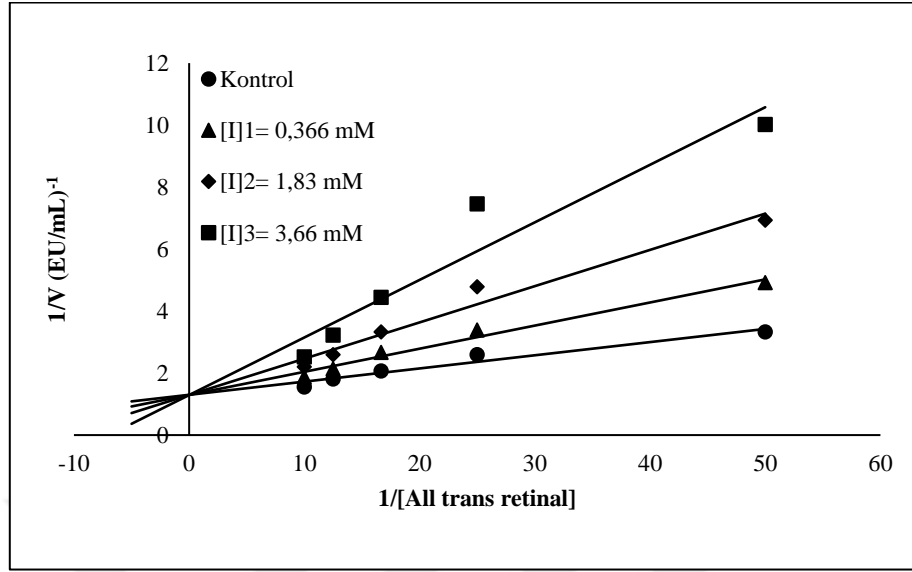
Şekil 4.97. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



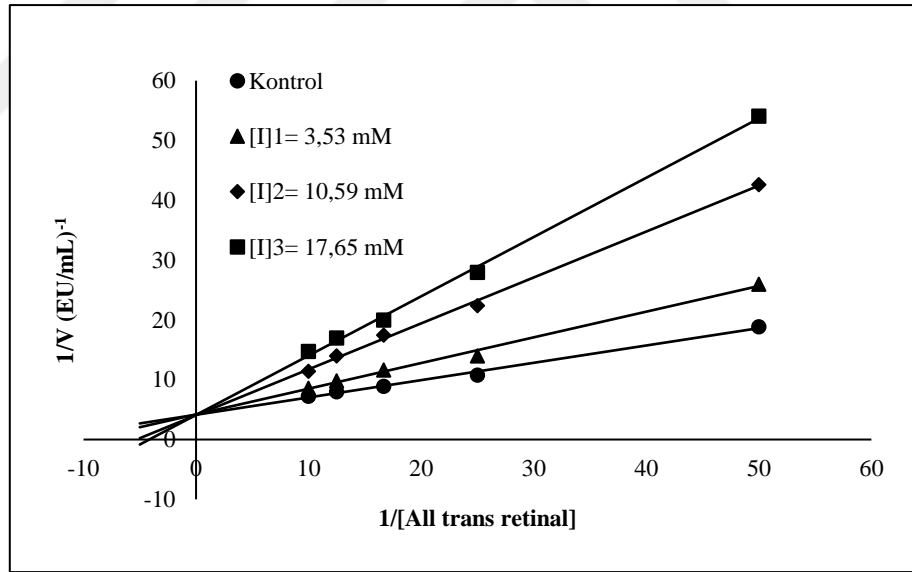
Şekil 4.98. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine seleno sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



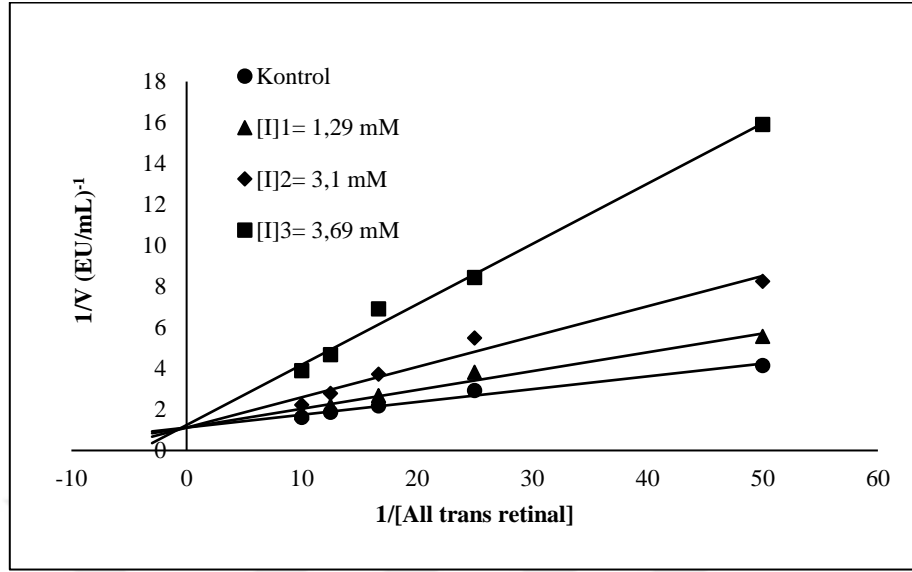
Şekil 4.99. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



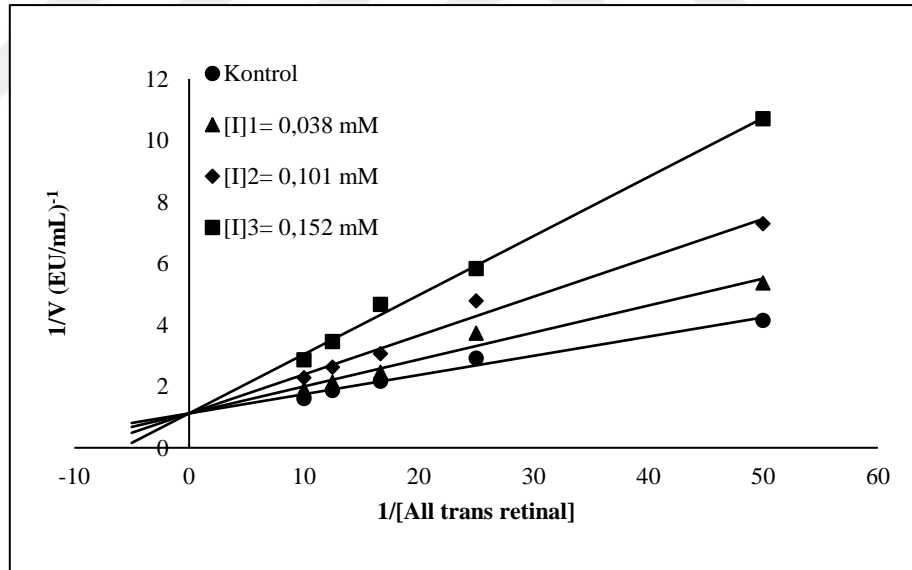
Şekil 4.100. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



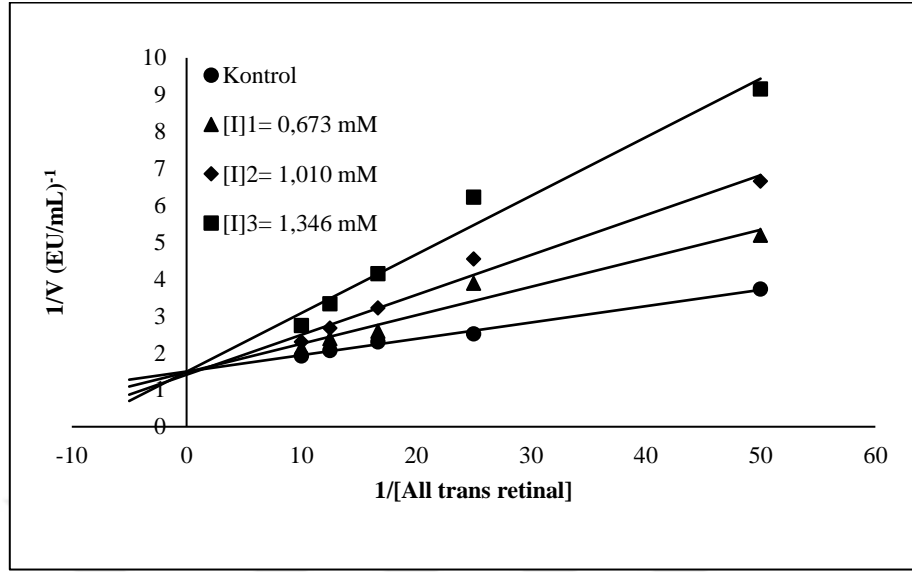
Şekil 4.101. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



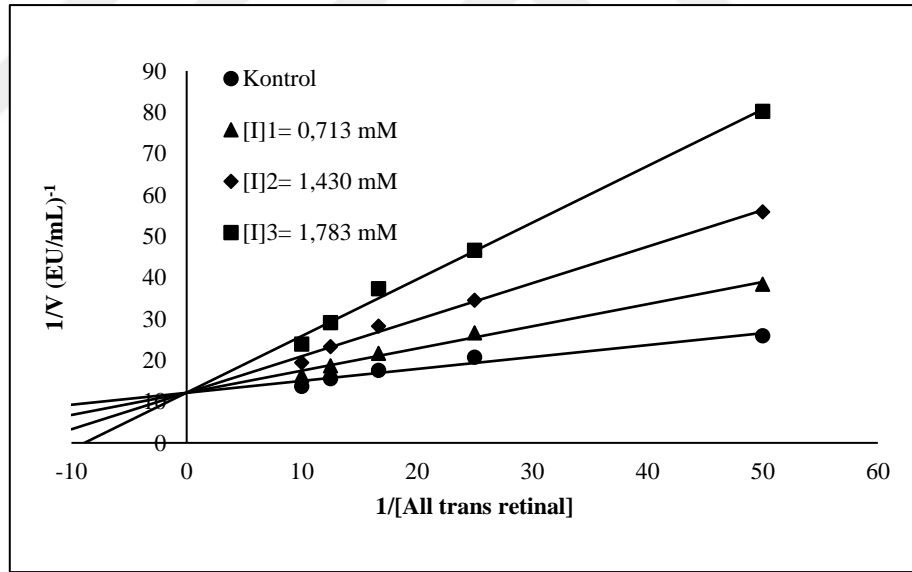
Şekil 4.102. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.103. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine rifamisin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

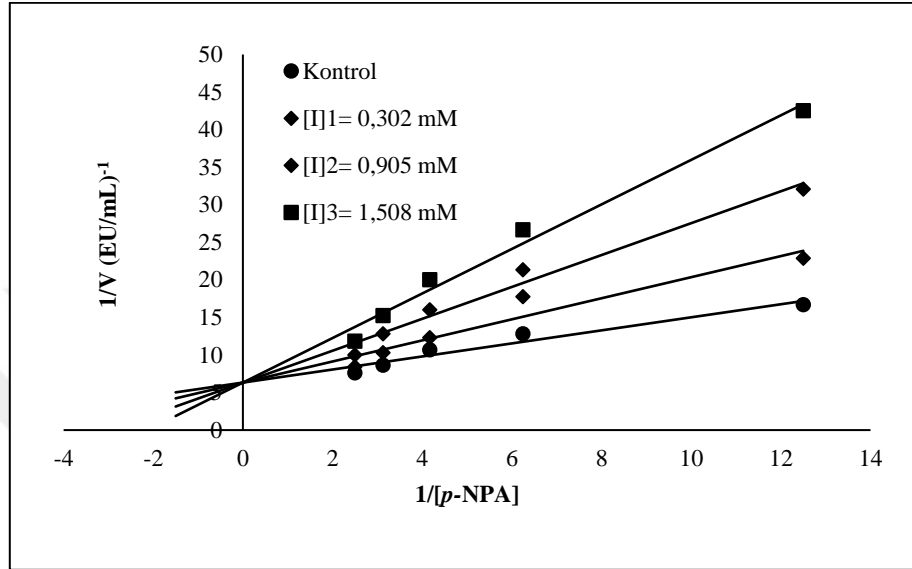


Şekil 4.104. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine vankomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

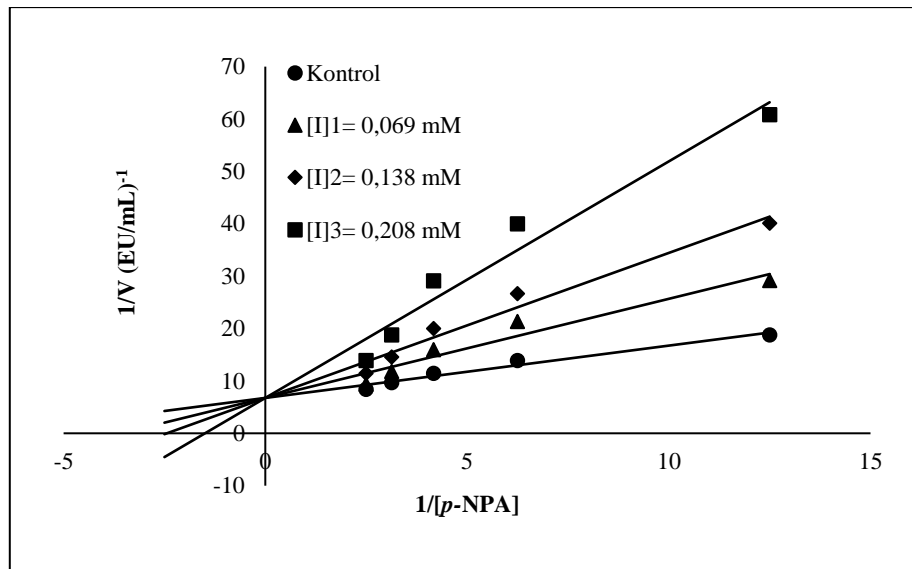


Şekil 4.105. hALDH1A3 enzimi aktivitesi üzerine teikoplanin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

