



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

Pseudomonas aeruginosa'da PİYOVERDİN ÜRETİMİNİ
ENGELLEYEN BİR İNHİBİTÖRÜN MOLEKÜLER
HEDEFİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Esra UYANIK

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK

SAMSUN
2022

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI



Pseudomonas aeruginosa'da PİYOVERDİN ÜRETİMİNİ
ENGELLEYEN BİR İNHİBİTÖRÜN MOLEKÜLER
HEDEFİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Esra UYANIK

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 119Z837 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2022

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

İmza
25 / 08 / 2022
Esra UYANIK

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : *Pseudomonas aeruginosa*'da PİYOVERDİN ÜRETİMİNİ ENGELLEYEN BİR İNHİBİTÖRÜN MOLEKÜLER HEDEFİNİN BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 23.06.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 15

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

İmza
23 / 06 / 2022
Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa'da PİYOVERDİN ÜRETİMİNİ ENGELLEYEN BİR İNHİBİTÖRÜN MOLEKÜLER HEDEFİNİN BELİRLENMESİ

Esra UYANIK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Haziran/2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK

Bakterilerin birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmış olmaları, meydana getirdikleri enfeksiyonlar ile mücadelede önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle günümüzde kullanılan geleneksel antibiyotikler yerine, etki mekanizmaları farklı yeni nesil ilaçların keşfi büyük önem taşımaktadır.

Virülans, patojen mikroorganizmaların bulunduğu konağa zarar verebilme kapasitesi olarak tanımlanır. Toksin üretimi, çoğunluk algılanması (quorum sensing) ve biyofilm mikroorganizmaların virülans mekanizmaları arasında sayılabilir. Bu mekanizmalara karşı üretilen ilaçlar ise antivirülans ilaçlar olarak adlandırılır. Geleneksel antibiyotikler ile kıyaslandığında antivirülans ilaçlar, bakteri üzerinde evrimsel baskı oluşturmamakta ve direnç meydana getirmemektedir. Antivirülans ilaçlar ile terapi bakterileri öldürmeden veya gelişimlerini durdurmadan, sadece onların virülans özelliklerini inhibe etmeyi amaçlayan bir yöntemdir. Aynı zamanda yararlı mikrobiyotayı korumak ve antibiyotik kullanımı azaltmak bu terapinin temel amaçları arasındadır. Bu avantajlarından dolayı virülans mekanizmaların inhibe edilerek hastalıklar ile mücadele edilmesi; yeni ve güvenli bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu bilgilere dayanarak bu tezde, fırsatçı patojen *Pseudomonas aeruginosa*'nın patojen özelliğini oluşturan en önemli virülans faktörlerden piyoverdin üretimini engellediği tespit edilen piperidinkarboksiamid türevi bir molekülün, moleküler hedefi belirlenmiştir. Piperidinkarboksiamid türevi inhibitör maddenin moleküler hedefi çoğu laboratuvar tarafından kolayca benimsenen, inhibitör madde üzerinde herhangi bir modifikasyona ihtiyaç duymadan doğal hali ile çalışılmasına imkan veren, Pai ve ark. tarafından açıklanmış DARTS yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem temel olarak inhibitör madde ile etkileşime giren proteinlerin proteazlardan korunacağına prensibine dayanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, kontrol grubu ile karşılaştırılan inhibitör madde uygulanmış protein örneklerinde 0,25 mg/ml Termolizin enzimi uygulamasının 2. dakikasında proteazdan korunmuş bir bant gözlemlenmiştir. QTOF-MS sisteminde analiz edilen korunmuş bant içinde kontrolden farklı 7 adet protein varlığı tespit edilmiştir. Analiz sonucunda virülansa etkili olduğu düşünülen proteinlerin yüksek değer verdiği görülmüştür. Piyoverdin üretiminde görevli Aspartat aminotransferaz proteininin ise en yüksek değere sahip olduğu bulunmuş ve böylece piperidinkarboksiamid türevi inhibitör molekülümüzün moleküler hedefi Aspartat aminotransferaz proteini olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*, Piyoverdin (PVD), Virülans, Antivirülans terapi, Antibiyotik Direnci, İlaç hedefi

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE MOLECULAR TARGET OF AN INHIBITOR WHICH INHIBITS THE PRODUCTION OF PYOVERDIN IN

Pseudomonas aeruginosa

Esra UYANIK

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Biology and Genetics Programme
Master, June/2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tuğrul DORUK

The fact that bacteria have gained resistance to many antibiotics is a significant problem in the fight against the infections they cause. For this reason, instead of the traditional antibiotics the discovery of new generation drugs with different mechanisms of action is of great importance.

Virulence is defined as the capacity of pathogenic microorganisms to harm the host. Toxin production, quorum sensing and biofilm targeting the host can be counted among the virulence mechanisms of microorganisms. Drugs produced against these mechanisms are called antivirulence drugs. Compared with traditional antibiotics, antivirulence drugs do not directly cause resistance and selective pressure on bacteria. Antivirulence therapy is a method that just aims to inhibit the virulence properties of bacteria without killing them or effecting their growth. At the same time, protecting the beneficial microbiota and reducing the use of antibiotics are among the main goals of this therapy. Because of these advantages, fighting diseases by inhibiting virulence mechanisms emerges as a new and safe way.

Based on this information, in this thesis, the molecular target on the virulence mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* of a piperidinecarboxamide-derived molecule, which was found to inhibit the production of pyoverdin, one of the most important virulence factors forming the pathogenic feature of the opportunistic pathogen *P. aeruginosa*, has been determined. The molecular target of the piperidinecarboxamide derivative inhibitor material is determined by the DARTS method explained by Pai et al., which is easily adopted by most laboratories and allows working in its natural state without the need for any modification on the inhibitory substance. This method is based on the principle that proteins interacting with the inhibitory substance would be protected from proteases. As a result of the studies conducted, a band protected from protease was observed in the second minute of 0.25 mg/ml Thermolysin enzyme test in inhibitory substance treated protein samples compared with the control group. The presence of 7 different proteins from the control were detected on the conserved band analyzed in the QTOF-MS system. As a result of the analysis, it was seen that the proteins thought to be effective on virulence gave high scores. Aspartate aminotransferase protein, which is involved in the production of pyoverdin, was found to have the highest score, and thus, it was concluded that the molecular target of our piperidinecarboxamide derivative inhibitor molecule could be Aspartate aminotransferase protein.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Pyoverdin (PVD), Virulence, Antivirulence therapy, Antibiotic Resistance, Drug target

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, her konuda yardımcı olan ve kıymetli fikirleriyle yol gösteren saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Doruk'a, yüksek lisans eğitiminin ders aşamasında benimle değerli bilgilerini paylaşan sayın anabilim dalı hocalarıma ve eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli laboratuvar arkadaşlarım ve KİTAM personellerine,

Bu süre zarfında beni fedakârca destekleyip yüreklendiren annem Hatice SELİM'e, babam Yaşar SELİM'e, kardeşlerim Handenur ve Yusuf SELİM'e ve sevgili eşim Ferit UYANIK'a,

Tezimi destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esra UYANIK

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORUBEYANI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Mikrobiyolojik Özellikleri	2
1.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Virülans Özellikleri	2
1.2.1. Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri.....	3
1.2.2. Bakteri Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri	4
1.3. Quorum Sensing (QS) ve <i>P. aeruginosa</i> Virülansındaki Önemi.....	7
1.3.1. <i>las</i> QS Sistemi:	9
1.3.2. <i>rhl</i> QS Sistemi:	9
1.3.3. Kinolon Sinyal Sistemi (PQS) :	10
1.3.4. <i>P. aeruginosa</i> QS Sisteminin Özellikleri	10
1.4. <i>P. aeruginosa</i> 'da Antibiyotik Direnci	11
1.5. Antivirülans Terapi.....	12
1.5.1. <i>P. aeruginosa</i> için Antivirülans Stratejiler	15
1.6. <i>P. aeruginosa</i> ve Piyoverdin Yolağı.....	16
1.7. Piyoverdin Üretimini Engelleyen Bir İnhibitör Molekül	18
1.8. Yüksek Verimli Tarama Yöntemi ve Moleküler Docking.....	19
1.8.1. İlaç Keşfinde HTS	20
1.8.2. Moleküler Docking (Moleküler Yanaştırma)	21
2.MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1. Materyaller	23
2.1.1. Bakteri suşları.....	23
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	23
2.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar	24
2.2. Yöntemler	29
2.2.1. Piperidinkarboksiamid Türevi İnhibitörün Moleküler Hedefinin Belirlenmesi ...	29
2.2.2. LC-MS/MS ile Proteomik Analizin Gerçekleştirilmesi	37
3.BULGULAR.....	39
3.1. Hücre Protein Lizatı BSA Sonuçları.....	39
3.2. İnhibitör Molekülün Etkisinin Kanıtlanması.....	39
3.3. İnhibitör Molekülün Moleküler Hedefinin Belirlenmesi	40
3.4. LC-MS/MS ile Proteomik Analiz Sonuçları	41
4.TARTIŞMA.....	44
5.SONUÇ.....	47
KAYNAKÇA.....	48
ÖZ GEÇMİŞ.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

1-HP	: 1-hidroksifenazin
Als	: Otoindükleyiciler
ASADH	: Aspartat β -semialdehit Dehidrojenaz
BSA	: Bovin Serum Albumin
CAA	: Casaminoasit
CbpD	: Kitin Bağlayıcı Protein
CID	: Collision Induced Dissociation
DAP	: Diaminopimelik Asit
DARTS	: Drug Affinity Responsive Target Stability
EF	: Uzama Faktörü
Exo A	: Ekzotoksin A
Exo S	: Ekzotoksin S
Exo T	: Ekzotoksin T
Exo U	: Ekzotoksin U
Exo Y	: Ekzotoksin Y
GPCR	: G Protein Bağlı Reseptörler
HTS	: Yüksek Verimli Tarama
KF	: Kistik Fibrozis
LB	: Luria Bertani
LPS	: Lipopolisakkarit
MS	: Kütle Spektrometri
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PAOI	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşu
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PCA	: Fenazin 1-karboksilat
PGA	: Glutamin Asparaginaz
PQS	: Kinolon Sinyal Sistemi
PVD	: Piyoverdin
QS	: Quorum Sensing
QSAR	: Kantitatif Yapı Aktivite İlişkisi
QTOF	: Dört Kutuplu Uçuş Süreli Kütle Spektrometresi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SGOT	: Serum Levels of Aspartat Aminotransferaz
T3SS	: Tip 3 Salgı Sistemi

TFA : Trifloro Asetik Asit
TISS : Tip 2 Salgı Sistemi
TISS : Tip 1 Salgı Sistemi
UHTS : Ultra Yüksek Verimli Tarama