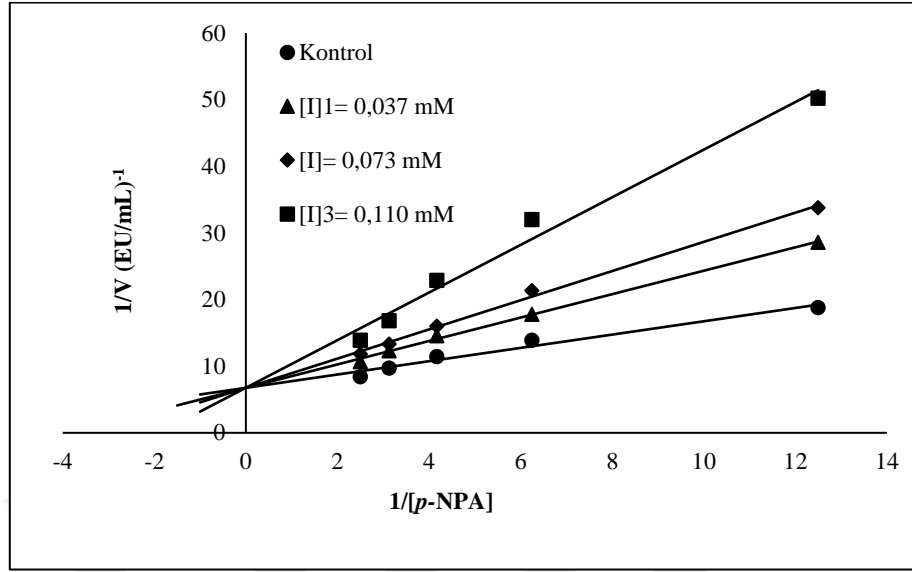
4.18.3. hALDH2, enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı antibiyotikler için K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları



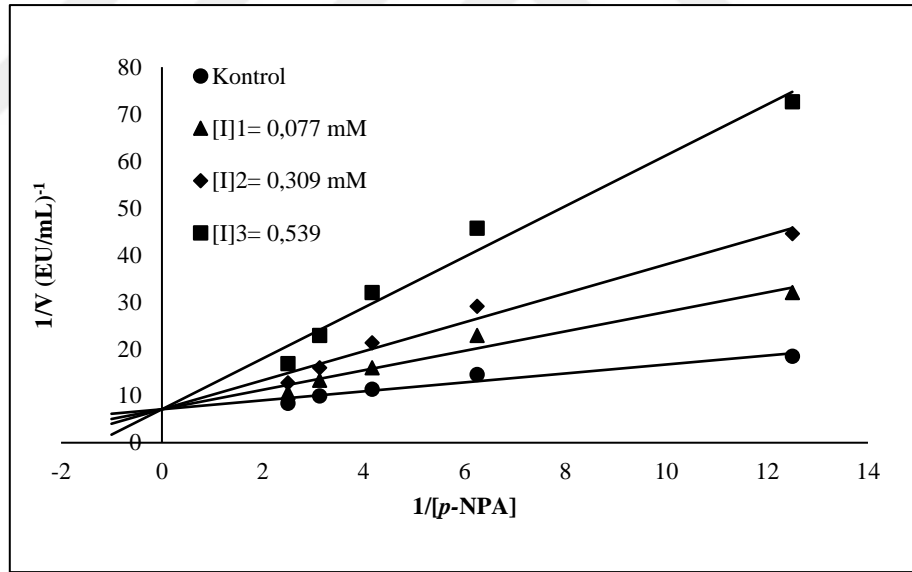
Şekil 4.106. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



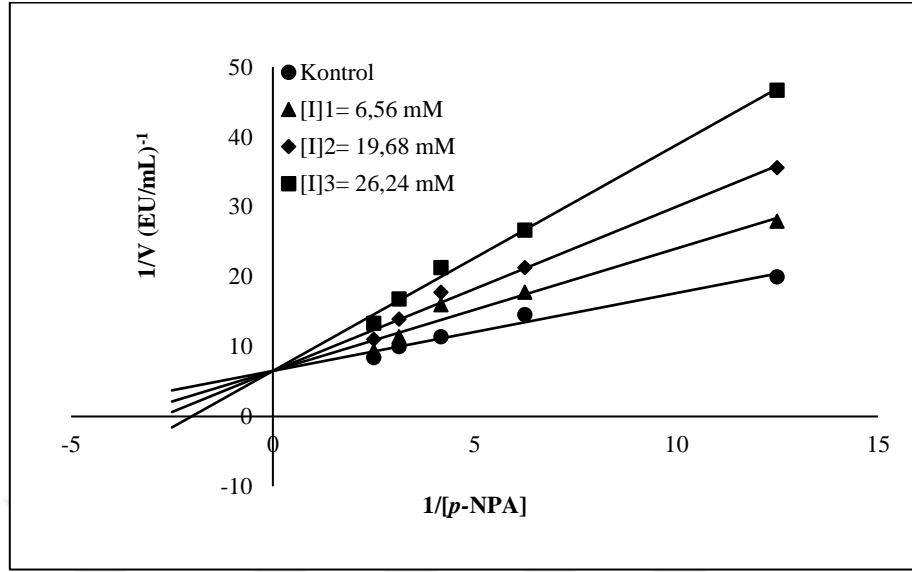
Şekil 4.107. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine levofloksasin'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



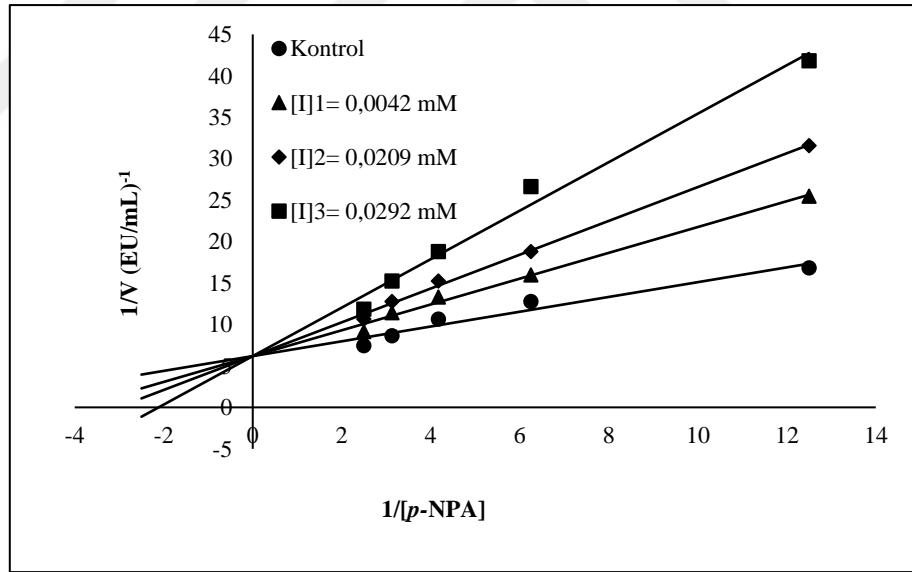
Şekil 4.108. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine moksifloksasin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



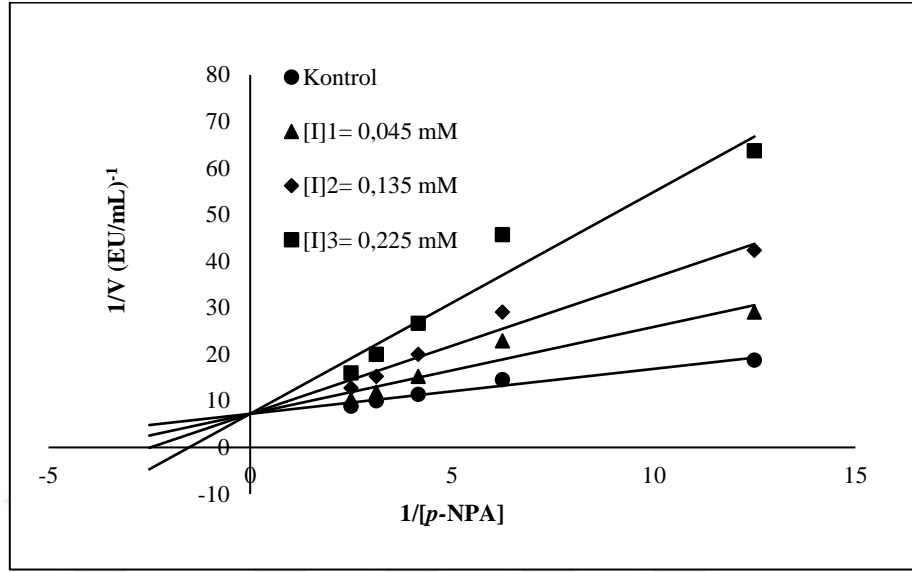
Şekil 4.109. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine piperasilin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



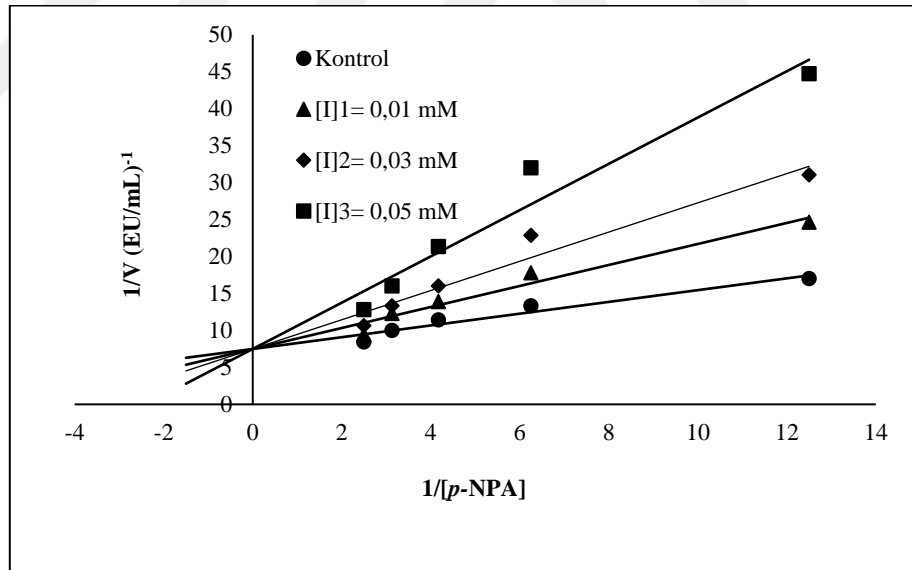
Şekil 4.110. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



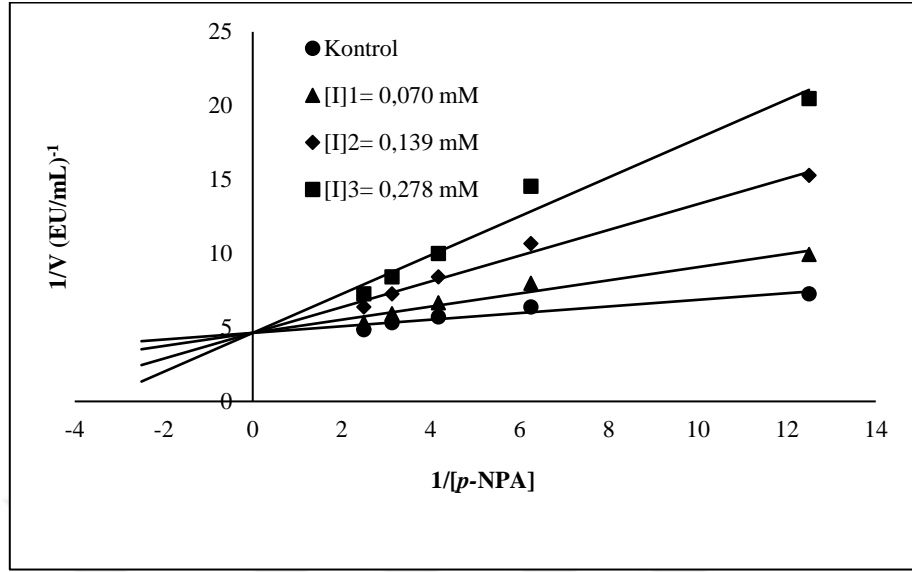
Şekil 4.111. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine seftriakson sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



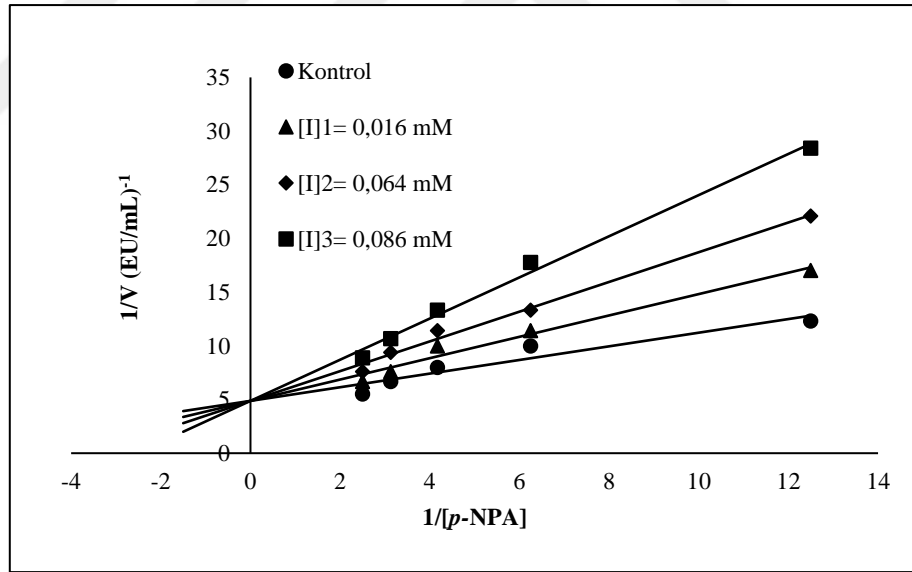
Şekil 4.112. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine sefaperazon sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



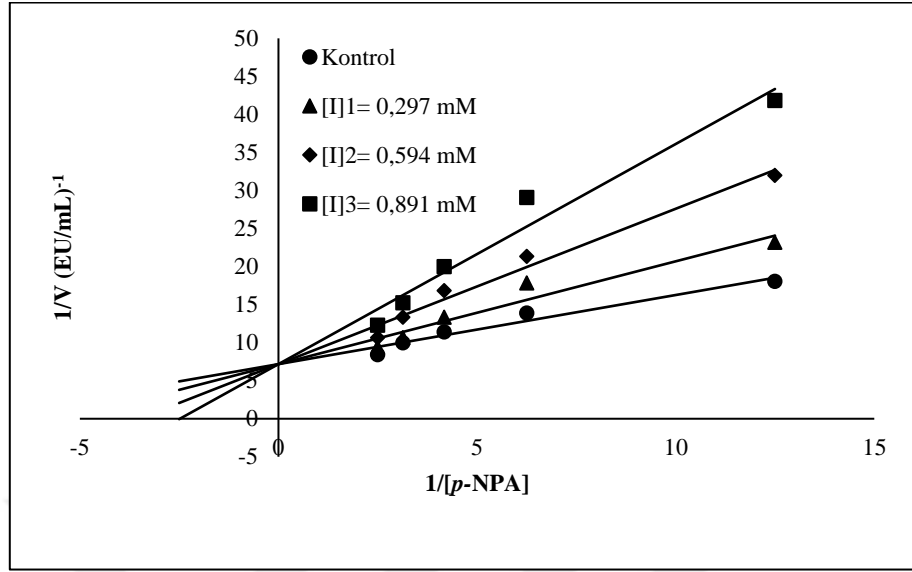
Şekil 4.113. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine sefuroksim sodyum'un etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



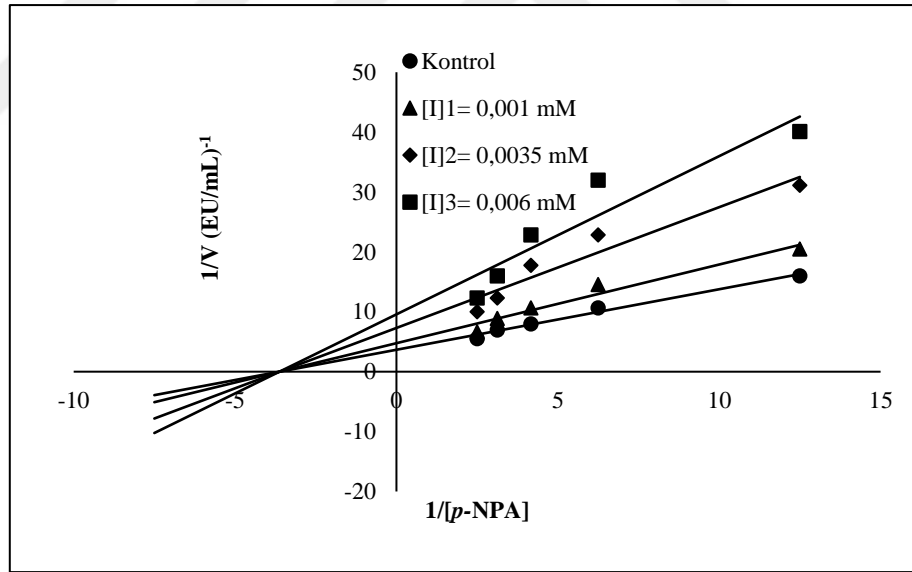
Şekil 4.114. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.115. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine amikasin sülfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.116. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfat'ın etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.117. hALDH2 enzimi aktivitesi üzerine linkomisin HCl'in etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.65. Klonlanmış hALDH1A1 enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
Ampisilin Sodyum	-	-	-
Piperasilin Sodyum	0,81	0,67± 0,11	Yarışmasız
Amoksisilin	0,14	0,12± 0,06	Yarışmasız
Sefazolin Sodyum	14,14	9,71± 1,16	Yarışmalı
Sefuroksim Sodyum	5,37	1,92± 1,15	Yarışmalı
Seftriakson Sodyum	0,02	0,0046± 0,0018	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	6,03	3,25± 0,71	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	1,74	1,36±0,44	Yarışmalı
Kanamisin Sülfat	-	-	-
Gentamisin Sülfat	0,15	0,26± 0,13	Yarışmalı
Tobramisin	-	-	-
Netilmisin	-	-	-
Siprofloksasin	0,55	0,29± 0,002	Yarışmalı
Levofloksasin	0,08	0,05± 0,009	Yarışmalı
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	0,13	0,072± 0,013	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	0,032	0,033± 0,004	Yarışmalı
Vankomisin HCl	0,089	0,064± 0,008	Yarışmalı
Teikoplanin	1,18	1,06± 0,20	Yarışmasız
Linkomisin HCl	9,63	8,31± 0,95	Yarışmasız
Klindamisin Fosfat	3,43	1,47± 0,18	Yarışmalı

Çizelge 4.66. Klonlanmış hALDH1A3 enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Türü
Ampisilin Sodyum	-	-	-
Piperasilin Sodyum	0,52	0,15± 0,01	Yarışmalı
Amoksisilin	-	-	-
Sefazolin Sodyum	11,95	6,63±1,62	Yarışmalı
Sefuroksim Sodyum	0,23	0,10± 0,04	Yarışmalı
Seftriakson Sodyum	0,05	0,03± 0,01	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	5,21	2,68±0,69	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	1,76	0,87±0,33	Yarışmalı
Kanamisin Sülfat	-	-	-
Gentamisin Sülfat	3,12	1,13± 0,15	Yarışmalı
Tobramisin	-	-	-
Netilmisin	-	-	-
Siprofloksasin	0,01	0,003± 0,001	Yarışmalı
Levofloksasin	0,082	0,049± 0,011	Yarışmalı
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	0,106	0,054± 0,018	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	0,097	0,088± 0,013	Yarışmalı
Vankomisin HCl	0,99	0,66± 0,21	Yarışmalı
Teikoplanin	1,52	0,67± 0,18	Yarışmalı
Linkomisin HCl	3,27	2,15± 0,06	Yarışmalı
Klindamisin Fosfat	11,18	6,54± 0,98	Yarışmalı

Çizelge 4.67. Klonlanmış hALDH2 enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Antibiyotik	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Türü
Ampisilin Sodyum	-	-	-
Piperasilin Sodyum	0,34	0,11± 0,04	Yarışmalı
Amoksisilin	-	-	-
Sefazolin Sodyum	20,38	14,31±3,16	Yarışmalı
Sefuroksim Sodyum	0,035	0,017± 0,0038	Yarışmalı
Seftriakson Sodyum	0,02	0,01± 0,005	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	0,14	0,06± 0,009	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	0,07	0,04±0,01	Yarışmalı
Kanamisin Sülfat	-	-	-
Gentamisin Sülfat	0,15	0,08± 0,01	Yarışmalı
Tobramisin	-	-	-
Netilmisin	-	-	-
Siprofloksasin	0,91	0,58± 0,078	Yarışmalı
Levofloksasin	0,14	0,07± 0,01	Yarışmalı
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	0,08	0,05± 0,009	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	-	-	-
Vankomisin HCl	-	-	-
Teikoplanin	-	-	-
Linkomisin HCl	0,0038	0,0035± 0,0002	Yarışmasız
Klindamisin Fosfat	0,70	0,49± 0,10	Yarışmalı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Aldehitler, insan vücudunda fazla miktarda mevcut olduğunda sitotoksite ve karsinogenezise yol açabilir. İnsan vücudu hem dış ortamından hem de iç metabolizmasından sayısız aldehit ile karşılaşır (Brooks and Zakhari 2014). Aldehit dehidrogenazlar (ALDH), vücudun aldehit stresini hafifletmek için kullandığı birçok enzim sisteminden biridir. İnsan genomunda, ALDH süper ailesinin 19 tane fonksiyonel üyesi mevcuttur ve bunların çoğu aldehitleri NAD(P)⁺ bağımlı oksidasyon ile kendi karboksilik asitlerine veya CoA esterlerine katalize etmektedir. 19 ALDH izoenzimi, değişen substrat özgüllükleri ve gen ekspresyonu farklılıkları nedeniyle farklı işlevleri paylaşmaktadır. Bazıları, ALDH1A1 ve ALDH2 gibi yaygın olarak ifade edilirken diğerleri belirli dokularda veya belirli gelişim dönemlerinde öncelikli olarak eksprese olmaktadır (Vasiliou *et al.* 2004).

ALDH1/2 ailesi, ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1 ve ALDH2'den oluşur. Bu beş izoenzim değişen uzunluktaki alifatik aldehitleri oksitlemektedir. ALDH1A1, ALDH1A2 ve ALDH1A3 retinoid metabolizmasında görev alan sitozolik proteinlerdir. ALDH1A1, siklofosamid gibi belirli anti-kanser ajanlarına karşı direnç sağlamanın yanı sıra kanserli kök hücrelerde işlevsel bir role sahip olmakla da ilişkilendirilmiştir (Condello *et al.* 2015). ALDH1A2 ve ALDH1A3, farelerde embriyonik gelişim için kritik önem taşır, çünkü bu iki genin genetik olarak bireysel nakavt edilmesi canlı hayvanların yaşamamasına sebebiyet vermektedir (Dupe *et al.* 2003). ALDH2, asetaldehit metabolizmasında asetaldehitin asetik aside dönüştürülmesi sağlayan mitokondriyal enzimdir. Aynı zamanda ALDH1A1 ve ALDH2, dopaminin beynin farklı alanlarındaki metabolizması ile de ilişkilidir (Marchitti *et al.* 2008).

ALDH izoenzimleri fizyolojik ve toksikolojik açıdan kritik önem taşır. Aktive veya inhibe edilen ALDH izoenzimleri, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda etki göstermektedir. Özellikle ALDH1A1, kanser, Parkinson hastalığı, obezite ve katarakt gibi çeşitli hastalıklarla bağlantılıdır. Dolayısıyla, ALDH'lerin farmakolojik inhibitörleri veya aktivatörlerinin bulunması patolojik durumların tedavisi için gereklilik arz

etmektedir. Üç ALDH izoenzimi, (ALDH1A1, ALDH2 ve ALDH3A1) farmakolojik inhibisyona karşı daha çok çalışılmıştır. Her bir ALDH izoenzimi için diğerlerini etkilemeden inhibe eden antagonist geliştirilmemiştir. Belirli ALDH izoenzimleri için mevcut antagonistlerin seçicilik eksikliği klinik kullanımı engellemektedir. Bu sebeple, önemli terapötik olarak ortaya çıkan ALDH izoenzimleri için seçici inhibitörlerin geliştirilmesine duyulan ihtiyaç artmaktadır. Proteomik ve yapı-aktivite ilişkileri araştırmalarından elde edilen bilgiler, ALDH izoenzimlerine spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi için rasyonel bir temel sağlamaktadır.

Bu çalışmada; insan ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 enzim genlerinin hazır satın alınan insan beyin cDNA'sından klonlanması, klonlanan genlerin ekspresyon vektörünün *E.coli* hücrelerine transformasyonu, *E.coli*'de ekspresyonu ve ekspres edildikten sonra Nikel reçine kolonu kullanılarak afinite kromatografi yöntemi ile belirli oranda saflaştırılması, saflaştırıldıktan sonra antibiyotiklerin bu enzimlerin üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Görüldüğü gibi aldehit dehidrogenaz enzim ailesi canlılar için hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle bu enzimler üzerinde yapılan çalışmalar, enzimin metabolizmadaki rolünü belirlemek ve seçici inhibitörlerin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışmanın önemi gayet açıktır.

Çalışmamızda klonlama ve ekspresyon işlemi için pET-SUMO vektörü kullanılmıştır. SUMO proteinleri, ubikuitinler gibi hedef proteine konjuge olmadan önce öncü bir formda sentez edilirler. Bu iki grup arasındaki temel fark ise ubikuitinlerin bir proteine hedeflenmesi onun degradasyonu amacıyla yapılırken SUMO hedeflemesi yapılan protein üzerinde nükleer transport, transkripsiyonel regülasyon ve protein kararlılığı gibi hücresel işlemler gerçekleşmektedir (Boggio *et al.* 2004). Özellikle *E. coli* gibi düşük seviyeli konaklarda verimli ve çözünebilir formda rekombinant protein üretimi yapmak, karşılaşılan en önemli sorunların başında gelmektedir (Wang *et al.* 2010). Bu problemi aşmak için füzyon proteinlerinin kullanımı, promotör alterasyonu ve şaperon ko-ekspresyonu gibi yaklaşımlar tercih edilmektedir. Füzyon proteinleri hedef proteinin

ekspresyonunu ve düzgün katlanmasını sağlamasının yanı sıra ilgili proteini degradesyondan korur, saflaştırma ve tespit işlemlerinde kolaylık sağlar. Bu nedenle rekombinant üretim tekniklerinde oldukça sık bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. Kitte bulunan bakteri hücreleri T7 RNA polimeraz genine sahiptirler. Ayrıca IPTG ile indüklenebilirler. Sentezlenen proteini degrades edebilen bazı proteazlar açısından eksiktir. Bu özellikleri göz önünde bulundurularak çalışmamızda protein üretimi için pET ekspresyon sistemine uygun olan bu soy tercih edilmiştir.