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virülans faktörleri	3
Şekil 1.2. Bakterilerde biyofilm oluşumu	8
Şekil 1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'daki birbirine bağlı <i>las</i> , <i>rhl</i> ve <i>pqs</i> quorum sensing sistemlerinin şematik diyagramı	10
Şekil 1.4. Antivirülans ilaçlar ile hedeflenebilecek enfeksiyon süreçlerinin şematik gösterimi	13
Şekil 1.5. Gram-negatif bakteriyel patojenler için tasarlanmış mevcut antivirülans stratejilerin hedeflerine şematik genel bakış	14
Şekil 1.6. Piyoverdin üretiminde görevli genler.....	18
Şekil 2.1. Örnek jel görüntüsü	35
Şekil 2.2. Gümüş boyama görüntüsü	36
Şekil 2.3. ESI-QTOF-MS sistemi.....	38
Şekil 3.1. BCA Standart Eğrisi.....	39
Şekil 3.2. 25 µM inhibitör molekül varlığında yapılan büyüme eğrisi grafiği.....	39
Şekil 3.3. Piyoverdin üretiminin inhibitör madde dozuna bağlı değişim grafiği	40
Şekil 3.4. Piyoverdin indüklü besiyerinde inhibitör madde eklenmemiş ve inhibitör madde eklenmiş <i>PAOI</i> kültürü floresan görüntüsü	40
Şekil 3.5. Termolizin enzimi muamelesinin 2. dakikasında kontrol grubundan ayrı olarak gözlemlenen korunmuş protein bandı	41
Şekil 3.6. Örnek olarak seçilmiş MASCOT protein arama motoru sonuçları.....	42
Şekil 3.7. İnhibitör madde içeren örnekteki korunmuş banttardan elde edilen proteinlerin LC-MS/MS sonucu.....	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Patojen mikroorganizmalar için seçilmiş antivirölans hedef ve inhibitör örnekleri.....	15
Tablo 2.1. BSA standart tablosu.	31
Tablo 2.2. Farklı SDS PAGE jellerde Termolizin enzimi ile yapılan proteaz uygulamaları..	32
Tablo 2.3. Farklı SDS PAGE jellerde Pronaz enzimi ile yapılan proteaz uygulamaları	33
Tablo 2.4. Farklı SDS PAGE jellerde Proteinaz K enzimi ile yapılan proteaz uygulamaları.	33
Tablo 3.1 LCMS sonucu korunmuş bantta elde edilen farklı proteinler ve LCMS skorları...	43



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa; *Pseudomonadaceae* ailesinde yer alan, doğada yaygın olarak bulunan, aerob, hareketli ve sporsuz, Gram negatif fırsatçı bir insan patojenidir. Genel olarak nemli ortamlarda kolaylıkla çoğalabilen *P. aeruginosa* bulunduğu ortama kolaylıkla uyum sağlayabilme yeteneğine sahiptir. Tipik koloni morfolojisi, içerdiği pigmentleri ve üzüksü kokusuyla tanınması oldukça kolaydır. Bunun yanı sıra *P. aeruginosa* beslenme ihtiyaçlarının basit olması, üremek ve çoğalmak için oldukça uzun bir ısı aralığına sahip olması (20-42°C), tuzlu ortamlarda yaşayabilmesi, antiseptiklere ve birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş olması gibi çeşitli özelliklere sahiptir (Sırıken ve Öz, 2017) . Bu özellikleri nedeniyle de bütün dünyada ilaç, gıda ve sağlık endüstrilerinde büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

P. aeruginosa suşları mavi ve floresan yeşil olmak üzere 2 çeşit pigmente sahiptirler; mavi rengi veren Piyosiyenin ve floresan sarı-yeşil rengi veren Piyoverdin. Bu pigmentler pH'nın alkali olduğu durumlarda ortaya çıktıkları için bu suşlara 'aeruginosa' ismi verilmiştir (King and Philips, 1978). Pigment üreten suşlarda, üretilen bu pigmentlerin bakteri virülansı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Finlayson and Brown, 2011).

P. aeruginosa birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiştir. Bu nedenle hastane kaynaklı enfeksiyonların birçoğundan sorumlu olan *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonları nedenleri arasında 5. sırada gösterilmektedir (Pier and Ramphal, 2005). Aynı zamanda kistik fibroz hastalarında da önemli bir tehdit olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde çoğu kistik fibroz hastası, tipik olarak 10 ila 20 yıllık bir süre boyunca kalıcı *P. aeruginosa* kolonizasyonundan kaynaklı enfeksiyonlar ile mücadele etmektedir (Govan and Deretic, 1996).

Bakterilerin antibiyotiklere karşı sürekli direnç kazanmaları, enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden antibiyotikler yerine etki mekanizmaları farklı yeni nesil ilaçların kullanılması enfeksiyonlar ile mücadelede önemli bir konu olmaktadır. Bakterilerin virülans faktörlerine etki edecek bir yaklaşım olan antivirülans terapi ilaç keşiflerinde yeni ve güvenli bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır (Cegelski et al., 2008). Antivirülans terapi için üretilmiş antivirülans ilaçlar; mikroorganizmaları zararsız hale getirirken aynı zamanda

hastalık oluşumunu da önlemektedir. Geleneksel antibiyotiklerin yanında bu tedavinin, mikroorganizmalarda bir evrimsel baskı oluşturmaması ve böylece direnç gelişimi meydana getirmemesi en büyük avantajıdır. Bu bilgilere dayanarak bu tezde, Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Doruk'un doktora sonrası çalışmalarında elde ettiği; fırsatçı patojen *P. aeruginosa*'nın patojen özelliğini oluşturan en önemli virülans faktörlerden olan piyoverdin üretimini engellediği, yüksek verimli tarama yöntemi ile tespit edilen piperidinkarboksiamid türevi bir inhibitörün moleküler hedefinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. *P. aeruginosa*'nın Mikrobiyolojik Özellikleri

P. aeruginosa; 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda basil veya kısa çubuk morfolojisine sahip, kolay boyanan Gram negatif bakterilerdir. Spor oluşumu ve kapsül oluşumu görülmez. *P. aeruginosa* tek uçta bulunan polar kamçıya sahiptir ve hareketi kamçı vasıtasıyla sağlar. Diğer *Pseudomonas* türlerinde ise birden fazla kamçı bulunabileceği bilinmektedir (Peabody et al., 2003).

Zorunlu aerobik solunum yapar, ancak kısıtlı oksijen varlığında ortamda yeterli miktarda NO₃ var ise solunuma devam edebilmektedir. *Pseudomonas* cinsinin mezofil, psikrotrof ve psikrofil türleri bulunmaktadır. Uygun besiyerlerinde optimum 37°C'lerde büyümesinin yanı sıra, 20-42°C arasındaki ısılarda da üreme gösterebilmektedir. Bu ısı aralığında üreyebilme yeteneği *P. fluorescens*'den ayırt edici bir özellik kazanmasını sağlamaktadır.

Alkali ortamlarda gelişir. Sıvı besiyerleri yüzeyinde yoğun üreme gösterir ve homojen bir zar tabakası oluşturur. Zar tabakasının hemen altında mavi-yeşil pigment oluşumu ayırt edilebilmektedir. Katı besiyerlerinde *P. aeruginosa* 3 farklı tip koloni meydana getirir. 1. tip koloni genellikle klinik örneklerden izole edilen, mavi-yeşil floresan özelliğe sahip, mat yüzeyli ve tüm besiyerini kaplamış olarak bulunur. Genellikle doğal kaynaklardan izole edilmiş 2. tip koloniler ise düzensiz yapılı ve nispeten daha küçük kolonilerdir. Tip 3 koloniler ise hücre dışı salgılar salgılamaları sebebiyle mukoz görünüme sahip R (rough) kolonilerdir. *P. aeruginosa* katı kültürlerinde tipik karakteristik ekşimsi bir üzüm kokusu vardır (triptofan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı) (Şen ve Halkman, 2006).

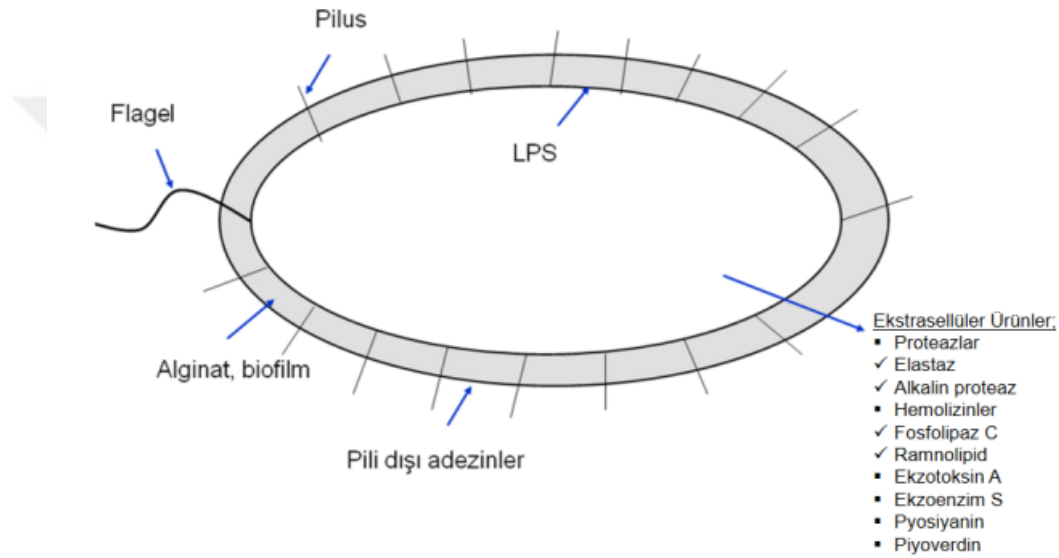
1.2. *P. aeruginosa*'nın Virülans Özellikleri

P. aeruginosa ürettiği logaritmik fazda Şekil 1.1'de görülen virülans

faktörlerinin salgılanmasını gerçekleştirir. Virülans faktörlerin salgılanması ve düzenlenmesi oldukça karmaşık bir sistemdir. Bu faktörlerin salgılanması ile enfeksiyon oluşur ve enfeksiyonların patogeneğinde hem konağa hem de bakteriye ait virülans faktörler rol oynamaktadır. Genel olarak *P. aeruginosa* virülans faktörleri;

i) hücre ile ilişkili virülans faktörleri

ii) hücre dışına salınan virülans faktörleri, olmak üzere iki grup altında toplanır (Woods, 2004).



Şekil 1.1. *Pseudomonas aeruginosa* virülans faktörleri (Delden and Iglewski, 1998)

1.2.1. Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri

P. aeruginosa hücre yüzeyi ile ilişkili çeşitli virülans faktörlere sahiptir. Hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörler kirpik, kamçı (flagella), pilus (fimbria), lipopolisakkarit (LPS) ve aljinattır. Mikroorganizmanın kolonizasyonu için büyük bir öneme sahiptirler.

Kirpik (Flagella): *P. aeruginosa* protein yapılı, tek sayıda, polar kılıfsız kamçıya sahiptir. Sitoplazmadan köken almaktadır ve mikroorganizmanın yüzme (swimming) ve kayma (swarming) hareketinden sorumludur. Kamçı ile mikroorganizma; hücre zarı bileşenleri aracılığıyla konak epitelyum hücrelerine bağlanarak adhezyonu gerçekleştirir ve mikroorganizmanın kolonizasyonunu sağlar (Singh et al., 2002).

Pili, Pilus (Fimbria): *P. aeruginosa*'nın ince, kısa, filamentöz, ekstraselüler yüzey çıkıntılarıdır. Pili yer değişim hareketinden sorumlu olmamakla birlikte *P. aeruginosa*'da titreme (twitching) hareketinden sorumludur. Kolonizasyon sırasında konak hücrenin yüzey reseptörlerine bağlanarak patogeneizde kritik rol oynar (Kipnis et al., 2006).

Lipopolisakkarit (LPS): *P. aeruginosa* hücre duvarının dış yüzeyinde bulunur. İkili fosfolipidkatman içerisinde yer alan lipit A ve O-polisakkarit yapılı hidrofilik kuyruktan meydana gelir. Lipit A bileşeni pro-inflamatuvar yollar aracılığıyla kistik fibrozisli (KF) hastalarda ciddi akciğer sorunlarına neden olurken O-polisakkarit bakteriyel keratitten sorumludur. Aynı zamanda *P. aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında kullanılır (King et al., 2009).

Aljinat: *P. aeruginosa* tarafından üretilen mukoid yapıdır. Mikroorganizmanın solunum epitellerine tutunmasını gerçekleştirerek orada kolonize olmasını sağlar. Ortamda N azlığı veya ozmolarite yüksekliği aljinat üretimini artırır (Salyers and Whitt, 1994). Aljinat organizmayı fagositozdan ve antibiyotik etkisinden koruma özelliği gösterir.