Literatürde pET-SUMO ekspresyon sistemi kullanılarak çeşitli enzimlerin klonlanma ve ekspresyon işlemleri mevcuttur. Örneğin, Asetilkolin esteraz enzimi bu vektör sistemi kullanılarak klonlanmış daha sonra protein üretimi gerçekleştirildi (Ceylan and Erdoğan 2017). Başka bir çalışmada insan karbonik anhidraz II (hCA II) enzimi pET SUMO ekspresyon vektörü kullanılarak *E. coli*'de eksprese edildi ve rekombinant enzim, nikel (Ni^{+2}) afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. hCA II'nin hidrofobik kısmındaki Trp 209 aminoasiti, bölge yönelimli mutagenез yöntemi ile dört farklı amino asit (Val, Leu, Ile ve Pro) ile yer değiştirildi. Bu mutagenез işlemlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileşimleri incelendi (Kılıç *et al.* 2017). Önceki çalışmamızda, hPON1 enzimini, insan karaciğer cDNA'sı kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi ile *E. coli* (BL21DE3) hücresinde üretildi. SUMO-hPON1 enzimini Ni-NTA afinite kromatografisi kullanılarak doğal şartlarda %93,5 verim ve 226,88 EU/mg spesifik aktivite ile 17,12 kat saflaştırıldı. SUMO-hPON1 enziminin kütlesi 51,52 kDa olarak belirlendi (Demir and Beydemir 2015).

Enzimlerin IPTG ile indüklenip ekspresyon profilleri belirlenmeye çalışılmıştır. Western blot yapılarak da enzimlerin IPTG varlığında ekspresyonları teyit edilmiştir. Yaklaşık 100 aa'ten oluşan SUMO'nun moleküler ağırlığı 11 ila 20 kDa civarlarındadır (Marblestone *et al.* 2006; Herrmann *et al.* 2007). Western blot görüntüsü (Şekil 4.16) incelendiğinde hedef proteinlerin üzerinde füzyon ekinin ve His kuyruğunun olduğu da hesap edilirse His antikoru ile elde edilen yaklaşık 70 kDa'luk bantların enzimler için doğru olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. ALDH2 enzimi için çökelekte de bant

gözlenmiştir. Bu durum ekspresyon sırasında proteinlerin çökeleğe de geçtiğini göstermiştir.

Ekspresyon sonrası hücre lizatından aktivite ölçümü sırasında özellikle ALDH2 enzimi için pek fazla dehidrogenaz aktivitesi görülmemiştir. Western blot görüntüsü sonucunda proteinin bir kısmının çökelekte görülmesi inklüzyon cisimciklerinin oluştuğu ihtimalini düşündürmüştür. Rekombinant protein *E.coli*'de bazen doğru bir şekilde katlanmayabilir ve çoğunlukla birçok hayvan proteininde var olan disülfid bağlarını sentezleyememektedir. Proteinin üç boyutlu yapısı düzgün oluşmazsa o zaman sistemde inklüzyon cisimcikleri adı verilen çözünmez agregatlar oluşmaktadır. Bu nedenle proteinin biyolojik aktivitesinde sıkıntılarla karşılaşmaktadır. Proteinin inklüzyon cisimciklerinden geri kazanımı sorun oluşturmamaktadır, ancak deney tüpü içinde proteini doğru katlandırmak zor bir süreçtir. Çökelekteki proteinin geri kazanımı için yüksek lisans tezimde belirttiğim yöntemler kullanılarak refolding işlemi gerçekleştirildi (Demir 2014). Refolding işlemi sonucunda dehidrogenaz aktivitesi üzerinde %40'luk bir artış meydana geldi fakat deneyin tekrarlanma işlemlerinde sıkıntılarla karşılaşıldı. Deney devamlılık arz etmedi. Bu sebeple lizatın santrifüjü sonrası süpernatanta geçen kısmıyla çalışıldı, dehidrogenaz aktivitesi görülmemesi sebebiyle bu enzim için literatürde belirtilen esteraz aktivitesi ölçüm yöntemi kullanıldı.

Saflaştırma işlemi için Ni-NTA afinite kolon kromatografisi kullanıldı. Vektörümüzün yapısında bulunan 6xHistidin kuyrukları dörütlü koordinasyon bölgesi oluşturan nitriloasetik asite (NTA) immobilize Ni²⁺ metal iyonlarına etkili bir şekilde bağlandı ve bu sayede istenilen protein kolon materyaline tutundu. Numune kolona tatbik edildikten sonra ortamda bulunan safsızlıkların uzaklaştırılması için, kolon farklı oranlarda imidazol içeren tamponlarla gradientli olarak yıkandı.

Kolon yapısında bulunan metal iyonlarına bağlanan enzim imidazol ilavesiyle kolondan elüe edildi. İmidazol, histidin ile etiketlenmiş protein için yarışmalı inhibitör özelliği sergilemesinden dolayı elüsyonda kullanıldı. ALDH2 enziminin aktivitesini belirlemek için uygulanan esteraz yönteminde *p*-nitrofenil asetat (*p*-NPA) substratı kullanılmıştır.

Bu madde imidazol tarafından hidroliz edilmektedir yani ortama enzim konulmadığında da hidroliz sonucunda aktivite görülmektedir. Böylece ALDH2 aktivitesinde anormal düzeyde artışa sebep olmaktadır. Bunu bertaraf etmek için enzim çözeltisi diyaliz edilip ortamdaki imidazol uzaklaştırıldı. Diğer bir yöntem olarak da enzim çözeltisi kolondan imidazol ile elüe edilmeyip, gradientli olarak pH değerleri düşürüldü, böylece histidinlerin protonlanması sağlanılarak nikel reçinesi için afinitesi azaltıldı. Bu şekilde enzim kolondan elüe edildi.

Saflaştırılan füzyon proteinlerin saflığını kontrol etmek ve kütlelerini belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. Şekil 4.11-4.13'de gösterilen jellerde, tek bandının görülmesi füzyon proteinlerin saf olduğunu göstermektedir. SDS-PAGE'de füzyon protein ile birlikte kütleleri bilinen standart protein numuneleri aynı zamanda yürütüldü ve Şekil 4.14-4.16'da verildiği gibi R_f -log M_K standart grafiği çizildi. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktif formunun molekül kütlelerinin belirlenmesi amacıyla da Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Kolondan standart proteinler birer birer geçirildikten sonra K_{av} -log M_K standart grafiği çizildi ve Şekil 4.21'de verildi. Daha sonra saflaştırılan izoenzimler kolondan geçirilerek K_{av} değerleri belirlendi ve standart grafikten hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktif formlarının molekül kütleleri belirlendi. Çalışmamızda SUMO-hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin alt birim molekül kütleleri sırasıyla 68,45, 69,31 ve 67,85 kDa, olarak belirlendi. Aktif formlarının molekül kütleleri ise sırasıyla 277,97, 281,83 ve 275,42 kDa olarak belirlendi. Bu sonuçlardan görüldüğü gibi füzyon proteinin kütleleri çıkartıldığında hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin dört alt birime sahip olduğu ve tabii molekül kütleleri ile literatürde verilen mol kütleleri uygunluk göstermektedir.

ALDH izoenzimlerinin klonlanması ve saflaştırılması ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, Xiao *et al.* (2009) ALDH1A1, insan lensi cDNA kütüphanesinden PCR yöntemi kullanılarak klonlanmış ve *E. coli* 'de eksprese etmiştir. Saflaştırılmış rekombinant insan lensi ALDH1A1, pH 8,0'de optimum katalitik aktivite sergilemiş ve özellikle 4-hidroksinonenal (HNE; $K_M = 4,8$ mM) ve malonaldehit (K_M MDA = 3.5

mM) gibi toksik lipid aldehitlerin oksidasyonunu katalize ettiği bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmada sitral, disülfiram ve siyanamidinin insan lensi ALDH1A1'i sırasıyla 55, 101 ve 22610 mM IC₅₀ değerlerinde inhibe ettiği belirlenmiştir.

Hammen *et al.* (2002) doğal veya mutant ALDH1 ve ALDH2 cDNA'ları pT7-7 ifade vektörüne klonlanmış *E. coli* BL21 (DE3) pLysS suşunda eksprese etmişlerdir. Rekombinant şekilde eksprese edilen enzimler, protamin sülfat (1,25 mg/mL) ile muamele edilip ilk önce DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna daha sonra 4-hidroksiasetofenon esaslı afinite kolonuna tatbik edilmiştir. Enzimlerin saflığı, Coomassie Blue boyama prosedürü kullanılarak SDS-PAGE ile >% 95 olarak belirlenmiştir. Manzer *et al.* (2003) 2073 bp uzunluğundaki ALDH1A1'i tavşan cDNA'sını kullanarak klonlayıp dizilemişlerdir. Rekombinant tavşan ALDH1A1 proteini, bakulovirüs sistemi kullanılarak eksprese edilmiş ve afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Tavşan ALDH1A1'in katalitik olarak aktif olduğunu ve lipid peroksidasyonunun başlıca ürünlerinden olan hekzanal ($K_M = 3,5 \mu M$), 4-hidroksinonenal ($K_M = 2,1 \mu M$) ve malondialdehid ($K_M = 14,0 \mu M$) verimli bir şekilde okside ettiğini bulmuşlardır. Benzer kinetik sabitler, benzer deneysel koşullar kullanılarak sentezlenen ve saflaştırılan insan rekombinant ALDH1A1 proteini ile de gözlemlenmiştir.

Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, rekombinant insan ALDH1A1, Pfu polimeraz ile amplifiye edilmiş ALDH1A1 ORF'nin alt klonlanmasıyla hazırlanan bir pET20b türevi vektörden üretilmiştir. İnsan ALDH1A1 proteini *E. coli* C41 (DE3) hücrelerinde eksprese edildi. Enzim %50 doyumlukta amonyum sülfat çöktürme işlemi, Q sepharoz iyon değişim kolonu ve fenil-Sefaroz hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır (Bchini *et al.* 2013). Bu çalışmaya göre bizim kullandığımız yöntem daha kolay ve pratiktir.

Alam *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada insan tükürük aldehit dehidrojenaz (HsALDH) enzimi ilk kez insan tükürüğünden saflaştırmış ve farklı aromatik substratlar kullanılarak kinetik olarak karakterize etmişlerdir. Ayrıca, ağız boşluğundaki sıklıkla karşılaşılan

bazı yaygın maddelerin (etanol, hidrojen peroksit ve sodyum dodesil sülfat gibi) enzim üzerindeki etkisini araştırılmışlardır.

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak zor bir süreçtir. Enzimler protein yapısındaki makro moleküller olmaları nedeniyle şartların değişmesine karşı hassastırlar. Bu nedenle bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki gösterdiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu meydana gelen ürün ya da enzimatik reaksiyona öncülük eden diğer parametreler üzerinden belirlenmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerine etki eden faktörler arasında, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH, allosterik etkiler, iyonik şiddet, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir. Bunlar göz önüne alınarak *E.coli* (BL21DE3) hücresinde ekspresyon işlemi gerçekleştirilen hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin karakterizasyon işlemi gerçekleştirildi ve enzimlerin optimum iyonik şiddet, optimum pH, optimum sıcaklık parametreleri belirlendi.

hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimlerinin optimum pH'sı, pH 5,0-8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat 7,5-9,0 aralığında 50 mM Tris-HCl tamponu ve 9,0-10,5 aralığında 50 mM Glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanılarak enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucu hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimleri için en uygun optimum pH'nın 50 mM Glisin- NaOH pH=9,0 tamponu olduğu tespit edildi (Çizelge 4.8-4.13; Şekil 4.23 ve 4.24). hALDH2 enziminin optimum pH'sı, pH 5,0-8,0 aralığında 50 mM potasyum fosfat, 7,5-8,0 aralığında 50 mM Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. *p*-nitro fenil asetat (*p*-NPA) substratı pH= 8,0'den sonra bazik ortamda kendiliğinden parçalandığından dolayı çalışmada bu pH'nın üstüne çıkılmamıştır. Yapılan çalışmalar sonucu hALDH2 enzimi için en uygun optimum pH'nın 50 mM potasyum fosfat pH=8,0 tamponu olduğu tespit edildi. (Çizelge 4.14 ve 4.15; Şekil 4.25).

hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği optimum iyonik şiddeti belirlemek amacıyla Glisin-NaOH tamponunun optimal pH'daki 10-1000

mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Aktivite ölçümü yapılarak hALDH1A1 enzimi için en uygun optimum iyonik şiddetin 300 mM; hALDH1A3 enzimi içinse 200 mM Glisin-NaOH pH=9,0 tamponu olduğu tespit edildi (Çizelge 4.16, 4.17; Şekil 4.26 ve 4.27). hALDH2 enzimi için en uygun optimum iyonik şiddetin 600 mM NaH₂PO₄ pH=8,0 tamponu olduğu tespit edildi. (Çizelge 4.18; Şekil 4.28).