1.2.2. Bakteri Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri

P. aeruginosa'nın sahip olduğu birçok salgı sistemi bulunmaktadır. Bu sistemler ile hücre dışına virülans faktörler salgılayarak bakterinin çevreye adaptasyonunu, konak hücreye kolonize olmuş bakterinin doku hasarı oluşturmasını ve yayılmasını sağlar. Bu nedenle salgılanan virülans faktörler patojenitede büyük role sahiptir (Kronish and Pittet, 2011).

Elastaz: Elastin akciğerlerin daralıp genişlemesinden sorumlu bir proteindir ve akciğerlerde %30 oranında bu protein bulunur. Elastaz ise elastin parçalayıcı bir proteazdır. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA ve LasB elastazlar sorumludur. LasA tek başına elastini parçalayamaz ancak yıpratır ayrıca LasB ile birlikte elastazın parçalayıcı etkisini artırır. LasB'nin proteaz özelliği diğer salgılanan proteazlara oranla 10 kat daha fazladır (Salyers and Whitt, 1994). Elastaz aynı zamanda kan damarlarında bulunan elastik tabakaya da zarar verici etkiye sahiptir.

Alkali Proteaz: *P. aeruginosa* çok sayıda hücre dışı proteaza sahiptir ve en önemli örnekleri elastaz ve alkali proteazlardır. Yüksek proteolitik etkiye sahip alkali proteaz; apr geni tarafından kodlanır ve en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik

gösterir. *P. aeruginosa*'nın tip I salgılama sistemi (TISS) tarafından salgılanır ve fibrinoliz etki gösterir. Korneal enfeksiyonların patogeneğinde ve akut akciğer hasarında alkali proteazların etkisi büyüktür (Alcorn et al., 2004).

Piyosiyenin: *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metabolitidir ve başka bir bakteride bulunmaz. Diğer bakterilere karşı baskılayıcı özellik gösteren piyosiyenin Quorum Sensing sistemi tarafından düzenlenir. Piyosiyenin pigmenti aynı zamanda solunum yolu epitellerinin fonksiyonlarını bozar ve hidrojen peroksit ve süperoksit gibi toksik serbest radikal salınımına neden olur. *P. aeruginosa* enfeksiyonu ile piyosiyenin salınımı sonucu hücre solunumu inhibe olur, siliyer fonksiyonlar bozulur, epidermis çoğalması durur ve kalsiyum dengesi bozulur (Lau et al., 2004).

Piyoverdin: Siderefor olan piyoverdin *P. aeruginosa* metabolizmasında kullanılması için çevreden demir bağlayan küçük moleküllerdir. *P. aeruginosa*'nın diğer virülans faktörlerinin (Ekzotoksin A, Endoproteaz gibi) salgılanmasının ve kendi üretiminin düzenlenmesinde de rol alan önemli bir virülans faktördür (Lamont et al., 2002).

Proteaz IV: *P. aeruginosa*'nın salgıladığı proteazlardan proteaz IV, keratinin patogeneğinde rol alır, enzim en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Aynı zamanda yapılan çalışmalar sürfaktan proteinlerin yıkımı ile akciğer enfeksiyonlarında da etkili olduğunu göstermiştir (Malloy et al., 2005).

Fosfolipaz C: *P. aeruginosa* tarafından tip II salgı sistemi aracılığıyla salgılanan, ekstraselüler boşlukta enzim görevini yerine getiren bir fosfolipazdır. Protein yapılı ve ısı duyarlı bir hemolizindir, hemolitik aktiviteleriyle ayrılan iki ayrı tipi bulunur. Hemolitik yapılı fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve sfingomyelini hidrolize ederken, hemolitik olmayan fosfolipaz C ise fosfatidilkolini ve fosfatidilserini hidrolize eder. Genel olarak ökaryotik hücrelerin hücre zarındaki fosfolipidleri hedef alır. Bu nedenle akut akciğer hasarında önemli bir rolü vardır (Wieneer-Kronish et al., 1993).

Ramnofosfolipid: Glikolipid yapısı, ramnoz içermektedir ve biyosüpfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğerlerdeki sürfaktan fosfolipidlerde hasar verir ve fosfolipaz C'nin etkisini artırır. Ayrıca mukosilyer taşınımı etkileyerek siliya fonksiyonlarını inhibe eder. Fosfolipaz C benzeri hemolitik etki gösterir, fosfolipaz C ile birlikte lipit ve lesitinleri parçalar (Karatuna ve Yağcı, 2008).

Ekzotoksin A (ExoA): *P. aeruginosa* virülans faktörleri arasında en toksik olanıdır ve virülansta önemli bir rol oynar. Çok az miktarda dozları bile ölümcül etkiler yaratabilmektedir. Tip II salgı sistemi aracılığıyla salgılanır ve ekstraselüler boşlukta etki gösterir. ExoA uzama faktörü-2 (EF-2)'yi inhibe ederek protein sentezini durdurur böylece hücre ölümleri meydana getirir. ExoA özellikle yanık yaralarında ve kronikleşen akciğer enfeksiyonlarında doku hasarı meydana getirir. Ayrıca, T ve B lenfositler için immünsupresyona da neden olabilmektedir (Lederberg, 2000).

Sitotoksin (Lökosidin): Lökositlere karşı sitopatik etkiye sebep olduğu için lökosidin olarak adlandırılan toksik proteinlerdir. Nötrofilleri inhibe eder ve lenfositlerin fonksiyonlarını bozar. *P. aeruginosa*'da bulunan bu toksik protein "yetişkin solunum stresi" sendromu adı verilen akciğer rahatsızlıklarına neden olur (Vasil and Ochsner, 1999; Kim et al., 2005).

Slime faktör: *P. aeruginosa* bazı koşullarda 'slime tabakası' adı verilen polisakarit bir kapsül tabakası oluşturur. Konağın bağışıklık sistemini etkileyen bu slime faktörü bakteriyi konak savunmasına karşı korumaktadır (Lagournintzis et al., 2003).

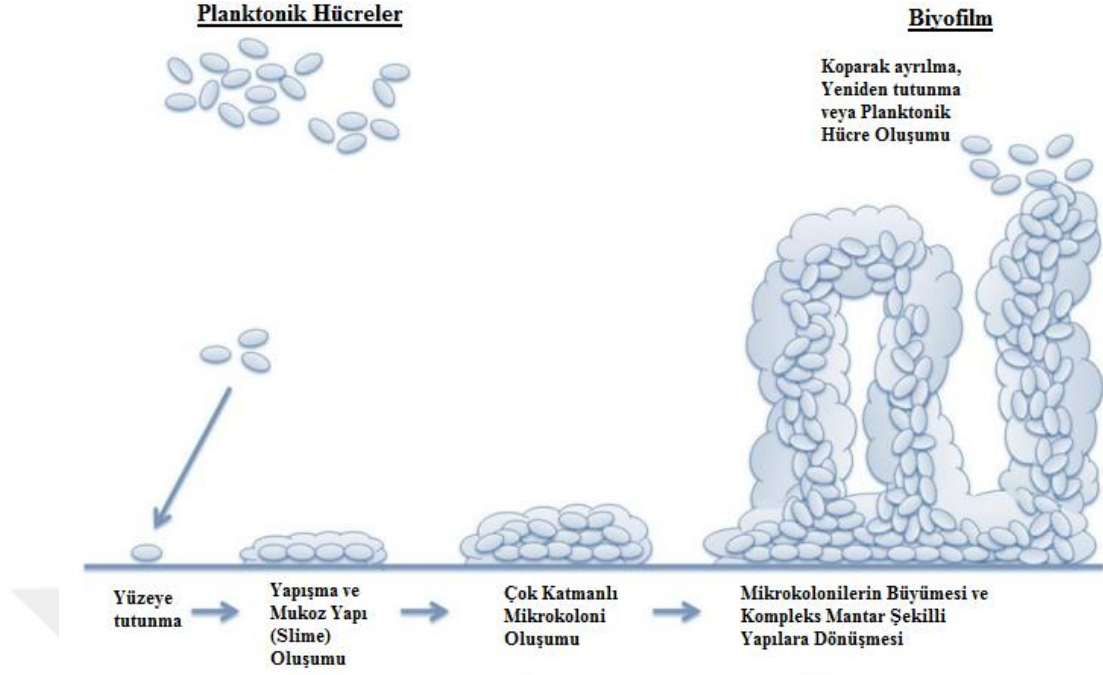
Tip III Salgı Sistemi (T3SS): Bu sistem ile konak hücre yüzeyinde porlar açılarak pilus benzeri yapılar oluşturulur. Bu piluslar ile iki hücre arasında köprü meydana gelir ve bu köprü yardımıyla *P. aeruginosa*'nın toksin proteinleri ökaryot hücrenin sitoplazmasına bırakılır. Bu toksinler, aktin yapılı hücre iskeletini ve o hücrelerin protein sentezini inhibe eder ve aynı zamanda hücre alışıverişini durdurur. T3SS, *P. aeruginosa* dışında birçok bakteride daha bulunur (Kipnis ve ark., 2006). T3SS ile salınımı gerçekleştirilen toksinler; ekzoenzim S (exoS), ekzoenzim T (exoT), ekzoenzim Y (exoY) ve ekzoenzim U (exoU)'dur. ExoS ve exoA eş enfeksiyonu görülen hastalarda, ölüm oranı çok yüksek bulunmuştur. ExoS hücresel apoptoz için gerekli bir unsurdur ve akciğer enfeksiyonlarında doku hasarına yol açar, bakterinin yayılmasını kolaylaştırır. ExoT *P. aeruginosa*'yı makrofajlara karşı korur. ExoT'nin yara iyileşmesini inhibe edici özelliği bilinmektedir (Shaver ve Hauser, 2004). ExoU fosfolipaz benzeri güçlü bir sitotoksindir ve çeşitli hedef hücreleri parçalayıcı etki gösterir (Mitov et al., 2010).

1.3. Quorum Sensing (QS) ve *P. aeruginosa* Virülansındaki Önemi

Biyofilm; mikroorganizmaların birbirleriyle, bulunduğu yüzey veya ara yüzeyler ile tutunmalarını ve oraya yerleşmelerini sağlayan, hücreleri dış faktörlerden koruyan dinamik bir yapıdır. Biyofilm mikroorganizmaların uygun olmayan ortamlarda üremelerini ve hayatta kalmalarını sağlar. Bakteri, biyofilm oluşturdukça, çevresindeki değişiklikler gen ekspresyonlarına da yansır ve biyofilmin oluşumu hızlanır. Biyofilm oluşturan genetik materyal plazmitler aracılığı ile çevre hücrelere aktarılabilir. Biyofilm beş aşamada oluşur (Post et al., 2004) (Şekil 1.2). Bu aşamalar;

1. Yüzeyin uygun hale getirilmesi (surface conditioning),
2. Geri dönüşümlü tutunma (reversible attachment),
3. Geri dönüşümsüz tutunma (irreversible attachment),
4. Kolonizasyon,
5. Kopma

Biyofilm oluşumu ile mikroorganizmalar bağışıklık sistem elemanlarından, çeşitli antibiyotiklerden, anti-mikrobiyal ürünlerden, fiziksel, kimyasal ve biyolojik stresten korunurlar (Nouraldin et al., 2016). Mikroorganizmalar biyofilm içerisinde çoğalarak aralarında kurdukları iletişim ile tek başlarına yapmaları mümkün olmayan davranışlar gösterirler ve bu aşamada da QS mekanizmaları devreye girer.