Her enzim, aktivitesinin optimum olduğu bir maksimum sıcaklık değerine sahiptir. Bu sıcaklığın üstünde enzimin üç boyutlu yapısında bozulmalar meydana gelerek aktivitesindeki düşüş artar. Çalışmamızda hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin optimum sıcaklığı, su banyosu kullanılıp 0°C ile 70°C arasında, 10'ar °C arayla artırılarak enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçülüp belirlendi. hALDH1A1 ve hALDH1A3 enzimlerinin optimum sıcaklık değeri 30°C olarak bulunurken; hALDH2 enziminin optimum sıcaklık değeri 40°C olarak bulundu (Çizelge 4.19-4.21; Şekil 4.29-4.31).

Literatürde bu enzimlerin K_M ve k_{cat} değerlerinin belirlendiği çalışmalar mevcuttur. Bu sebeple karakterizasyon çalışması gerçekleştirilirken bu değerler üzerine çalışma yapılmamıştır. hALDH1A1 enzimi için all trans retinal substrat olarak kullanıldığında K_M değeri 8,1×10⁻⁶ M, k_{cat} değeri 0,07 s⁻¹ olarak belirlenmiştir (Bchini *et al.* 2013). hALDH1A3 için all trans retinalin substrat olarak kullanılmasıyla K_M değeri 9,3×10⁻⁶ M olarak bulunurken; asetaldehit substrat olarak kullanılmasıyla bu değer 2,4×10⁻³ M olarak bulunmuştur. All trans retinal için k_{cat} değeri 1,6 s⁻¹ olarak belirlenmiştir (Moretti *et al.* 2016). Bu sonuçlar yorumlandığında hALDH1A3'in all trans retinale olan ilgisinin daha fazla olduğu görülmektedir. hALDH2 enzimde; 1 mM NAD⁺ varlığında pNPA'nın ortalama K_M değeri 9,5×10⁻⁶ M, k_{cat} değeri 1,57 s⁻¹ olarak bulunmuştur (Mukerjee and Pietruszko 1992).

Hücrel metabolizma, canlının hareketlerine izin veren gerekli reaksiyon serilerini içerir. Hücredeki bu reaksiyon serilerine metabolik yollar denir. Metabolik yolların organizmadaki metabolik ağın gerçek işlevsel birimleri olduğu iyi bilinmektedir (Schilling *et al.* 2000). Bu açıdan, herhangi bir yolda görülen bir bozukluk, tüm

metabolizmada artan bir kartopu etkisi yaratır. Hemen hemen tüm metabolik reaksiyonlar, reaksiyonun hızlı ve etkili olmasını sağlamak için çeşitli enzimler tarafından katalize edilir. Enzimlerin eksikliği, inhibisyonu veya aktivasyonu, enzimin gerçekleştirdiği metabolik yolu ve buna bağlı olarak da tüm metabolik sistemi etkiler. Bu nedenle, enzim-ilaç etkileşimi çalışmaları her zaman göz önünde bulundurulur. İlaçların, kimyasalların veya bunların metabolitlerinin mekanizmaları, metabolizma içindeki enzim faaliyetlerini etkilemek suretiyle yürütülür. Çünkü enzimler ksenobiyotiklerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, ALDH inhibitörlerinin belirlenmesinin normal ve hastalık süreçlerindeki rolleri anlamak açısından muazzam bir değere sahip olduğunu göstermektedir. Bu da daha güçlü ALDH inhibitörlerinin sentezlenmesi çalışmalarını teşvik etmiştir. Bu nedenle bugün birçok araştırmacı güçlü ve spesifik ALDH inhibitörleri geliştirmek için çalışmaktadır.

ALDH inhibitörlerine olan ilginin çeşitli sebepleri vardır. Bu sebeplerden ilki, ALDH-NAD⁺ kompleksine bağlanan substrat benzeri inhibitörler enzimin aktif bölgesi ile bu bölgeye bağlanan substrat molekülü arasındaki etkileşimi tanımlamayı amaçlayan yapısal çalışmalarda faydalı olabilir. İkincisi, güçlü ve spesifik ALDH inhibitörleri bu enzimin fizyolojik rolünün belirlenmesinde faydalı olabilir.

ALDH regülasyonu hücrede çoklu fonksiyonlar yapma potansiyeline sahiptir. Artmış ALDH aktivitesi, anti-tümör ilaca direncin bir mekanizması olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, ALDH'nin *in vivo* inhibisyonu için, enzimatik aktivasyon gerektirmeyen, ALDH'a spesifik, yarışmalı inhibisyon gösteren inhibitörler tercih edilir (Koppaka *et al.* 2012). Son yıllarda aldehit dehidrogenaz enzimlerinin inhibisyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin; Buchman *et al.* (2015) 53 tane bileşiğin aldehit dehidrogenaz izoenzimleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu 53 bileşikten 12'sinin aynı zamanda propionaldehidin ALDH2 tarafından oksidasyonunu modüle ettiği bulunmuştur. 12 bileşiğin ALDH2'ye yönelik seçiciliğini belirlemek için bileşiklerin 10 µM da tekli konsantrasyon ölçümleri ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH2, ALDH1B1, ALDH3A1, ALDH4A1 ve ALDH5A1 üzerine çalışma yapılarak gerçekleştirildi. On iki

bileşğin dördü, aromatik bir lakton yapısı içermektedir ve ALDH1/2 izoenzimlerinin güçlü inhibitörleri olduğu belirlenmiştir. Ancak bu maddeler ALDH3A1, ALDH4A1 ve ALDH5A1 üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermemiştir. Buchman and Hurley (2017) yaptıkları diğer çalışmada dört adet psoralen ve kumarin türevinin ALDH2'ye karşı inhibisyonunu karakterize etmiş ve bunların ALDH1/2 izoenzimine karşı seçiciliğini belirlemek için ALDH2 inhibitörü olan daidzine göre kıyaslamasını gerçekleştirmişlerdir. Daha güçlü bir inhibisyon profili oluşturmak için otuz üç yapısal analogu incelemiştirler. Bileşik 36 (ALDH2'nin seçici inhibitörü $K_i = 2,4 \mu\text{M}$) ve bileşik 32'yi (ALDH1A1 ve ALDH1A2'ye karşı 10 kat daha seçici) içeren beş ALDH1/2 izoenzimlerinden birine karşı seçici olan yedi bileşik geliştirmişlerdir.

Kimble-Hill *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada indol-2,3-dionların, ALDH1A1, ALDH2 ve ALDH3A1'e karşı farklı inhibisyon sergilediklerini bulmuşlardır. Kinetik ve X ışını kristalografisi verileri, bu inhibitörlerin aldehit bağlanmasına karşı yarışmalı olduğunu ve aktif bölgenin sistein kalıntılarıyla doğrudan etkileşimler oluşturduğunu ileri sürmektedir. Elde edilen veriler, bu bileşiklerin doğrudan ALDH3A1'deki katalitik nükleofil Cys243 ile etkileşime girdiği ancak ALDH2'de etkileşime girmediği göstermektedir.

Kawagishi *et al.* (2002) üç yeni bileşik içeren beş yağ asiti türevini, mantar *Clitocybe klavipe*'den izole etmişlerdir. Bu bileşiklerin yapıları spektral analizlerle aydınlatılmış daha sonra aldehit dehidrogenaz üzerine *in vitro* olarak inhibisyon etkilerini incelemiştirler. 1, 2 ve 5 numaralı bileşikler, aldehit dehidrogenaza karşı diğerlerine kıyasla güçlü inhibisyon etkisi göstermiştir. IC_{50} değerleri sırasıyla, 0,28, 0,43 ve 0,17 mM olarak bulunmuştur. 3 ve 4 numaralı bileşikler ise çok zayıf inhibisyon göstermiş ve inhibisyon oranları %50'den az bulunmuştur. Diğer bir çalışmada, farmakolojik olarak önemli fenolik bileşik olan, ferulik asidin ALDH ile simülatif pH koşullarında etkileşimi, spektroskopik yaklaşım kullanılarak incelendi. Ferulik asit, ALDH-ferulik asit kompleksinden oluşan floresans yoğunluğunda bir azalmaya meydana gelmiş, bu da ALDH aktivitesi üzerine karışık tipte inhibisyonuna neden olmuştur ($IC_{50} = 30.65 \mu\text{M}$). (Kolawole *et al.* 2017).

ALDH inhibitörlerinin önemi ve yapılan literatür araştırmaları sonucunda ALDH izoenzimleri üzerine yapılan çalışmalarda, enzimlerin tıbbi ilaçlarla etkileşimi üzerine pek çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda tıbbi uygulama da yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışmada seçilen antibiyotiklerin ALDH izoenzimleri (ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2) üzerine etkilerinin araştırıldığı hiçbir literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Literatürde antibiyotiklerle değişik kaynaklardan saflaştırılmış farklı enzimlerin etkileşimi ile ilgili çalışmalar günden güne artmaktadır. Örneğin; insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerine antibiyotiklerin etkisi incelenmiştir. K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru antibiyotiklerin sıralanışı; teikoplanin>rifamisin>tobramisin>seftriakson sodyum>sefuroksim sodyum >seftazidim pentahidrat >ornidazol >amikasin sülfat şeklinde bulunmuştur (Ekinci and Beydemir 2009). Seftriakson sodyum, imipenem ve ornidazol gibi bazı antibiyotiklerin insan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II'nin enzimatik aktivitesi üzerindeki *in vitro* inhibitör etkileri incelenmiş ve antibiyotiklerin bu izoenzimleri çok düşük oranlarda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ekinci *et al.* 2007). İnsan eritrositinden saflaştırılan glutasyon redüktaz enzimi üzerine imipenem, rifamisin, sülfanyilasetamit, seftazidim, kloramfenikol, seftriakson, vankomisin, sefuroksim ve ornidazol antibiyotiklerinin etkisi incelenmiş ve düşük dozlarda enzimi inhibe ettiği bulunmuştur (şentürk *et al.* 2008).

Antibiyotiklerin enzimler üzerine etkisini inceleyen diğer bir çalışmada, sefalosporin sınıfında bulunan sefoperazon, sefazolin, sefuroksim, seftazidim ve seftriakson antibiyotiklerinin koyun böbreğinden saflaştırılan aldoz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. AR enzimi çalışılan ilaçlar tarafından inhibe edilirken, SDH enzimi yalnızca sefuroksim tarafından inhibe edilmiştir (şengül and Beydemir 2017). Yapılan bir başka çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan alkol dehidrogenaz enzimi üzerine kanamisin sülfat, amikasin sülfat, gentamisin, linkomisin, ve klindamisin antibiyotiklerinin etkisi incelenmiştir. Bu antibiyotiklerin IC_{50} değerleri sırasıyla, 43,31, 36,47, 20,38, 18,73 ve 1,31 mM olarak bulunmuştur (Demir *et al.* 2017).

Çalışmada insan ALDH1A1, ALDH1A3 ve ALDH2 enzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için K_i sabitlerinin ve inhibisyon tiplerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Lineweaver and Burk 1934). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir. Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. hALDH1A1 enzimi için Çizelge 4.64'de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru antibiyotiklerin sıralanışı; seftriakson sodyum > rifamisin sodyum > levofloksasin > vankomisin HCl > moksifloksasin > amoksisilin > gentamisin sülfat > siprofloksasin > piperasilin sodyum > teikoplanin > amikasin sülfat > klindamisin fosfat > sefuroksim sodyum > sefoperazon sodyum > linkomisin HCl > sefazolin sodyum şeklindedir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyon etkisine sahip olan antibiyotik seftriakson sodyum'dur. K_i değerlerine göre yapılan sıralama IC_{50} değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynıdır. Üç sabit inhibitör konsantrasyonunda hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması tabloda verilmiştir. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplanarak inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Piperasilin sodyum, amoksisilin, teikoplanin ve linkomisin HCl yarışmasız inhibisyon gösterirken seftriakson sodyum, rifamisin sodyum, levofloksasin, vankomisin HCl, moksifloksasin, gentamisin sülfat siprofloksasin, amikasin sülfat, klindamisin fosfat, sefuroksim sodyum, sefoperazon sodyum ve sefazolin sodyum yarışmalı inhibisyon göstermiştir. Bu sonuçlara göre yarışmalı inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler aktif bölgeye bağlanmak konusunda substratla yarışırken, yarışmasız inhibisyon gösteren antibiyotikler enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanarak inhibisyon etkisi gösterirler. Bu enzim üzerine ampisilin sodyum, kanamisin sülfat, tobramisin, netilmisin ve ofloksasin inhibisyon etkisi göstermemiştir.

İnsan ALDH1A3 enzimi için Çizelge 4.65'de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru antibiyotiklerin sıralanışı; siprofloksasin > seftriakson sodyum >

levofloksasin> moksofloksasin HCl> rifamisin sodyum>sefuroksim sodyum> piperasilin sodyum>vankomisin HCl> teikoplanin>amikasin sülfat>gentamisin sülfat> linkomisin HCl>sefoperazon sodyum> klindamisin fosfat>sefazolin sodyum şeklindedir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyon etkisine sahip olan antibiyotik siprofloksasin'dir. K_i değerlerine göre yapılan sıralama IC_{50} değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynıdır. İnhibisyon etkisi sağlayan bütün antibiyotikler bu enzimi yarışmalı olarak inhibe etmiştir. Bu enzim üzerine ampisilin sodyum, amoksisilin, kanamisin sülfat, tobramisin, netilmisin ve ofloksasin inhibisyon etkisi göstermemiştir.