Şekil 1.2. Bakterilerde biyofilm oluşumu (Meliani ve Bensoltane, 2015'den uyarlanmıştır)

Bakteriler biyofilm oluşturabilmek için çevresinde yer alan diğer hücelere biyofilm oluşturması yönünde sinyal molekülleri gönderirler. QS sistemi, bakteriler tarafından gönderilen ve diğer mikroorganizmalar tarafından algılanan bu sinyal moleküllerinden oluşmuş olup aktive olması ortamdaki bakteri sayısı ile ilişkilidir. Başlangıçta az sayıda mikroorganizma varlığında QS sistemi aktif değildir. Bu yüzden virülans faktör salınımı gerçekleşmez. Bakteri popülasyonu artışı ile belirli bir yoğunluğa gelindiğinde bakteri metabolizmalarında çeşitli değişiklikler meydana gelir ve virülans faktörlerin sentezi için kritik gen ekspresyonları gerçekleşir (Rumbaugh et al., 1999). Bu mekanizma birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteride tanımlanmıştır.

P. aeruginosa'da üç ana QS sistemi tanımlanmıştır;

- 1) *LasI - LasR*
- 2) *RhlI-RhlR*
- 3) PQS-MvfR (kinolon)

Bu sistemler biyofilm oluşumunu ve virülans faktörlerinin salınımını kontrol eder. Ayrıca QS sistemleri tek başına çalışmayıp birlikte etki gösterirler ve bu moleküler mediyatörler oto indükleyici (AIs) olarak bilinirler, çünkü bakterinin

çevreye karşı gösterdiği yanıtı kendileri düzenler. *Las* QS sisteminin AI ajanı, bir açıl-homoserin lakton olan N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lakton (C12-HSL)'dur. *Rhl* sisteminin AI ajanı N-butiril-L-homoserin laktondur (C4-HSL). PQS sistemi ise sinyalizasyon için 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon kullanır (Pesci et al., 1997; Soukarieh et al., 2018).

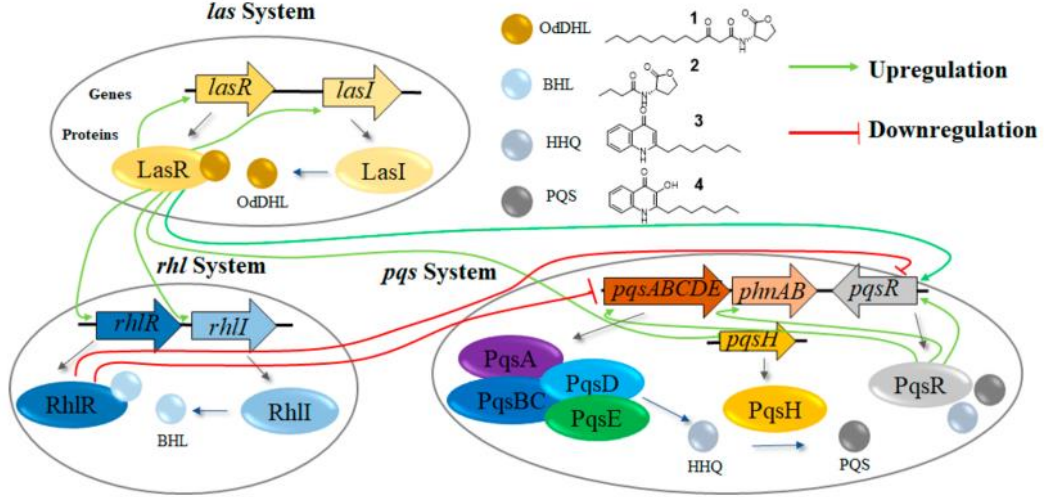
1.3.1. *las* QS Sistemi:

P. aeruginosa'da varlığı ilk tespit edilen QS sistemidir ve Gram negatif bakteriler arasında yaygındır. Çevreyi algılamaya yardımcı olan bu sistemin bileşenleri; oto-uyaran sentez geni olan *lasI*, sentez geninin ürünü olan *lasR* genidir. Popülasyon oranı arttıkça *lasI* geni kimyasal sinyallerin ortama salınımını sağlarken sinyallerin bakteriler tarafından algılanmasını *lasR* transkripsiyonel düzenleyici protein gerçekleştirir. *Las* sistemi *lasB*'nin ifadesini düzenler ve diğer virülans faktörlerden *lasA*, elastaz ve *exoA*'nın sentezi için gereklidir. *Las* sisteminin aynı zamanda konak yanıtını baskıladığı da bilinmektedir (Telford et al., 1998).

1.3.2. *rhl* QS Sistemi:

las QS sistemi tarafından kontrol edilen bu sistem ramnolipid sentezi için ramnoziltransferazı kodlayarak *rhlAB* operonunun ifadesini düzenler. Sinyal molekülleri belirli bir yoğunluğa ulaştığında *rhlI* geni *rhlR* geninin transkripsiyonunu uyarır ve hedef genleri aktive eder. Şekil 3'te görülen *las* ve *rhl* sistemleri kendilerine özgü sistemlerdir ve birbirleriyle etkileşim içindedirler (Şekil 1.3).

Rhl sistemi; ürettiği açıl homoserin lakton molekülleri ile ramnolipid sentezinin yanında piyosiyenin, "swimming" (yüzme), "swarming" (kayma) ve "twitching" (titreme) hareketleri gibi virülans faktörlerin de uyarılmasını gerçekleştirir (Parsek and Greenberg, 2005).



Şekil 1.3. *Pseudomonas aeruginosa*'daki birbirine bağlı *las*, *rhl* ve *pqs* quorum sensing sistemlerinin şematik diyagramı. Yeşil oklar ve kırmızı bloklu çizgiler sırasıyla yukarı veya aşağı regülasyonu gösterir. Oval şekiller çeşitli proteinleri, renk kodlu daire şekilleri QS sinyal moleküllerini ve büyük renkli oklar genleri temsil eder. İnce gri oklar, protein ifadesini temsil eder ve ince mavi oklar, QS sinyal moleküllerinin biyosentezini gösterir (Soukarieh et al., 2018)

1.3.3. Kinolon Sinyal Sistemi (PQS) :

P. aeruginosa, *las* ve *rhl* sistemlerinin yanında *rhl* sisteminin transkripsiyonel aktive edici olan üçüncü bir *pqs* (kinolon) sistemine sahiptir. Bu sinyal sistemi *lasR* geninin regülasyonu ile sentezlenir ve *rhl* sistemini aktive eder. Yani, *las* sisteminin ürettiği sinyal dizileri oluştuktan sonra, *pqs* sistemi devreye girmekte ve *rhl* sistemi aktive olmaktadır böylece *pqs*, *las* ve *rhl* için ara bağlantı oluşturan bir sistemdir denir (Gera and Srivastava, 2006; Rasmussen and Givskov, 2006).

1.3.4. *P. aeruginosa* QS Sisteminin Özellikleri

a) Quorum sensing sistemi yarışmacı nitelik taşımamaktadır.

b) Bazı bakteriyel genler çift gen tarafından kontrol edilirken bazıları ise tek gen tarafından kontrol edilmektedir. Buna göre *lasR* proteini/C12-HSL, *las* geninin altındadır. Bunlar *rhlR* geninin ekspresyonunu düzenler. *rhlR* proteini/C4-HSL ise *rhlI* gen transkripsiyonunu düzenler.

c) C terminal, ATG başlangıç kodunu 40 bp akışta *las*-Box'a bağlanan heliks sarmalını ifade eder. *las*-Box 20 baz çiftlik bölgede bulunur ve C terminaldeki aminoasitler polimerizasyona katılırlar.

d) *Rhl* sisteminin R proteini C4-HSL varlığında veya yokluğunda dimer meydana getirir ve DNA ile bağ kurar (Pesci et al., 1999).

1.4. *P. aeruginosa*'da Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci; bakterinin anti-mikrobiyaller tarafından üreme ve gelişmesini engelleyici veya direkt olarak öldürücü etkilerinden korunabilme kapasitesidir. Bakterilerde dirençlilik; doğal ve kazanılmış olmak üzere iki türdür. Doğal direnç, bakterinin genomunda yer alan özellikleri nedeniyle bazı antibiyotiklere karşı dirençli olmasıdır. Kazanılmış direnç ise bir bakteriye biçim değiştirme, transdüksiyon ve konjugasyon gibi yollarla veya plazmit, transpozon, gen kasetleri ve integronlar gibi genetik elementlerin aktarımı aracılığıyla gen transferi sonucu, başka bir deyişle DNA'larına gen eklenmesi sonucu meydana gelen değişimler ile direnç kazanmasıdır (Kerr and Snelling, 2009).

P. aeruginosa, son yıllarda artan insidansı, yüksek antibiyotik direnci, yeni direnç mekanizmaları geliştirme yeteneği ve antibiyotik kullanımından dolayı meydana gelen çoklu antibiyotik direnci nedeniyle tedavisi güç enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Tielen et al., 2011).

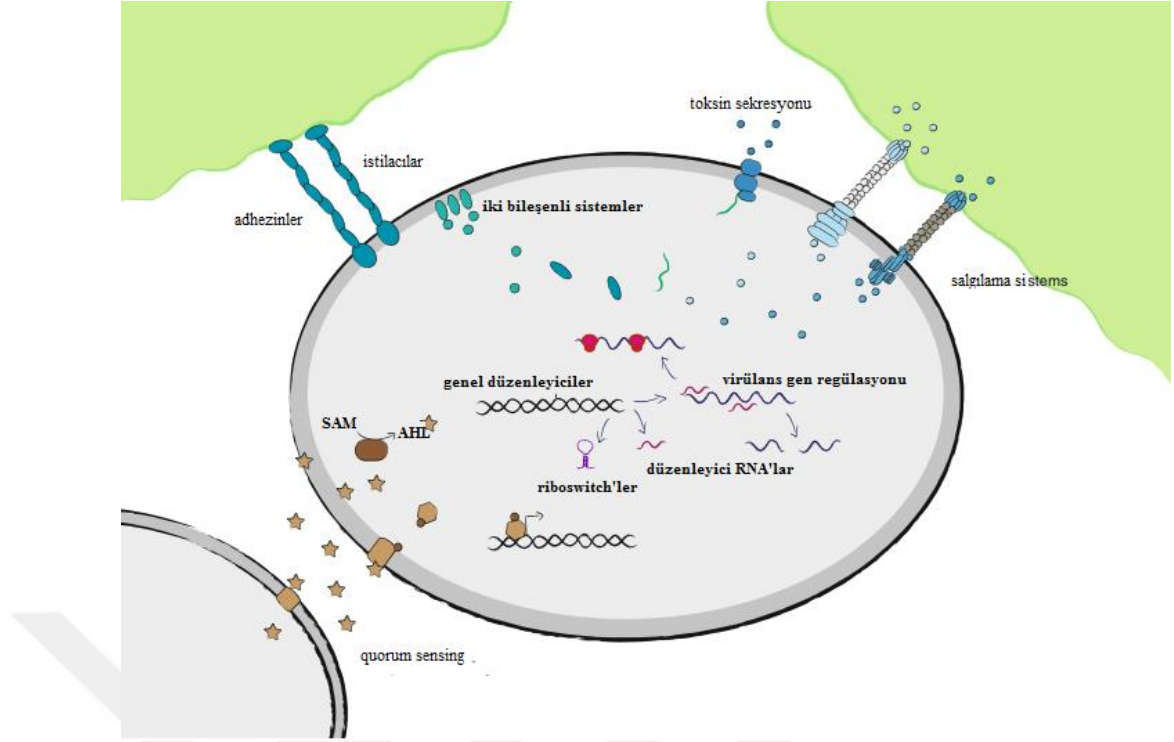
Direnç artışındaki en önemli etken, antibiyotik tüketiminin artmasıdır. Akılcı olmayan antibiyotik kullanımı; viral enfeksiyonlarda kullanımı, yanlış antibiyotik kullanımı, yanlış doz kullanımı veya gereksiz kombinasyonlar halinde kullanımı, antibiyotik tüketimini bir hayli artırmıştır. Günümüzde hemen her bakteri kendilerine karşı kullanılan antibiyotiklere karşı belirli oranlarda direnç kazanmış durumdadır. *P. aeruginosa*'da bu bakterilerden biridir. Sadece belirli antibiyotiklerin bakteriyeye etkisi vardır ancak bu güçlü antibiyotiklere karşı bile artan oranlarda direnç geliştirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, *P. aeruginosa*'yı, sürekli artan sayıda antibiyotik dirençliliği nedeniyle, yalnızca karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* ile yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulan iki numaralı öncelikli patojen olarak ilan etmiştir (Tacconelli et al., 2017).