İnsan ALDH2 enzimi için Çizelge 4.66'da verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru antibiyotiklerin sıralanışı; sefuroksim sodyum>linkomisin HCl> seftriakson sodyum> amikasin sülfat> moksifloksasin HCl>sefoperazon sodyum>levofloksasin> gentamisin sülfat> piperasilin sodyum> klindamisin fosfat>siprofloksasin> sefazolin sodyum şeklindedir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyon etkisine sahip olan antibiyotik sefuroksim sodyum'dur. K_i değerlerine göre yapılan sıralama IC_{50} değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynıdır. Bu enzim içinse, linkomisin HCl hariç inhibisyon gösteren diğer antibiyotikler yarışmalı inhibisyon sergilemiştir. Linkomisin HCl enzimi yarışmasız olarak inhibe etmiştir. Bu enzim üzerine ampisilin sodyum, amoksisilin, kanamisin sülfat, tobramisin, netilmisin, rifamisin sodyum, teikoplanin, vankomisin HCl ve ofloksasin inhibisyon etkisi göstermemiştir

Literatürde aldehit dehidrogenazlar üzerine inhibisyon etkisi bulunan maddelerin inhibisyon tipini belirleyen çalışmalarda bulunmaktadır. Rekombinant insan ADH1A, ADH1B1, ADH1B2, ADH1B3, ADH1C1, ADH1C2, ADH2, ADH4 ile ALDH1A1 ve ALDH2 üzerine; aspirin ve başlıca metaboliti salisilatın etkisi incelenmiştir. Aspirin ve salisilatın ALDH1A1'i yarışmalı olarak ALDH2'yi de sırasıyla yarı yarışmalı ve yarışmasız olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Lee *et al.* 2005). Yapılan diğer bir çalışmada simetidinin rekombinant insan ADH1A, ADH1B1, ADH1B2, ADH1B3, ADH1C1, ADH1C2, ADH2, ADH4, ve ALDH1A1, ALDH2 ile ALDH3A1 enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda ALDH1A1 enzimi için yarışmasız inhibisyon gözlenirken, ALDH2 ile ALDH3A1 enzimleri üzerine yarışmalı

inhibisyon gözlenmiştir. Çalışılan aldehit dehidrogenaz enzim ailesi içinde en iyi inhibisyon ALDH1A1 üzerine görülmüştür ($K_i= 1,1\pm 0,1$ mM) (Lai *et al.* 2013).

ALDH enzimlerinin aktivitesinin azalması bazı durumlarda hayati tehlike doğuran sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle bu enzimlerin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması oldukça önemlidir. Bunun için de çok daha kapsamlı inhibisyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu bilgiler göz önüne alınırsa bu tez kapsamında yapılan çalışmaların önemi anlaşılmaktadır. Bu tez kapsamında elde edilen bütün sonuçlar Çizelge 5.1, Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3’de özetlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. İnsan beyin cDNA’sı ticari olarak satın alındı ve hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerine ait gen bölgesi, gene özgü primerlerin kullanıldığı PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı.
2. PCR ürünü A-T klonlama yöntemi ile pET-SUMO klonlama vektörüne klonlandı.
3. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin gen bölgesini taşıyan klonlama vektörü, *E.coli* (OneShot) hücrelerine transforme edildi ve petri üzerinde beyaz (rekombinant) koloniler gözlemlendi.
4. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin gen bölgesini taşıyan plazmit *E.coli* (BL21DE3) hücrelerine transforme edildi ve burada IPTG ile indüklenerek ekspresyonu sağlandı.
5. Vektörü taşıyan hücreler indükleyici bir ajanın olduğu besiyerinde uygun koşullarda büyütüldükten sonra parçalanıp hücre içeriği açığa çıkarıldı.
6. Hücre lizatı yoğunlaştırıldıktan sonra *E.coli* (BL21DE3) hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirilen SUMO-hALDH1A1, füzyon proteini nikel-nitrotriasetik asit (Ni-NTA) afinite kromatografisi ile %88,6 verimle, 24,1 EU/mg spesifik aktivite ile 64,1 kat saflaştırıldı. SUMO-hALDH1A3, füzyon proteini %79,04 verimle, 11,31 EU/mg spesifik aktivite ile 22,22 kat saflaştırıldı. SUMO-hALDH2, füzyon proteini %60,72 verimle, 5,87 EU/mg spesifik aktivite ile 36,46 kat saflaştırıldı.

7. SDS-PAGE ile füzyon proteinlerin saflığı kontrol edildi ve moleköl kütleleleri SUMO-hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 için sırasıyla 68,45, 69,31 ve 67,85 kDa olarak hesaplandı. Aktif formlarının moleköl kütleleri ise sırasıyla 277,97, 281,83 ve 275,42 kDa olarak belirlendi.
8. SUMO-hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 ekspresyonları Western blot analizi ile doğrulandı.
9. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Bu amaçla; ampisilin sodyum, piperasilin sodyum, amoksisilin, sefazolin sodyum, sefuroksim sodyum, seftriakson sodyum, sefoperazon sodyum, amikasin sülfat, kanamisin sülfat, gentamisin sülfat, tobramisin, netilmisin, siprofloksasin, levofloksasin, ofloksasin, moksofloksasin, rifamisin sodyum, vankomisin HCl, teikoplanin, linkomisin HCl, klindamisin fosfat, bileşikleri kullanıldı.
10. hALDH1A1, hALDH1A3 ve hALDH2 enzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için IC₅₀ ve Ki değerleri hesaplanarak, inhibisyon tipleri belirlendi.
11. Elde edilen bütün sonuçlar Çizelge 5.1, Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'de aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. hALDH1A1 enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili toplu sonuçlar

hALDH1A1 Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Toplu Sonuçlar			
Spesifik aktivite (EU/mg protein)	24,10		
Saflaştırma katsayısı	64,10		
Verim (%)	88,60		
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile (kDa)	68,45		
Jel filtrasyon metodu ile (kDa)	277,97		
Kinetik Çalışmalar			
Antibiyotikler	IC₅₀ (mM)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Ampisilin Sodyum	-	-	-
Piperasilin Sodyum	0,81	0,67± 0,11	Yarışmasız
Amoksisilin	0,14	0,12± 0,06	Yarışmasız
Sefazolin Sodyum	14,14	9,71± 1,16	Yarışmalı
Sefuroksim Sodyum	5,37	1,92± 1,15	Yarışmalı
Seftriakson Sodyum	0,02	0,0046± 0,0018	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	6,03	3,25± 0,71	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	1,74	1,36±0,44	Yarışmalı
Kanamisin Sülfat	-	-	-
Gentamisin Sülfat	0,15	0,26± 0,13	Yarışmalı
Tobramisin	-	-	-
Netilmisin	-	-	-
Siprofloksasin	0,55	0,29± 0,002	Yarışmalı
Levofloksasin	0,08	0,05± 0,009	Yarışmalı
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	0,13	0,072± 0,013	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	0,032	0,033± 0,004	Yarışmalı
Vankomisin HCl	0,089	0,064± 0,008	Yarışmalı
Teikoplanin	1,18	1,06± 0,20	Yarışmasız
Linkomisin HCl	9,63	8,31± 0,95	Yarışmasız
Klindamisin Fosfat	3,43	1,47± 0,18	Yarışmalı

Çizelge 5.2. hALDH1A3 enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili toplu sonuçlar

hALDH1A3 Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Toplu Sonuçlar			
Spesifik aktivite (EU/mg protein)	11,31		
Saflaştırma katsayısı	22,22		
Verim (%)	79,04		
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile (kDa)	69,31		
Jel filtrasyon metodu ile (kDa)	281,83		
Kinetik Çalışmalar			
Antibiyotikler	IC₅₀ (mM)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Ampisilin Sodyum	-	-	-
Piperasilin Sodyum	0,52	0,15± 0,01	Yarışmalı
Amoksisilin	-	-	-
Sefazolin Sodyum	11,95	6,63±1,62	Yarışmalı
Sefuroksim Sodyum	0,23	0,10± 0,04	Yarışmalı
Seftriakson Sodyum	0,05	0,03± 0,01	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	5,21	2,68±0,69	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	1,76	0,87±0,33	Yarışmalı
Kanamisin Sülfat	-	-	-
Gentamisin Sülfat	3,12	1,13± 0,15	Yarışmalı
Tobramisin	-	-	-
Netilmisin	-	-	-
Siprofloksasin	0,01	0,003± 0,001	Yarışmalı
Levofloksasin	0,082	0,049± 0,011	Yarışmalı
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	0,106	0,054± 0,018	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	0,097	0,088± 0,013	Yarışmalı
Vankomisin HCl	0,99	0,66± 0,21	Yarışmalı
Teikoplanin	1,52	0,67± 0,18	Yarışmalı
Linkomisin HCl	3,27	2,15± 0,06	Yarışmalı
Klindamisin Fosfat	11,18	6,54± 0,98	Yarışmalı

Çizelge 5.3. hALDH2 enziminin saflaştırılması ve inhibisyonu ile ilgili toplu sonuçlar

hALDH2 Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Toplu Sonuçlar			
Spesifik aktivite (EU/mg protein)	5,87		
Saflaştırma katsayısı	36,46		
Verim (%)	60,72		
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile (kDa)	67,85		
Jel filtrasyon metodu ile (kDa)	275,42		
Kinetik Çalışmalar			
Antibiyotikler	IC₅₀ (mM)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Ampisilin Sodyum	-	-	-
Piperasilin Sodyum	0,34	0,11±0,04	Yarışmalı
Amoksisilin	-	-	-
Sefazolin Sodyum	20,38	14,31±3,16	Yarışmalı
Sefuroksim Sodyum	0,0035	0,0017±0,00038	Yarışmalı
Seftriakson Sodyum	0,02	0,01±0,005	Yarışmalı
Sefoperazon Sodyum	0,14	0,06±0,009	Yarışmalı
Amikasin Sülfat	0,07	0,04±0,01	Yarışmalı
Kanamisin Sülfat	-	-	-
Gentamisin Sülfat	0,15	0,08±0,01	Yarışmalı
Tobramisin	-	-	-
Netilmisin	-	-	-
Siprofloksasin	0,91	0,58±0,08	Yarışmalı
Levofloksasin	0,14	0,07±0,01	Yarışmalı
Ofloksasin	-	-	-
Moksofloksasin	0,08	0,05±0,009	Yarışmalı
Rifamisin Sodyum	-	-	-
Vankomisin HCl	-	-	-
Teikoplanin	-	-	-
Linkomisin HCl	0,0038	0,0035±0,0002	Yarışmasız
Klindamisin Fosfat	0,70	0,49±0,10	Yarışmalı

KAYNAKLAR

- Aksu, Z., Tunç, Ö., 2005. Application of biosorption for penicillin G removal: comparison with activated carbon. *Process Biochemistry*, 40, 831–847.
- Alam, M.F., Laskar, A.A., Choudhary, H.H., Younus, H. 2016. Human Salivary Aldehyde Dehydrogenase: Purification, Kinetic Characterization and Effect of Ethanol, Hydrogen Peroxide and Sodium Dodecyl Sulfate on the Activity of the Enzyme. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 74, 307-315.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N. 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10),1565-1574.
- Allen, E.M., Anderson D.G., Florang, V.R, Khanna, M., Hurley T.D, Doorn, J.A. 2010. Relative inhibitory potency of molinate and metabolites with aldehyde dehydrogenase 2: implications for the mechanism of enzyme inhibition. *Chemical Research in Toxicology*, 23,1843–1850.
- Aristoff, P.A., Garcia, G.A., Kirchoff, P.D., Showalter, H.D. 2010. Rifamycins – Obstacles and Opportunities. *Tuberculosis*, 90, 94-118.
- Arnold, S. L., Kent, T., Hogarth, C. A., Griswold, M. D., Amory, J. K., Isoherranen, N. 2015. Pharmacological inhibition of ALDH1A in mice decreases all-trans retinoic acid concentrations in a tissue specific manner, *Biochemical Pharmacology*, 95, 177-192.
- Atherton, S.J., Lambert, C., Schultz, J., Williams,N., Zigman, S. 1999. Fluorescence studies of lens epithelial cells and their constituents. *Photochemistry and Photobiology*, 70, 823–828.
- Badawy, A.A., Morgan C.J. 2007. Tryptophan metabolites as potent inhibitors of aldehyde dehydrogenase activity and potential alcoholism-aversion therapeutic agents. *International Congress Series*, 1304, 344–351.
- Bchini, R., Vasiliou, V., Branlant, G., Talfournier, F., Rahuel-Clermont, S. 2013. Retinoic acid biosynthesis catalyzed by retinal dehydrogenases relies on a rate-limiting conformational transition associated with substrate recognition. *Chemico- Biological Interaction*, 202(1-3), 78-84.
- Bergmanson, J.P., Soderberg, P.G. 1995. The significance of ultraviolet radiation for eye diseases:a review with comments on the efficacy of UV-blocking contact lenses. *Ophthalmic Physiological Optics*, 15, 83–91.
- Bloemendal, H. deJong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N.H., Slingsby, C., Tardieu, A. 2004. Ageing and vision:structure, stability and function of lens crystallins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 86, 407–485.
- Bloom, V.M., Freyer, G.A. and Micklos, D.A. 1996. *Laboratory DNA Science*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.
- Boggio, R., Colombo, R., Hay, R. T., Draetta, G. F., Chiocca, S. 2004. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Molecular cell*, 16(4), 549-561.
- Brooks, P. J., Zakhari, S. 2014. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55, 77–91.
- Brooks, P.J., Theruvathu, J.A., 2005. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*, 35, 187 -193.