20. yüzyıl'da bilimde ve tıpta ilerlemeler kaydedilmiş ve antibiyotik keşfi için altın çağ olarak görülmüştür. Bununla beraber, son 30 yılda neredeyse hiç antibiyotik keşfedilmemiş ve daha önceleri kolaylıkla tedavi edilen birçok enfeksiyon, modern sağlık hizmetleri için ciddi bir tehdit haline gelmiştir. Tarım endüstrisinde de çok fazla sayıda reçetelenme ve antibiyotik kullanımı, anti-mikrobiyal direncin artışına yardımcı olmuştur. Son on yılda görülen bağışıklığı baskılanmış nüfustaki artış ile birleştiğinde, direnç zamanla büyük bir sağlık ve ekonomik yük haline gelecektir (Lister et al., 2009; Taylor et al., 2014).

Günümüzde yeni antibakteriyel madde ve yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde yaşanan zorluklar nedeniyle bu konu üzerine yapılan çalışmaların zamanla azalmasına karşın, bakterilerin direnç geliştirmeleri ise devam etmektedir (Mauldin et al., 2010). Bu nedenle patojenlerle mücadelede çok çeşitli yeni yaklaşımlar ve yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi veya patojenlerin virülans özelliklerinin yok edilmesi bu yöntemler arasında sayılabilir. Günümüzde antibiyotiklere karşı geliştirilen direnci engellemeyi amaçlayan ve virülans mekanizmaları inhibe eden yeni nesil ajanların keşfi büyük önem taşımaktadır.

1.5. Antivirülans Terapi

Virülans; patojen mikroorganizmaların hastalığa neden olma yeteneğidir, patojenin ne derece hastalık yapacağını ifade etmek için kullanılır. Şekil 1.4'te belirtilen konağa tutunma, toksin üretimi, salgı sistemleri, quorum sensing (çoğunluk algılanması) sistemi, virülans ile ilgili genlerin ifade aşamaları ve biyofilm oluşumu gibi mekanizmalar mikroorganizmaların virülans mekanizmaları arasındadır (Şekil 1.4). Bu mekanizmalara karşı geliştirilen ilaçlara antivirülans ilaçlar denir. Antivirülans ilaçlar hastalık oluşumunu önlemesi yanında patojen mikroorganizmayı öldürmeden, onları zararsız hale getirmeyi amaçlar. Antivirülans terapileri araştırmak ve geliştirmek adına yapılan son çalışmalar, enfeksiyon ve hastalıkların meydana gelme nedenlerini değil, patojenlerin Şekil 1.5'te belirtilen çeşitli virülans faktörlerini veya virülans mekanizmalarını hedeflemektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Gram-negatif bakteriyel patojenler için tasarlanmış mevcut antivirülans stratejilerin hedeflerine şematik genel bakış (Muhlen and Dersch, 2016)

Patojen mikroorganizmaların antivirülans hedeflerinin ve bunların inhibitörlerinin temsili örnekleri Tablo 1.1'de listelenmiştir. Örneğin; sarımsak, mentol, karanfil ve karabiber gibi iyi tolere edilen doğal virülans inhibitörleri; enterotoksinler, T3SS ve biyofilme karşı umut vaat etmiştir (Maura et all., 2016). Termal yaralanmalar sırasında ciltte meydana gelen hasar sonucunda alttaki dokuları koruyan fiziksel bariyer tehlikeye girer ve konağın bağışıklık sistemi baskılanır, bu da yanık yaralarının enfeksiyonunu kolaylaştırır. Bakteriler genellikle yaranın içinde, bakterileri bağışıklık tepkisinden koruyan ve antibiyotiklere karşı dirençlerini artıran biyofilmler geliştirir. Geleneksel antibiyotiklerin kullanımı dirençli suşların seçimini tetiklediğinden, yara patojenleri tarafından biyofilm oluşumunu önlemek için yeni ajanların kullanımı esastır. Yapılan çalışmalarda bir inhibitör olarak sarımsağın farklı Gram-pozitif ve Gram-negatif yara izolatları tarafından biyofilm gelişimini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Nidadavolu et all., 2012).

Tablo 1.1. Patojen mikroorganizmalar için seçilmiş antivirülans hedef ve inhibitör örnekleri (Maura et al., 2016)

Hedef	Patojen	Örnek İnhibitör	Kullanılan <i>in vivo</i> model
Hla	<i>S. aureus</i>	Morin hidrat	Fare (akciğer)
Stafiloksantin	<i>S. aureus</i>	Fosfonoasetamid türevi	Fare (intraperitoneal)
Enterotoksin	<i>S. aureus</i>	Mentol	-
Sortaz A	<i>S. aureus</i>	Klorojenik asit	Fare (sepsis)
Biyofilm	<i>S. aureus</i>	Karabiber yağı	<i>C. elegans</i>
	<i>A. baumannii</i>	TAGE-triazolkonjugatları	-
	<i>K. pneumoniae</i>	GarO (sarımsak merhemi)	-
	<i>P. aeruginosa</i>	Şeker karışımı	Fare (akciğer)
		C14-TO (3-asil tetronik asit)	Fare (artrit)
		M64	Fare (yanık ve akciğer)
		Ebselen	-
		Anti-PcrV antikor	Fare (akciğer)
		Fasiyokinol E	-
		Triazinler	<i>Tetrahymena pyriformis</i>
QS	<i>S. aureus</i>	Morin hidrat	Fare (akciğer)
	<i>P. aeruginosa</i>	Fosfonoasetamid türevi	Fare (intraperitoneal)
Ci-di-GMP	<i>P. aeruginosa</i>	Mentol	-
Protein sekresyonu	<i>P. aeruginosa</i>	Klorojenik asit	Fare (sepsis)
Kapsül	<i>S. aureus</i>	Karabiber yağı	<i>C. elegans</i>
	<i>K. pneumoniae</i>	TAGE-triazolkonjugatları	-

1.5.1. *P. aeruginosa* için Antivirülans Stratejiler

P. aeruginosa için çoğu antivirülans strateji, virülans sistemlerini (protein salgılama, biyofilm) veya ana virülans düzenleyicilerini (C-di-GMP, QS) hedefler. *P. aeruginosa* T3SS, toksinlerin konak hücreye aktarılması için kritik öneme sahiptir (Hauser, 2009); ilaç keşfi özellikle T3SS, ExoU/S, PscF/PcrV iğne proteinleri ve düzenleyici ExoA'yı hedef almaya odaklanmıştır. *P. aeruginosa* Tip II ve Tip V salgılama sistemleri daha az oranda hedeflenmiştir ancak T2SS ve T3SS aralarındaki benzerlik tesadüfen T2SS inhibitörlerini ortaya çıkarabilir (Felise et al., 2008).

Karbonhidrat bağlayıcı lektinleri hedefleyen anti-biyofilm inhibitörleri, invitro ve in vivo olarak iyi bir etki gösterir ancak konakçı lektinlerini bozabilir. Tip IV pili, *P. aeruginosa* izolatlarında iyi korunmadıkları için uygun olmayan hedeflerdir. C-di-GMP sinyalizasyonu ve QS sistemleri gibi biyofilm düzenleyiciler, antivirülans hedefler arasında çekici gelmektedir. C-di-GMP sinyali, patojenlerde hareketlilik ve biyofilm oluşumu için önemlidir (Römling ve ark., 2013). *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu azaltan C-di-GMP inhibitörleri tanımlanmıştır, ancak in vivo çalışmalar eksiktir.

las, *rhl* ve *pqs* QS sistemleri, ortak kökenli aktive edici ligandlar içerir. *las* ve *rhl* inhibitörlerinin çoğu ligand analoglarıdır. Tarama ile tanımlanan doğal bileşikler,

iyi in vivo etki gösterirler ancak sitotoksik oldukları için dirence maruz kalmışlardır (Hentzer et al., 2003; Maeda et al., 2012). Modifiye edilmiş *pqsD* ligandları ve *pqsD* ile ilişkili enzim ligandları ve inhibitörleride potansiyel inhibitörler olarak geliştirilmiştir. Yüksek verimli tarama (HTS) ile, farelerde akut ve tekrarlayan enfeksiyonlara karşı etkinliği olan, oldukça güçlü *P. aeruginosa* QS inhibitörleri de tanımlanmıştır (Conlon et al., 2013).

1.6. *P. aeruginosa* ve Piyoverdin Yolağı

Demir, tüm canlı organizmalarda çok sayıda reaksiyonda kofaktör olarak kullanılan temel bir elementtir. Bununla birlikte, oksijen varlığında, demir ağırlıklı olarak çok düşük bir çözünürlük ile karakterize edilen Fe^{+3} durumunda meydana gelir ve bu aynı zamanda ana büyümeyi sınırlayan faktörlerden biridir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, çok sayıda mikroorganizma, güçlü bir şekilde buldukları ortama salgılanan ve hücrelerin içine Fe^{+3} 'ün alınmasını kolaylaştıran demir şelatlayıcı moleküller olan sidereforlar üretir. Bu sidereforlar patojen mikroorganizmaların, konakçılardan demir elde etmesi, o mikroorganizmanın büyümesi, üremesi ve enfeksiyon oluşturabilmesi için kesinlikle gereklidir. *P. aeruginosa* da yüksek afiniteli demir alımı için siderefor olarak piyoverdin (PVD) üretmektedir (Takase et al., 2000). PVD, küçük bir peptide bağlı floresan dihidroksikinolin türevidir ve Fe (III) iyonunu şelatlamak için hidroksamat ve katekolat içerir (Wendenbaum et al., 1983). *Pseudomonas*'ın farklı suşlarından ve türlerinden elde edilen PVD'nin yapıları belirlenmiş ve üç kısımdan oluştuğu görülmüştür:

(i) korunmuş bir floresan dihidroksikinolin kromoforu;

(ii) kromoforun amino grubuna bağlı bir asil yan zinciri (dikarboksilik asit veya amid); ve

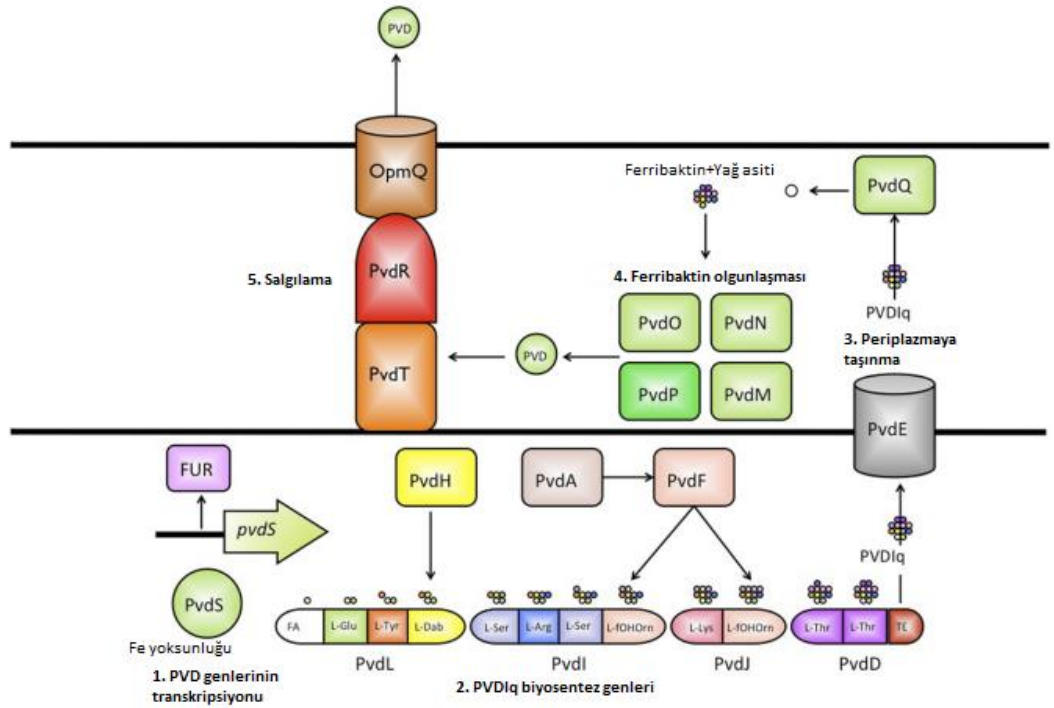
(iii) kromoforun C1 (nadiren C3) karboksil grubuna bağlı bir amid grubuyla bağlanan değişken bir peptit zinciri (Folschweiller et al., 2000). PVD'nin transferrin ve laktoferrinden demiri uzaklaştırdığı ve bu demir bağlayıcı proteinleri veya insan serumunu içeren ortamlarda *P. aeruginosa* büyümesini desteklediği gösterilmiştir (Xiao and Kisaalita, 1997).

PVD'nin yapısı türler arasında ve hatta aynı türün suşları arasında oldukça değişkendir. Örnek olarak, *P. aeruginosa* tarafından üç farklı PVD tipi üretilebilir.

Bu değişkenlik, *Pseudomonas* cinsi içinde taksonomik farklılaşma için bir araç sağlar. PVD, farklı deneysel modellerde *P. aeruginosa* enfeksiyonu ve virülansı için esastır. Ekzotoksin A (ExoA), PrpL ve AprA proteazları ve PVD'nin kendisi gibi önemli virülans faktörlerinin üretimi, PVD'ye bağlı bir sinyal iletim yoluyla sağlanır. Yapılan çalışmalar, PVD düzenlemesinin aynı zamanda Quorum sensing (QS) ile bağlantılı olduğunu ve bu sayede bakteri hücrelerinde gen ekspresyonunun hücre popülasyonu yoğunluğuna bağlı bir şekilde düzenlendiğini göstermektedir. Bazı QS düzenleyicileri, PVD sentez genlerini birlikte düzenler veya PVD sentez genlerinin ifadesini yönlendiren alternatif bir sigma faktörü olan PvdS aracılığıyla düzenleme gerçekleştirirler (Cornelis and Aendekerk, 2004; Ochsner et al., 2002). PVD'lerin ayrıca rizosferdeki fitopatogenik mikroorganizmaların biyolojik kontrolünde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Bazı floresan *Pseudomonas* türleri, rizosferde çeşitli demir kaynaklarını kullanarak, dolaylı olarak bitki korumasına katkıda bulunur.

PVD sentezi en yoğun olarak *P. aeruginosa*'nın PAOI suşunda çalışılmıştır. *P. aeruginosa* PAOI genom dizisinin bilinmesi, PVD sentezi için gerekli olan genlerin tanımlanması ve deneysel olarak doğrulanması için büyük bir fayda sağlamıştır. Diğer *Pseudomonas* suşlarında da, PVD sentez genlerinin hepsi olmasa da çoğunluğu tanımlanabilmiştir. Şekil 1.6'da belirtildiği gibi PVD yolağı, düzenlenmesi, sentezi, olgunlaşması, taşınması ve alımı ile ilgili yaklaşık 20 farklı protein içeren karmaşık bir sistemden oluşmaktadır (Şekil 1.6). *P. aeruginosa* suşu PAOI'deki en büyük dört PVD sentez geni - *pvdL*, *pvdI*, *pvdJ* ve *pvdD* - peptid sentetaz enzimlerini kodlarlar (Ackerley et al., 2003). Bu genlerin ürünü olan enzimler ribozoma bağlı kalmadan çeşitli aminoasitlerin peptid bağı yapmasını (nonribozomal peptid sentezi, NRPS) sağlar ve PVD yapısında bulunan kısa peptid zincirlerini meydana getirirler. PVD üretimi NRPS'de bulunan enzimler, farklı NRPS ve başka yardımcı proteinler ile birlikte çalışırlar. Bu proteinler PVD oluşması, olgunlaşması ve taşınması, Fe⁺³-PVD kompleksinin hücre içerisine alınması veya Fe⁺³'ün PVD'den ayrılması olaylarını gerçekleştirirler. PvdH, PVD molekülü ile etkileşime girecek 2,4-diaminobütirat sentezinden sorumlu iken, PvdA ve PvdF proteinleri yapıda bulunan fOhOrn (N5-formil-N5-hidroksiornitin) molekülünü sentezlerler. PvdQ (periplamik açılaz) ise PVD molekülünün hücre dışına salgılanması sırasında açıl gruplarının uzaklaştırılmasını sağlar (Nadal-Jimenez et al., 2014).

PVD *P. aeruginosa*'nın neden olduğu birçok hastalıkta etkili olan temel bir siderefor moleküldür. Yapılan bazı çalışmalarda PVD mutantlarının veya PVD üretimi engellenmiş mikroorganizmaların virülans özelliklerinde önemli derecede azalma bildirilmiştir. Örneğin 1996 yılında yapılan bir çalışmada, PVD üretemeyen *P. aeruginosa* suşlarının büyümede ve enfeksiyon meydana getirmede etkisiz kaldığı ancak dışarıdan ilave edilen PVD ile bakteri adına yaşanan bu olumsuzluğun giderildiği görülmüştür (Meyer et al., 1996). Bu yüzden PVD üretimi antivirülans terapi için hedef olarak düşünülebilecek yollardan birisidir.



Şekil 1.6. Piyoverdin üretiminde görevli genler. Nadal -Jimenez (2014)'den uyarlanmıştır

1.7. Piyoverdin Üretimini Engelloyen İnhibitör Molekül

Biyolojik ve teknolojik gelişmeler hücre temelli deneylerin biyolojik olarak aktif molekül keşfedilmesi için kullanılmasına olanak sağlamıştır. Hücre temelli deneyler keşfedilen molekülü etkin olduğu ortamda test etmeye imkân sağlar. Ancak bu deneyler ile keşfedilen molekülün fenotipteki kesin hedefinin ne olduğunu anlayabilmek için destekleyici çalışmalara ihtiyaç duyulur (Schenone et al., 2013). Daha önce hakkında çalışma yapılmamış ve bu çalışma kapsamında incelenmiş olan molekül, yüksek verimli tarama yöntemi ile 30.000 molekül arasından tespit edilmiştir. Bu molekülün *P. aeruginosa*'nın gelişimi üzerine herhangi bir etki

göstermediği ancak mikroorganizmanın piyoverdin üretim yeteneğini yitirmesine sebep olduğu görülmüştür. Bunların sonucunda inhibitör molekülün *P. aeruginosa* üzerinde hangi protein veya proteinler ile etkileşim kurduğu bilgisi için kapsamlı laboratuvar çalışmalarına ihtiyaç vardır.

1.8. Yüksek Verimli Tarama Yöntemi ve Moleküler Docking

Yüksek verimli tarama (HTS), belirli bir biyolojik hedef için çok sayıda kimyasal veya biyolojik bileşiğin test edilmesini sağlayan bir ilaç keşif sürecidir. Yüksek verimli tarama yöntemleri, ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve genellikle ilaçlar olmak üzere çok sayıda molekülün biyolojik veya biyokimyasal aktivitesini hızlı bir şekilde test etmek için robotik ve otomasyondan yararlanmaktadır. Büyük ölçekli bileşik kitaplıklar maliyeti uygun ve hızlı bir şekilde taranabildiğinden hedef analizini hızlandırır. HTS, örneğin farmakolojik hedeflerin değerlendirilmesi, reseptörler (GPCR'ler gibi) ve enzimler için agonistlerin ve antagonistlerin farmakolojik olarak profilinin çıkarılması için yararlı bir araçtır. HTS'nin ilk amacı, "hit" veya "lead" olarak adlandırılan, hedefi istenen şekilde etkileyen adayları bileşik kütüphane taramaları aracılığıyla belirlemektir. Bu genellikle sıvı işleme cihazları, robotik, detektör plaka okuyucular ve enstrümantasyon kontrolü ve veri işleme için özel yazılımlar kullanılarak elde edilir.

HTS yöntemi, NMR gibi analitik tekniklerle veya birleştirilmiş yöntemlerle örneğin LC-MS/MS ile bağlantılı olarak daha sık kullanılır. Yapılan bir dizi çalışma, hedefler için afinite oranının veya toksisite seviyesinin belirlenmesini sağlar. Ayrıca nanopartiküllerin ilaçlarla konjugasyonu ve bu yapıların toksisitesinin belirlenmesi ile ilgili araştırmalar da yapılmaktadır. Bu amaçlar için sıklıkla kullanılan hücre hatları vardır. Tüm sistemlerin minyatürleştirilmesi nedeniyle, bu bileşikten sadece 1-3 mg içeren bileşiğin toksisitesini incelemek mümkündür. Sitotoksitenin bu şekilde belirlenmesi, çalışma maliyetlerinde önemli bir azalmaya ve çalışmanın uzunluğunda bir azalma sağlar. HTS, hedef tanımlama, reaktif hazırlama, bileşik yönetimi, tahlil geliştirme ve yüksek verimli kitaplık taraması gibi birkaç adımdan oluşur (Martis et al., 2011).

Tipik HTS ile günde 10.000'e kadar bileşiği taramak mümkündür. Ultra Yüksek Verimli Tarama (UHTS) günde 100.000 tahlil bile yapabilir. İlk başta bileşikler, biyolojik tahlillerden daha az niceleyici olan birincil taramalarda test

edilir. İncelenen bir bileşik, bu tür bir testte pozitif bir sonuç veya “HIT” verirse, daha kesin bir ikincil tarama yapılır ve IC50 değerlerinin hesaplamaları yapılır. İkincil tarama, benimsenen biyolojik ve biyokimyasal testler aracılığıyla gerçekleştirilir. Testler temel olarak iki tiptedir ya filtrasyon, santrifüjleme, sıvı ekleme, inkübasyon ve okuma gibi beş adımdan oluşan heterojen veya heterojenden daha basit ve daha ucuz olan homojen testler gerçekleştirilir. Bununla birlikte, heterojen testler daha duyarlı görünmektedir (Armstrong, 1999).