- Buchman, C.D., Hurley, T.D., 2017. Inhibition of the Aldehyde Dehydrogenase 1/2 Family by Psoralen and Coumarin Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(6), 2439-2455.
- Buchman, C.D., Mahalingan, K.K., Hurley, T.D. 2015. Discovery of a series of aromatic lactones as ALDH1/2-directed inhibitors. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 38-44.
- Buddi, R., Lin, B., Atilano, S.R., Zorapapel, N.C., Kenney, M.C., Brown, D.J. 2002. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50, 341–351.
- Cai, C.X., Birk, D.E., Linsenmayer, T.F. 1998. Nuclear ferritin protects DNA from UV damage in corneal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 1037–1051.
- Casida, J.E., Ford, B., Jinsmaa, Y., Sullivan, P., Cooney, A., Goldstein, D.S. 2014. Benomyl, aldehyde dehydrogenase, DOPAL, and the catecholaldehyde hypothesis for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chemical Research in Toxicology*, 27(8):1359-61.
- Ceylan, H., Erdoğan, O. 2017. Cloning, expression, and characterization of human brain acetylcholinesterase in *Escherichia coli* using a SUMO fusion tag. *Turkish Journal Biology* 41, 77-87.
- Chao, Y.C., Liou, S.R., Tsai, S.F., Yin, S.J., 1993. Dominance of the mutant ALDH2*2;allele in the expression of human stomach aldehyde dehydrogenase-2 activity. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China Part-B*, 17, 98 -102.
- Chen, C.H., Budas, G.R., Churchill, E.N., Disatnik, M.H., Hurley, T.D., Mochly-Rosen, D. 2008. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 321, 1493–1495.
- Chen, Y., Zhu, J.Y., Hong, K.H., Mikles, D.C., Georg, G.I., Goldstein, A.S., Amory, J.K., Schönbrunn, E. 2018. Structural Basis of ALDH1A2 Inhibition by Irreversible and Reversible Small Molecule Inhibitors. *ACS Chemical Biology*, doi: 10.1021/acscchembio.7b00685.
- Chung, S., Hedlund, E., Hwang, M., et al. 2005. The homeodomain transcription factor Pitx3 facilitates differentiation of mouse embryonic stem cells into AHD2-expressing dopaminergic neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 28, 241 -252.
- Collard, F., Vertommen, D., Fortpied, J., et al. 2007. Identification of 3-deoxyglucosone dehydrogenase as aldehyde dehydrogenase 1A1 (retinaldehyde dehydrogenase 1). *Biochimie*, 89, 369 -373.
- Condello, S., Morgan, C.A., Nagdas, S., Cao, L., Turek, J., Hurley, T.D., Matei, D. 2015. β -Catenin-regulated ALDH1A1 is a target in ovarian cancer spheroids. *Oncogene*, 34, 2297–2308.
- Cunningham, C.C., Coleman, W.B., Spach, P.I. 1990. The effects of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial energy metabolism. *Alcohol and Alcoholism*, 25,127–136.
- David Greenwood, in *Antibiotic and Chemotherapy* (Ninth Edition), 2010
- Demir, Y., Beydemir, S. 2015. Purification, refolding, and characterization of recombinant human paraoxonase-1, *Turkish Journal of Chemistry* 39(4),764-776.

- Demir, Y., Şengül, B., Ergun, B., Beydemir, Ş. 2017. Alcohol dehydrogenase from sheep liver: Purification, characterization and impacts of some antibiotics. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 7(3), 151-159.
- Demir, Y., 2014. İnsan Karaciğeri Pon1 Enzim Geninin Klonlanması, İnküzyon Cisimciklerinden Arındırılarak Protein Yapısının Yeniden Katlandırılması Ve Enzimin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Deng, L., Shipley, G.L., Loose-Mitchell, D.S, et al. 2003. Coordinate regulation of the production and signaling of retinoic acid by estrogen in the human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88, 2157-2163.
- Doan, R.W., Storms, N.J., Chao, D.P., McDonnell, J.P. 2010. Chute, Inhibition of aldehyd dehydrogenase expands hematopoietic stem cells with radioprotective capacity, *Stem cells*, 28, 523-534.
- Doorn, J.A., Hurley, T.D., Peterson, D.R. 2006. Inhibition of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by 4- hydroxynon-2-enal and 4-oxonon-2-enal. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 102– 110.
- Duan, J.J., Cai, J., Guo, Y.F., Bian, X.W., Yu, S.C. 2016. ALDH1A3, a metabolic target for cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Cancer*, 139(5), 965-975.
- Dupe, V., Matt, N., Garnier, J. M., Chambon, P., Mark, M., Ghyselinck, N.B. 2003. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 100, 14036–14041.
- Ekinci, D, Beydemir, S. 2009. Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology*, 617(1-3),84-89.
- Ekinci, D., Beydemir, S., Alım, Z., 2007. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacological Reports*, 59, 580–587.
- Erdoğan, O., Adıgüzel, A., Aşkın, H., Şişecioğlu, M., Taşkın, M., Budak, H., Anar, M., Unver, Y., Ceylan, H., Yıldız, M., Baltacı, M.Ö., 2014. Moleküler Biyoloji Teknikleri Laboratuvar El Kitabı, ss-145-160 Erzurum, Türkiye.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11, 81-128.
- Estey, T., Cantore, M., Weston, P.A., Carpenter, J.F., Petrash, J.M., Vasiliou, V. 2007. Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystallin ALDH3A1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 4382–4392.
- Estey, T., Chen, Y., Carpenter, J.F., Vasiliou, V. 2010. Structural and functional modifications of corneal crystallin ALDH3A1 by UVB light. *PLoS One*, 5, e15218.
- Fan, X., Molotkov, A., Manabe, S., et al. 2003. Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 4637-4648.
- Farres, J., Wang, X., Takahashi, K., et al. 1994. Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to

- study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 13854 -13860.
- Ferreira, J.C., Mochly-Rosen, D. 2012. Nitroglycerin use in myocardial infarction patients. *Circulation Journal*, 76, 15–21.
- Galter, D., Buervenich, S., Carmine, A., Anvret, M., Olson, L. 2003. ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiology of Disease*, 14, 637 -647.
- Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C. 2006. Mitochondrial glutathione:hepatocellular survival-death switch. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(3), 3–6.
- Gil-Ibanez, P., Bernal, J., Morte, B. 2014. Thyroid hormone regulation of gene expression in primary cerebrocortical cells: role of thyroid hormone receptor subtypes and interactions with retinoic acid and glucocorticoids. *PloS one*, 9, e91692.
- Graham, C.E, Brocklehurst, K., Pickersgill, R.W., et al. 2006. Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3. *Biochemical Journal*, 394, 67–75.
- Hammen, P. K., Allali-Hassani, A., Hallenga, K., Hurley, T.D., Weiner, H. 2002. Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, 41, 7156–7168.
- Harrison, C.J, Bratcher, D. 2008. Cephalosporins: a review. *Pediatrics in Review*, (8),264-267.
- Herrmann, J., Lerman, L. O., Lerman, A. 2007. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circulation research*, 100(9), 1276-1291.
- Huang, H., Manton, K.G. 2004. The role of oxidative damage in mitochondria during aging:a review. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1100–1117.
- Jagdale, S., Pawar, S. 2017. Gellified Emulsion of Ofloxacin for Transdermal Drug Delivery System. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(2), 229-239.
- Jing, L., Jin, C.M., Li, S.S., Zhang, F.M., Yuan, L., Li, W.M., Sang, Y., Li, S., Zhou, L.J. 2012. Chronic alcohol intake-induced oxidative stress and apoptosis:role of CYP2E1 and calpain-1 in alcoholic cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359, 283–292.
- Kamino, K., Nagasaka, K., Imagawa, M., et al. 2000. Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset alzheimer's disease in the Japanese population. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 192 -196.
- Kayaalp, S.O., 2000. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.10. Baskı
- Kawagishi, H., Miyazawa, T., Kume, H., Arimoto, Y., Inakuma, T. 2002. Aldehyde dehydrogenase inhibitors from the mushroom *Clitocybe clavipes*. *Journal of Natural Products*, 65(11), 1712-1714.
- Khanna, M., Chen, C.H., Kimble-Hill, A., Parajuli, B., Perez-Miller, S., Baskaran, S., Kim, J., Dria, K., Vasiliou, V., Mochly-Rosen, D., Hurley, TD. 2011. Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 43486–43494.
- Kılıç, D., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2017. Effect of mutation in active site residue Trp209 to Val, Leu, Ile and Pro on the catalytic activity and affinity for some benzenesulfonamides of human carbonic anhydrase II. *Turkish Journal of Biology*, 41, 835-840.

- Kim, H., Lapointe, J., Kaygusuz, G., Ong, D.E., Li, C., van de Rijn, M., Brooks, J.D., Pollack, J.R. 2005. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Research*, 65, 8118-8124.
- Kimble-Hill, A.C., Parajuli, B., Chen, C.H., Mochly-Rosen, D., Hurley, T.D. 2014. Development of selective inhibitors for aldehyde dehydrogenases based on substituted indole-2,3-diones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(3), 714-722.
- Kolawole, A., Agaba, R.J., Oluwole, M.O. 2017. Spectroscopic characterisation of interaction of ferulic acid with aldehyde dehydrogenase (ALDH). *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 247-255.
- Kong, B., Wu, W., Cheng, T., et al. 2016. A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/ Erk-induced hyperactive mTOR signalling. *Gut*, 65(4), 647-57
- Kools, S.A.E., Moltmann, J.F., Knacker, T. 2008. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50, 59-65.
- Koppaka, V., Thompson, D.C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K.C., Juvonen, R.O., Petersen, D., Deitrich, R.A., Hurley, T.D., Vasiliou, V. 2012. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application, *Pharmacological Reviews*, 64(3), 520-539.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lai, C.L., Li, Y.P., Liu, C.M., Hsieh, H.S., Yin, S.J. 2013. Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by cimetidine and assessment of its effects on ethanol metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 202(1-3), 275-282.
- Larson, H.N., Zhou, J., Chen, Z., Stamler, J.S., Weiner, H., Hurley, T.D. 2007. Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: roles of residues 475 and 487. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 12940 -12950.
- Laskar, A.A., Khan, M.A., Askari, F., Younus, H. 2017. Thymoquinone binds and activates human salivary aldehyde dehydrogenase: Potential therapy for the mitigation of aldehyde toxicity and maintenance of oral health. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 99-110.
- Laskar, A.A., Alam, F.M., Ahmad, M., Younus, H. 2018. Kinetic and biophysical investigation of the inhibitory effect of caffeine on human salivary aldehyde dehydrogenase: Implications in oral health and chemotherapy *Journal of Molecular Structure*, 1157, 61-68.
- Lassen, N., Bateman, J.B., Estey, T., Kuszak, J.R., Nees, D.W., Piatigorsky, J., Duester, G., Day, B.J., Huang, J., Hines, L.M., Vasiliou, V. 2007. Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1(-/-)/Aldh1a1(-/-)* knock-out mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 25668 -25676.
- Lassen, N., Pappa, A., Black, W.J., Jester, J.V., Day, B.J., Min, E., Vasiliou, V. 2006. Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 41,1459 -1469.
- Lee, S.L., Lee, Y.P., Wu, M.L., Chi, Y.C., Liu, C.M., Lai, C.L., Yin, S.J. 2015. Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by aspirin and

- salicylate: assessment of the effects on first-pass metabolism of ethanol. *Biochemical Pharmacology*, 95(1),71-9.
- Li, M., Su, Z.G., Janson, J.C. 2004. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, 33(1), 1-10.
- Li, Y., Zhang, D., Jin, W., Shao, C., Yan, P., Xu, C., Sheng, H., Liu, Y., Yu, J., Xie, Y., Zhao, Y., Lu, D., Nebert, D.W., Harrison, D.C., Huang, W., Jin, L. 2006. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficiency of sublingual nitroglycerin. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 506-511.
- Li, Z., Srivastava, S., Yang, X., Mittal, S., Norton, P., Resau, J., Haab, B., Chan, C. 2007. A hierarchical approach employing metabolic and gene expression profiles to identify the pathways that confer cytotoxicity in HepG2 cells. *BMC Systems Biology*, 1, 21.
- Lineweaver, H., Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Lipsky, J.J., Shen, M.L., Naylor, S. 2001. In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chemico-Biological Interactions*, 130–132(1-3), 93–102.
- Liu, Y., Yamanaka, M., Abe-Kanoh, N., Liu, X., Zhu, B., Munemasa, S., Nakamura, T., Murata, Y., Nakamura, Y. 2017. Benzyl isothiocyanate ameliorates acetaldehyde-induced cytotoxicity by enhancing aldehyde dehydrogenase activity in murine hepatoma Hepalclc7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 305-313.
- Liu, Z., Tian, C., Lub, L., Su, X. 2016. novel aptamer-mediated CuInS₂ quantum dots@graphene oxide nanocomposites-based fluorescence “turn off-on” nanosensor for highly sensitive and selective detection of kanamycin RSC *Advances*, 6, 10205.
- Liu, Z.J., Sun, Y.J., Rose, J., Chung, Y.J., Hsiao, C.D., Chang, W.R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., Wang, B.C. 1997. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural Biology*, 4, 317-326.
- Lowe, E.D., Gao, G.Y., Johnson, L.N., Keung, W.M. 2008. Structure of daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 4482–4487.
- Lu, Y., Cederbaum, A.I. 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine*, 44, 723–738.
- Madigan, M. Martinko, J. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi palme yayıncılık ankara
- Manzer, R., Qamar, L., Estey, T., Pappa, A., Petersen, D.R., Vasiliou, V. 2003. Molecular cloning and baculovirus expression of the rabbit corneal aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1) cDNA. *DNA and Cell Biology*, 22, 329-338.
- Marblestone, J.G., Edavettal, S.C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X., & Butt, T.R., 2006. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Science*, 15(1), 182-189.

- Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D., Vasiliou, V. 2008. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4, 697–720.
- Marchitti, S.A., Deitrich, R.A., Vasiliou, V. 2007. Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacological Reviews*, 59(2):125-150.
- Matsuda, T., Yabushita, H., Kanaly, R.A., Shibutani, S., Yokoyama, A. 2006. Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1374 -1378.
- Moretti, A., Li, J., Donini, S., Sobol, R.W., Rizzi, M., Garavaglia, S. 2016. Crystal structure of human aldehyde dehydrogenase 1A3 complexed with NAD⁺ and retinoic acid. *Scientific Reports*, 6, 35710.
- Morgan, C.A., Hurley, T.D. 2015. Characterization of two distinct structural classes of selective aldehyde dehydrogenase 1A1 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(4), 1964-1975.
- Mukerjee, N., Pietruszko, R. 1992. Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase substrate specificity: comparison of esterase with dehydrogenase reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 299(1), 23-29.
- Muto, M., Hitomi, Y., Ohtsu, A., Ebihara, S., Yoshida, S., Esumi, H. 2000. Association of aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism with multiple oesophageal dysplasia in head and neck cancer patients. *Gut*, 47, 256 -261.
- Neubauer, R., Neubauer, A., Wölkart, G., Schwarzenegger, C., Lang, B., Schmidt, K., Russwurm, M., Koesling, D., Gorren, A.C., Schrammel, A., Mayer, B. 2013. Potent inhibition of aldehyde dehydrogenase-2 by diphenyleneiodonium: focus on nitroglycerin bioactivation. *Molecular Pharmacology*, 84(3), 407-414.
- Niederreither, K., Dolle, P. 2008. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature Reviews Genetics*, 9, 541–553.
- Ohta, S., Ohsawa, I. 2006. Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochromecoxidase complex and aldehyde detoxification. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9, 155–166.
- Onenli-Mungan, N., Yuksel, B., Elkay, M., Topaloğlu, A.K., Baykal, T., Ozer, G. 2004. Type II hyperprolinemia: a case report. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 46, 167 -169.
- Overstreet, D.H., Knapp, D.J., Breese, G.R., Diamond, I. 2009. A selective ALDH-2 inhibitor reduces anxiety in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94, 255–261.
- Pan, J., He, S.Z., Xu, H.Z., Zhan, X.J., Yang, X.N., Xiao, H.M., Shi, H.X., Ren, J.L. 2008. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 5857–5867.
- Papich, M.G. 2016. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs Small and Large Animal Fourth Edition Elsevier*
- Pappa, A., Chen, C., Koutalos, Y., Townsend, A.J., Vasiliou, V. 2003. Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet-and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 1178–1189.

- Paula Vieira, A., Pimenta, A.F.R., Silva, D., Helena Gil, M., Alves, P., Coimbra, P., Jorge Guiomar, A. 2017. Surface modification of an intraocular lens material by plasma-assisted grafting with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), for controlled release of moxifloxacin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 120, 52-62.
- Peng, G.S., Chen, Y.C., Tsao, T.P., Wang, M.F., Yin, S.J. 2007. Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for partial protection against alcoholism in Asians, heterozygous for the variant ALDH2 * 2 gene allele. *Pharmacogenetics and Genomics*, 17, 845 -855.
- Peng, Y., Ye, X., Li, Y., Bu, T., Chen, X., Bi, J., Zhou, J., Yao, Z. 2013. Teicoplanin as an Effective Alternative to Vancomycin for Treatment of MRSA Infection in Chinese Population: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One*, 8(11), e79782.
- Picklo, M.J., Olson, S.J., Markesbery, W.R., Montine, T.J. 2001. Expression and activities of aldo-keto oxidoreductases in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60, 686 -695.
- Qiao, M., Ying, G.G., Singer, A.C., Zhu, Y.G. 2018. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, 110, 160-172.
- Rizzo, W.B., Carney, G. 2005. Sjogren-Larsson syndrome: diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). *Human Mutation*, 26, 1 -10.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiological Reviews*, 80, 1021 -1054.
- Russo, S., Papa, V., Di Bella, A., Favero, A., Radulescu, C., Gafencu, O., Carstocea, B., Milazzo, G. 2007. Dexamethasone-netilmicin: a new ophthalmic steroid-antibiotic combination. Efficacy and safety after cataract surgery. *Eye (Lond)*. 21(1), 58-64.
- Saw, Y.T., Yang, J., Ng, S.K., Liu, S., Singh, S., Singh, M., Welch, W.R., Tsuda, H., Fong, W.P, Thompson, D., Vasiliou, V., Berkowitz, R.S., Ng, S.W. 2012. Characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes in ovarian cancer tissues and sphere cultures. *BMC Cancer*, 12, 329.
- Schilling, C.H., Letscher, D., Palsson, B.Ø., 2000. Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway oriented perspective. *Journal of theoretical biology*, 203, 229–248.
- Senturk, M., Kufrevioglu, O.I., Ciftci, M. 2008. Effects of some antibiotics on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(1),144-148.
- Shames, D.S., Girard, L., Gao, B., Sato, M., Lewis, C.M., Shivapurkar, N., Jiang, A., Perou, C.M., Kim, Y.H., Pollack, J.R., Fong, K.M., Lam, C.L., Wong, M., Shyr, Y., Nanda, R., Olopade, O.I., Gerald, W., Euhus, D.M., Shay, J.W., Gazdar, A.F., Minna, J.D.2006. A genomewide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Medicine*, 3, e486.
- Shao, C., Sullivan, J.P., Girard, L., Augustyn, A., Yenerall, P., Rodriguez-Canales, J., Liu, H., Behrens, C., Shay, J.W., Wistuba, I.I., Minna, J.D. 2014. Essential role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for the maintenance of non-small cell lung

- cancer stem cells is associated with the STAT3 pathway. *Clinical Cancer Research*, 20, 4154–4166.
- Sharma, D., Patel, R.P., Zaidi, S.T.R., Sarker, M.M.R., Lean, Q.Y., Ming, L.C. 2017. Interplay of the Quality of Ciprofloxacin and Antibiotic Resistance in Developing Countries. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 546.
- Shen, C., Wang, C., Han, S., Wang, Z., Dong, Z., Zhao, X., Wang, P., Zhu, H., Sun, X., Ma, X., Zhu, H., Zou, Y., Hu, K., Ge, J., Sun, A. 2017. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency negates chronic low-to-moderate alcohol consumption-induced cardioprotection possibly via ROS-dependent apoptosis and RIP1/RIP3/MLKL-mediated necroptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(8), 1912-1918.
- Sladek, N.E. 1999. Aldehyde dehydrogenase mediated cellular relative insensitivity to the oxazaphosphorines. *Current Pharmaceutical Design*, 5, 607-625.
- Sladek, N.E. 2003. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 7-23.
- Song, K., Kim, S., Na, J.Y., Park, J.H., Kim, J.K., Kim, J.H., Kwon, J. 2014. Rutin attenuates ethanol-induced neurotoxicity in hippocampal neuronal cells by increasing aldehyde dehydrogenase 2. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 228-33.
- Sreerama, L., Sladek, N.E. 1993. Identification and characterization of a novel class 3 aldehyde dehydrogenase overexpressed in a human breast adenocarcinoma cell line exhibiting oxazaphosphorine-specific acquired resistance. *Biochemical Pharmacology*, 45, 2487-2505.
- Stefan, C.P., Koehler, J.W., Minogue, T.D. 2016. Targeted next generation sequencing for the detection of ciprofloxacin resistance markers using molecular inversion probes. *Scientific Reports*, 6, 25904.
- Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H., Hurley, T.D. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*, 5, 701 -711.
- Sydow, K., Daiber, A., Oelze, M., Chen, Z., August, M., Wendt, M., Ullrich, V., Mülsch, A., Schulz, E., Keaney, J.F., Stamler, J.S., Münzel, T. 2004. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 482-489.
- Şengül, B., Beydemir, Ş. 2017. The interactions of cephalosporins on polyol pathway enzymes from sheep kidney. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(1), 35-44.
- Tano, E., Cars, O., Lowdin, E. 2005. Pharmacodynamic studies of moxifloxacin and erythromycin against intracellular *Legionella pneumophila* in an in vitro kinetic model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 240–242.
- Tseng, Y.M., Jin, Y.R., Chen, I.J., Huang, F.D., Wu, S.H., Ma, H., Chen, S.Y., Tsai, L.Y., Tsai, S.M., Lee, J.H. 2008. Roles of the genetic variation of alcohol-metabolizing enzymes on biomarkers in trauma patients with excessive alcohol intake at emergency department. *Clinica Chimica Acta*, 389, 14–18.
- Vasiliou, V., Nebert, D.W. 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics*, 2, 138 -143.

- Vasiliou, V., Pappa, A., Estey, T. 2004. Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 36, 279-299.
- Velazquez-Fernandez, D., Laurell, C., Geli, J., Höög, A., Odeberg, J., Kjellman, M., Lundeberg, J., Hamberger, B., Nilsson, P., Bäckdahl, M. 2005. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery*, 138, 1087 -1094.
- Verhagen, C., Hoekzema, R., Verjans, G.M., Kijlstra, A. 1991. Identification of bovine corneal protein 54(BCP54) as an aldehyde dehydrogenase. *Experimental Eye Research*, 53, 283–284.
- Wang, B., Buchman, C.D., Li, L., Hurley, T.D., Meroueh, S.O. 2014. Enrichment of chemical libraries docked to protein conformational ensembles and application to aldehyde dehydrogenase 2. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 2105-2116.
- Wang, J.S., Fang, Q., Sun, D.J., Chen, J., Zhou, X.L., Lin, G.W., Lu, H.Z., Fei, J. 2001. Genetic modification of hematopoietic progenitor cells for combined resistance to 4-hydroperoxycyclophosphamide, vincristine, and daunorubicin. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22, 949-955.
- Wang, Z., Li, H., Guan, W., Ling, H., Wang, Z., Mu, T., Shuler, F.D., Fang, X. 2010. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein expression and purification*, 73(2), 203-208.
- Waugh, D. S., 2005. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnology*, 23(6), 316-320.
- Whitfield, J.B., Zhu, G., Heath, A.C., Powell, L.W., Martin, N.G. 2001. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25, 1037–1045.
- Wu, W., Schecker, J., Würstle, S., Schneider, F., Schönfelder, M., Schlegel, J. 2018. Aldehyde dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) is regulated by autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Letter*, 417, 112-123.
- Xiao, T., Shoeb, M., Siddiqui, M.S., Zhang, M., Ramana, K.V., Srivastava, S.K., Vasiliou, V, Ansari, N.H. 2009. Molecular cloning and oxidative modification of human lens ALDH1A1: implication in impaired detoxification of lipid aldehydes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(9), 577-84.
- Xu, W.H., Zhang, G., Zou, S.C., Li, X.D., Liu, Y.C. 2006 Occurrence and seasonal changes of antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China. *Journal of Environmental Sciences*, 27, 2458–2462.
- Xu, X., Chai, S., Wang, P., Zhang, C., Yang, Y., Yang, Y., Wang, K. 2015. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells *Cancer Letter*, 369(1), 50-57.
- Yokoyama, A., Muramatsu, T., Omori, T., Yokoyama, T., Matsushita, S., Higuchi, S., Maruyama, K., Ishii, H. 2001. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis*, 22, 433 -439.
- Young, C.L., Britton, Z.T., Robinson, A. S. 2012. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7(5), 620-634.

- Yusef, D., Gonzalez, B.E., Foster, C.B., Goldfarb, J., Saracusa, C., Worley, S., Sabella, C. 2017. Piperacillin-Tazobactam-induced Adverse Drug Events in Pediatric Patients on Outpatient Parenteral Antimicrobial Therapy. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(1), 50-52.
- Zhai, Y., Sperkova, Z., Napoli, J.L. 2001. Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA. *Journal of Cellular Physiology*, 186, 220-232.
- Zhanel, G.G., Ennis, K., Vercaigne, L., Walkty, A., Gin, A.S., Embil, J., Smith, H., Hoban, D.J. 2002. A critical review of the fluoroquinolones. Focus on respiratory tract infections. *Drugs*, 62,13–59.
- Zhang, W.M., Yang, T., Pan, X.Y., Liu, X.L., Lin, H.X., Gao, Z.B., Yang, C.G., Cui, Y.M. 2017. The synthesis and antistaphylococcal activity of dehydroabiatic acid derivatives: modifications at C12 and C7. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 127, 917-927.
- Zhang, X., Shen, D., Lü, Z.R., Zhan, Y., Si, N., Li, M.M., Yang, J.M., Zhou, H.M., Park, Y.D., Zhang, Q., Lee, J. 2014. Effects of hydroxysafflor yellow A on ALDH1: Inhibition kinetics and molecular dynamics simulation *Process Biochemistry*, 49(10),1664-1672.
- Zhao, P., Kalhorn, T.F., Slattery, J.T. 2002. Selective mitochondrial glutathione depletion by ethanol enhances acetaminophen toxicity in rat liver. *Hepatology (Baltimore,MD)* 36, 326–335.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2007 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. Ayrıca 2009 yılında çift anadal programı ile başladığı Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü 2012 yılında tamamladı. 2011 yılının Ağustos ayında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2014 Mayıs ayında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yılın Ağustos ayında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2018 Mayıs ayında doktora eğitimini tamamladı.