1.8.1. İlaç Keşfinde HTS

Tıp, ilaçbilim ve biyoteknoloji alanında yer alan ilaç keşfi; ilaç hedefleri ve mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalarla ilişkilidir. Geçmişte çoğu ilaç, aktif bileşenin geleneksel kaynaklardan (bitkiler, mineraller, vb.) belirlenmesi veya keşif yoluyla bulunmuştur. İlaç keşfi, tipik olarak uygun ilaç hedeflerinin (örn. reseptörler, enzimler ve iyon kanalları gibi biyolojik moleküller) tanımlanmasıyla başlayan, oldukça karmaşık, çok disiplinli ve zaman alıcı bir programdır. İlaç keşfi; ilaç hedefinin incelenen hastalıkla ilgili olup olmadığının belirlendiği hedef doğrulamadır. Örneğin hedefi çok sayıda kimyasal bileşiğe maruz bırakan HTS ilaç keşfinde oldukça popüler uygulamaları içermektedir. HTS, ilaç keşfi için yeni bir yöntemdir ancak tek yöntem değildir. HTS sadece ilaç keşfine yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda aktivitelerini optimize etmek için mevcut ilaç gruplarının geliştirilmesine de yardımcı olur. Geçmiş yıllarda bilim ve teknolojiye birçok ilerleme ve ekonomik baskılar, her araştırmacıyı, sürekli artan hastalıklarla ve mevcut ilaçlara direnç kazanan birçok patojenle mücadele etmek için hızlı ve kesin ilaç geliştirme ve tarama teknolojileri geliştirmeye zorladı. Bu aynı zamanda paralel ve kombinatoriyal kimyasal sentezdeki artış nedeniyle taranmayı bekleyen ve giderek artan bileşik kitaplıklarının taranması için de geçerlidir. Başlangıçta tahliller 96 oyuklu plakalarda gerçekleştirildi, ancak ilerlemeyle birlikte şimdi 1586 oyuklu plakalar da mevcuttur. Tipik HTS programları günde 10000'e kadar bileşiği tarama potansiyeline sahipken, Ultra Yüksek Verimli Tarama (UHTS) olan bazı laboratuvarlar günde 100.000 test gerçekleştirebilir (Martis ve ark., 2011). İlaç keşif süreçlerinin son aşamaları insan denemeleridir. Günümüzde ilaç geliştirmede yüksek verimli yöntemler yüksek talep görmektedir. Ana hedefleri, genellikle yüz binlerce ilaç adayından oluşan büyük kitaplıkları (örneğin, kombinatoriyal kimya, genomik, protein ve peptit kitaplıkları) tarayarak ilaç keşfini hızlandırmaktır. HTS, ilaç

geliştirmenin erken aşamasında önemli bir rol oynamakta, bileşik kitaplıkların niteleyici ve niceleyici karakterizasyonunu ve pre-klinik ve klinik çalışmaları için analitik destek sağlamaktadır. Böylece HTS, uygun olmayan bileşiklerin erken elimine edilmesini kolaylaştırmış olur (Martis et al., 2011).

1.8.2. Moleküler Docking (Moleküler Yanaştırma)

İnsan genom projesinin tamamlanması, ilaç keşfi için artan sayıda yeni terapötik hedeflerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda, yüksek verimli protein saflaştırma, kristalografi ve nükleer manyetik tınlama spektroskopisi teknikleri geliştirilmiş ve proteinlerin ve protein-ligant komplekslerinin birçok yapısal detayına katkıda bulunmuştur. Bu ilerlemeler, ilaç hedefleri için sanal tarama teknikleri ve kurşun optimizasyonu yöntemleri gibi bugün ilaç keşfinin en önemli yöntemlerini sunmuştur. Geleneksel deneysel yüksek verimli tarama (HTS) ile karşılaştırıldığında, sanal tarama daha doğrudan ve rasyonel bir ilaç keşfi yaklaşımıdır ve düşük maliyetli ve etkili tarama avantajına sahiptir. Sanal tarama, ligant tabanlı ve yapı tabanlı yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Bir dizi aktif ligant molekülü bulunduğunda ve hedefler için çok az yapısal bilgi mevcut olduğunda veya hiç mevcut olmadığında, farmakofor modelleme ve niceleyici yapı aktivite ilişkisi (QSAR) yöntemleri gibi ligant bazlı yöntemler kullanılabilir. Yapıya dayalı ilaç tasarımına gelince, moleküler yanaştırma, 1980'lerin başından beri yaygın olarak kullanılan en yaygın yöntemdir. Moleküler docking çalışmalarını gerçekleştirmek için farklı algoritmalara dayalı programlar geliştirildi ve bu, bu yöntemin farmasötik araştırmalarda giderek daha önemli bir araç haline getirdi.

Moleküler docking yaklaşımı, küçük bir molekül ile bir protein arasındaki etkileşimi atomik düzeyde modellemek için kullanılabilir; bu, hedef proteinlerin bağlanma bölgesindeki küçük moleküllerin davranışını karakterize etmemize ve ayrıca temel biyokimyasal süreçleri aydınlatmamıza olanak tanır (McConkey et al., 2002). Esasen moleküler yanaştırmanın amacı, hesaplama yöntemlerini kullanarak ligant-reseptör karmaşık yapısının bir tahminini vermektir. Yanaştırma, birbiriyle ilişkili iki adım yoluyla gerçekleştirilebilir: ilk olarak, proteinin aktif bölgesindeki ligandın biçimleri örneklenir; daha sonra bu konformasyonlar bir puanlama fonksiyonu aracılığıyla sıralanır. Konsensüs puanlaması, yerleştirme konformasyonunu değerlendirmek için birkaç farklı puanı birleştiren yeni bir stratejidir. Bir dizi farklı puanlama şeması altında iyi puan aldığı anda, bir ligant veya

potansiyel bir bağlayıcı noktası kabul edilebilir. Konsensüs puanlaması, sanal taramada genellikle zenginleştirmeleri (yani, yüksek puan alan ligandlar arasındaki güçlü bağlayıcı yüzdesini) büyük ölçüde verir ve bağlı konformasyonların ve bağlantı noktalarının tahminini sağlar (Meng et al., 2011).



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

Çalışma Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Doruk'un doktora sonrası çalışmalarında elde ettiği *P. aeruginosa*'ya patojen özellik sağlayan piyoverdin isimli molekülün üretimini engellediği tespit edilmiş, piperidinkarboksiamid (N,N-diethyl-1-[(4-methoxy-1-naphthyl)methyl]-3-piperidinecarboxamide) türevi bir inhibitör ile yapıldı. Liyofilize inhibitör molekülün kullanılabilir formu DMSO ile 25 mM stok solüsyon olarak hazırlanır.

2.1.1. Bakteri suşları

Çalışma sırasında kullanılan PAOI *P. aeruginosa* suşu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan elde edildi. *P. aeruginosa* suşları, Luria Bertani (LB) besiyerinde -80°de %7 v/v DMSO içerisinde saklandı.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

1. **Dijital hassas terazi:** Besi yeri ve katı kimyasalları tartmak için kullanıldı.
2. **Manyetik karıştırıcı:** Besi yerleri ve kimyasalların homojen hale getirilmesinde kullanıldı.
3. **Spektrofotometre:** Elde edilen hücre proteinlerinin BSA analizi ile protein miktarının belirlenmesinde kullanıldı.
4. **İnkübatör:** Besi yerlerine ekilen bakterilerin inkübasyonunda kullanıldı.
5. **Vorteks:** Sıvı bakterikültürlerinin ve kimyasalların karıştırılmasında kullanıldı.
6. **pH metre:** HCl ve KOH kullanılarak kimyasalların pH değerlerinin ayarlanmasında kullanıldı.
7. **Derin dondurucu:** Bakterilerin -80°C'de uzun süreli saklanmasında kullanıldı. Çalışılan hücre lizatlarının ve bazı kimyasalların saklanması için kullanıldı.
8. **Buzdolabı:** Kimyasallar ve katı besiyerlerinin +4°C'de saklanması için kullanıldı.
9. **Otoklav:** Besi yeri hazırlama ve tüm sterilizasyon işlemleri sırasında kullanıldı.

10. **Otomatik pipetler:** Besi yerleri, kimyasallar, bakteri kültürleri, çalışma örnekleri ve enzim gibi deney materyallerinin aktarımında kullanıldı.
11. **Class II steril kabin:** Çalışılan bakteri kültürlerinin ve kimyasalların kontamine olmasını engellemek için kullanıldı.
12. **Çeker ocak:** Kimyasalların ve jellerin hazırlanmasında kullanıldı.
13. **Saf su cihazı:** Besi yeri ve kimyasalların hazırlanmasında kullanıldı.
14. **Biorad protein elektroforez sistemi:** SDS-PAGE jellerinin yürütülmesinde kullanıldı.
15. **ChemiDoc görüntüleme sistemi:** Jellerin görüntülenmesinde kullanıldı.
16. **Santrifüj:** Hücre lizatı elde edilmesinde kullanıldı.
17. **Kuru blok:** Enzimler için doğru sıcaklık ortamı oluşturmada kullanıldı.

2.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar

LuriaBertani (LB) Sıvı&Agar

- YeastExtract 5 gr
- NaCl 10 gr
- Tripton 10 gr
- Agar-Agar 15 gr

Toz halindeki LB besi yerinden 25 gr ve üzerine Agar-Agardan 15 gr tartıldı, bir miktar distile su ile çözdürülerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Ardından otoklavda 121°C'de 40 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besi yeri 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra petri kutularına 20-25 ml olacak şekilde dağıtıldı. Petri kutuları içerisinde donan besi yerleri kullanıma kadar +4°C buzdolabında saklandı.

CAA Medium

- 5 gr Casaminoasit
- 680 mg K_2HPO_4
- 120 mg $MgSO_4$

Tartılan değerler bir miktar distile suda çözdürülerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı, ardından otoklavda 121°C'de 40 dakika steril edildi. Hazırlanan besi yeri kullanıma kadar oda sıcaklığında saklandı.

Fosfat Tamponlu Salin (PBS) pH:7,4

- NaCl 137 mM 5M 219 µL
- KCl 2,7 mM 1M 21,6 µL
- Na₂HPO₄ 10 mM 1M 80 µL
- KH₂PO₄ 2 mM 1M 16 µL
- dH₂O 7,6 mL

Proteaz İnhibitör Kokteyli (20X)

- 1 Katı tablet 2,5 mL dH₂O ile çözünür.
- 10 µL sıvı inhibitör kokteyli 40 µL dH₂O ile karıştırılır.

Liziz Tamponu (1 mL)

- 50 µL 20X Proteaz İnhibitör Kokteyli
- 50 µL 1M NaF
- 100 µL 100 mM β-gliseroİfosfat
- 100 µL 50 mM Na₄P₂O₇
- 10 µL 200 mM Na₃VO₄
- 690 µL B-Per ayıracı (ThermoScientific)

TNC Tamponu (10X) (1 mL) pH: 8

- 500 µL 1 M Tris-HCl
- 100 µL 5 M NaCl
- 100 µL 1M CaCl₂
- 300 µL dH₂O

BCA Protein Konsantrasyon Ölçüm Araçları (ThermoScientific)

- BSA Reaktif A, 500 mL
- BSA Reaktif B, 25 mL
- Albümin Standart Ampüller, 2mg/mL, 10x1 mL

Pronaz (Roche)

- dH₂O ile 10 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve -20°C'de saklanır.

Termolizin (Sigma)

- 1X TNC tamponu ile 10 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve -20°C'de saklanır.

Proteinaz K

- dH₂O ile 10 mg/ml stok solüsyon hazırlanır ve -20°C'de saklanır.

SDS PAGE

1 mm Resolving (Ayrırma) Jeli

1610 µl	dH ₂ O
1900 µl	%30 Akrilamid
1180 µl	1,5 M Tris(pH: 8,8)
24 µl	%20 SDS
24 µl	%10 APS
2,4 µl	TEMED

1 mm Stacking (Yoğunlaşma) Jeli

510 µl	dH ₂ O
600 µl	%30 Akrilamid
375 µl	0,5 M Tris(pH:6,8)
7,5 µl	%20 SDS
7,5 µl	%10 APS
1,5 µl	TEMED

1,5 mm Resolving (Ayrırma) Jeli

2720 µl	dH ₂ O
3200 µl	%30 Akrilamid
2000 µl	1,5 M Tris(pH: 8,8)
40 µl	%20 SDS
40 µl	%10 APS
4 µl	TEMED

1,5 mm Stacking (Yoğunlaşma) Jeli

680 µl	dH ₂ O
800 µl	%30 Akrilamid
500 µl	0,5 M Tris(pH: 6,8)
10 µl	%20 SDS
10 µl	%10 APS
2 µl	TEMED

SDS PAGE Yürütme Tamponu (5X) pH: 8,3

- 72 gr Glisin
- 15,1 gr Tris
- 10 gr SDS

Önce bir miktar, distile su ile pH ölçümü yapıldı ve hacim 1L tamamlandı.

SDS PAGE Destaining Solüsyonu

- % 45 Metanol
- % 40 dH₂O
- % 15 Glasiyal Asetik Asit

SDS PAGE Boyama Solüsyonu

- 1 gr Commasie Blue R-250
- 500ml Metanol
- 100 ml Glasiyal Asetik Asit
- 400 ml dH₂O

%10 APS

- 10 mg Amonyum Per Sülfat
- 1 ml dH₂O

SDS Loading Dye (4X)

- | | | | |
|----------|-------------------------|---------|-------------------------|
| • 2 ml | 1 M Tris(pH: 6,8) | 2,5 ml | 1 M Tris(pH:6,8) |
| • 4 ml | Gliserol | 5 ml | Gliserol |
| • 0,4 ml | β -Merkaptoetanol | 0,5 ml | β -Merkaptoetanol |
| • 1 ml | 0,5 M EDTA (pH: 8) | 1,25 ml | 0,5 M EDTA (pH: 8) |
| • 8 mg | Bromofenol Blue | 10 mg | Bromofenol Blue |
| • 0,8 gr | SDS | 1 gr | SDS |

(5X)

Tris-HCl, Lizozim, MgCl₂ Solüsyonu

- 10 mM Tris-HCl pH: 8,4
- 200 mM MgCl₂
- 0,5 mg/ml Lizozim

Tripsin Çözeltilisi

- 13 μ g/ml Tripsin
- 10 mM Amonyum bikarbonat
- %10 Asetonitril

Gümüş Boyama Stok Solüsyonları

- %50 Aseton
- %50 TCA
- %20 AgNO₃
- %10 Na₂S₂O₃.5H₂



2.2. Yöntemler

2.2.1. Piperidinkarboksiamid Türevi İnhibitörün Moleküler Hedefinin Belirlenmesi

Moleküler hedef belirleme tayini Pai ve ark. DARTS yöntemi ile tespit edilmiştir (Pai et al. 2015). Bu yöntem piperidinkarboksiamid inhibitörü ile etkileşime giren hedef moleküllerin, proteazların neden olduğu lizizden korunması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem sayesinde inhibitör molekül; herhangi bir molekül değişime gerek duyulmadan, doğal hali ile kullanılabilir. Yöntem özetle hücre lizatının hazırlanıp inhibitör molekül ile farklı süreler boyunca bir araya getirilmesi ve ardından inhibitör molekül içeren ve inhibitör molekül içermeyen hücre lizatları üzerine proteaz uygulaması yapılması prensibine dayanır. Proteaz uygulaması yapılan lizatlar SDS-PAGE’te yürütülerek karşılaştırılır. SDS-PAGE’te proteazdan korunmuş protein bantları tespit edilerek MS analizi ile inhibitörün hedefi veya hedefleri tanımlanmaya çalışılır.

2.2.1.1. Hücre Protein Lizatının Hazırlanması

Çalışmalarımızda kullandığımız *P. aeruginosa* bakteri suşu kullanıma hazır hale getirmek için LB sıvı besi yerine ekildi ve çoğalması için 37°C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ependorflara gecelik kültürden 1'er ml konuldu. 13.000 rpm, +4°C’de 3 dakika santrifüj edilen kültürler 500 µl soğuk PBS ile yıkandı. Ardından tekrar 13.000 rpm, +4°C’de 3 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant pipet yardımıyla çekilerek atıldı. Ependorflarda bulunan her bir pellet üzerine 500 µl Liziz tamponu eklendi ve pelletler çözüldü. Hücrelerin lizizinin sağlanması amacıyla 20 dakika buz içerisinde bekletildi. Lizizin ardından 14.000 rpm, +4°C’de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen üst faz süpernatant yeni tüplere alındı (Yaklaşık 500 µl). Her bir tüpe 1/10 oranında (yaklaşık 50 µl) 10X TNC tamponu eklendi ve çalışmalara kadar -20°C’de bekletildi (Pai et al. 2015).

Çalışmalar sırasında farklı hücre lizatları hazırlandı ve çıkan protein miktarı değerleri karşılaştırıldı. Piyoverdin indükleyici CAA besi yerinde bir gece inkübe edilen PAOI kültüründen 1 ml alınarak 13.000 rpm +4°C’de 3 dakika çöktürüldü, 1 ml CAA medium ile oluşan pellet çözüldü. Çözülen pellete tekrar aynı işlemler gerçekleştirildi ve tekrar 1 ml CAA medium ile oluşan pellet çözüldü. Elde edilen 1

ml'lik çözeltili 50 ml CAA besi yeri içerisine konuldu, 5 saat 37°C'de inkübe edildi. 5 saatin ardından 5'er ml kültür falkonlara alınarak 13.000 rpm +4°C'de 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant uzaklaştırıldı ve oluşan pellet 2,5 ml PBS ile çözüldü. Ardından 13.000 rpm +4°C'de 3 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant tekrar uzaklaştırıldı, pellet 2,5 ml Liziz tamponu ile çözüldü. 20 dakika buzda inkübasyonun ardından 14.000 rpm +4°C'de 10 dakikalık bir santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası oluşan üst faz yeni tüpe alındı ve 1/10 oranında 10X TNC eklendi.

Hazırlanan bir diğer protein hücre lizatı ile ise periplazmik proteinler elde edildi. LB broth besi yerine ekilmiş ve çoğalmas için 37°C'de bir gece inkübe edilmiş PAOI kültüründen 40 ml'si falkona alınarak 4500 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 1 ml Tris-HCl, lizozim, MgCl₂ solüsyonu ile çözüldü. Ardından 30 dakika hafif çalkalamalı olarak oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 11.000 g +4°C'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant ile periplazmik proteinler elde edildi.

2.2.1.2. Protein Miktar Tayini

P. aeruginosa hücre lizatlarının bisinkoninik asit, BSA yöntemi ile protein miktarları belirlendi. Thermo BSA protein ölçüm kiti kullanıldı. Kullanılan bu kit prosedürü Biüretin tepkimesiyle başlar. Cu²⁺, alkali çözeltide bulunan proteinler tarafından Cu¹⁺e indirgenir ve BCA, indirgenmiş Cu ile birleşerek mor bir reaksiyon karışımı oluşturur. Oluşan bu karışımın 562 nm'de ölçülerek protein miktarı belirlenir.

Öncelikle seyreltilmiş sığır serum albümin (BSA) stok standartları Tablo 2.1'e göre hazırlandı (Tablo 2.1). Tablo 2.1 BSA kiti protokolüne uygun şekilde hazırlanmıştır. Ardından BSA çalışma reaktifi hazırlandı. BSA çalışma reaktifi 50:1 oranında A ve B reaktiflerinden oluşmaktadır. Gerekli toplam çalışma reaktifi hacmini belirlemek için şu formül kullanıldı; (BSA standart sayısı + numune sayısı) x (kaç tekrar yapılacağı) x (numune başına kullanılacak çalışma reaktifi hacmi) = gerek duyulan toplam çalışma reaktifi hacmi. Gerekli çalışma reaktifi hacmi belirlendi ve 50:1 oranında hazırlandı ve kullanılacak tüm mikrop laka kuyularına 200 µl çalışma reaktifi koyuldu.

BSA standartlarından 10 µl ve 25 µl olacak şekilde iki sıra, çalışma reaktifi üzerine eklendi, mikropolanın diğer bir sırasına üçerli tekrarlar şeklinde 10 µl ve 25 µl hücre protein lizatları koyuldu ve her bir kuyucuk 30 saniye boyunca pipetajlandı. Daha sonra mikropolanın üzeri kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mikropolaka oda sıcaklığında soğutuldu, 562 nm absorbansta ölçümü yapıldı.

Tablo 2.1.BSA standart tablosu

BSA Standart	Seyreltici Hacmi (µL)	BSA ve Kaynak Hacmi (µL)	Son BSA Konsantrasyonu (µg/mL)
A	0	Stoktan 300	2000
B	125	Stoktan 375	1500
C	325	Stoktan 325	1000
D	175	B'den 175	750
E	325	C'den 325	500
F	325	E'den 325	250
G	325	F'den 325	125
H	400	G'den 100	25
I	400	0	0

2.2.1.3. Hücre Lizatı ile İnhibitör Molekülün Karıştırılması

İnhibitör molekülün DMSO ile çeşitli konsantrasyonlarda (1mM, 5mM, 10mM, 25mM) stok solüsyonları hazırlandı. Çalışma yapılacak hücre özütleri 99 µl'lik hacimlere ayrıldı. Hücre özütleri üzerine çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış inhibitör molekülden 1 µl eklendi. Aynı zamanda farklı tüplerde bulunan 99 µl hacimli hücre özütü üzerine 1 µl DMSO eklenerek karşılaştırma yapılacak kontrol grubu oluşturuldu. Karışımlar; hafif çalkalamalı oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

2.2.1.4. Karışıma Proteaz Uygulaması

İnkübasyonun ardından karışımlar 20 µl'lik hacimlere ayrıldı. Örnekler üzerine 2 µl çeşitli oranlarda hazırlanmış proteaz (Termolizin, Pronaz veya Proteinaz K) solüsyonundan eklendi. Termolizin eklenen örnekler 37/60°C'de, Pronaz eklenen örnekler 37°C'de ve Proteinaz K eklenen örnekler 55/60°C'de; 1 dk, 2 dk, 3 dk, 5 dk,

10 dk, 15 dk, 30 dk, 45 dk, 60 dk, 90 dk ve 120 dk'lar boyunca inkübe edildi. Süresi dolan her bir karışıma 2 µl 20X proteaz inhibitör kokteyli eklenerek reaksiyon durduruldu. Örnekler üzerine 6 µl 5X SDS yükleme tamponu eklendi ve 70-90°C'de 10 dakika ısıtıldı. Yapılan proteaz uygulamaları tablo 2.2, 2.3 ve 2.4'te gösterilmiştir (Tablo 2.2, 2.3 ve 2.4).

Tablo 2.2. Farklı SDS PAGE jellerde Termolizin enzimi ile yapılan proteaz uygulamaları

Termolizin Konsantrasyonu	İnhibitör Konsantrasyonu	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
10 mg/ml	10 mM	37/60	2, 5, 10, 15
10 mg/ml	5 mM	37/60	2, 5
10 mg/ml	1 mM	37/60	2, 5
5 mg/ml	10 mM	60	5, 10, 15
5 mg/ml	1 mM	37/60	15, 30, 60, 90
2,5 mg/ml	10 mM	37/60	15, 30
2,5 mg/ml	1 mM	37/60	15, 30, 45, 60
1 mg/ml	25 mM	37/60	1, 2, 3, 4, 5
1 mg/ml	10 mM	37	30, 60, 90, 120
1 mg/ml	10 mM	60	15, 30, 45, 60
1 mg/ml	10 mM	37/60	2, 5, 10, 15
1 mg/ml	5 mM	37/60	2, 5, 10
1 mg/ml	1 mM	37/60	15, 30, 45, 60
0,25 mg/ml	10 mM	60	2, 5

Tablo 2.3. Farklı SDS PAGE jellerde Pronaz enzimi ile yapılan proteaz uygulamaları

Pronaz Konsantrasyonu	İnhibitör Konsantrasyonu	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
100 µg/ml	10 mM	37	5, 10, 15
75 µg/ml	10 mM	37	5, 10, 15
50 µg/ml	10 mM	37	2, 5, 10, 15
10 µg/ml	10 mM	37	2, 5, 10, 15
10 µg/ml	5 mM	37	2, 5
10 µg/ml	1 mM	37	2,5
1 µg/ml	25 mM	37	1, 2, 3, 4, 5
1 µg/ml	25 mM	60	1, 2
1 µg/ml	10 mM	37	2, 5, 10, 15
1 µg/ml	10 mM	37	30, 45, 60

Tablo 2.4. Farklı SDS PAGE jellerde Proteinaz K enzimi ile yapılan proteaz uygulamaları

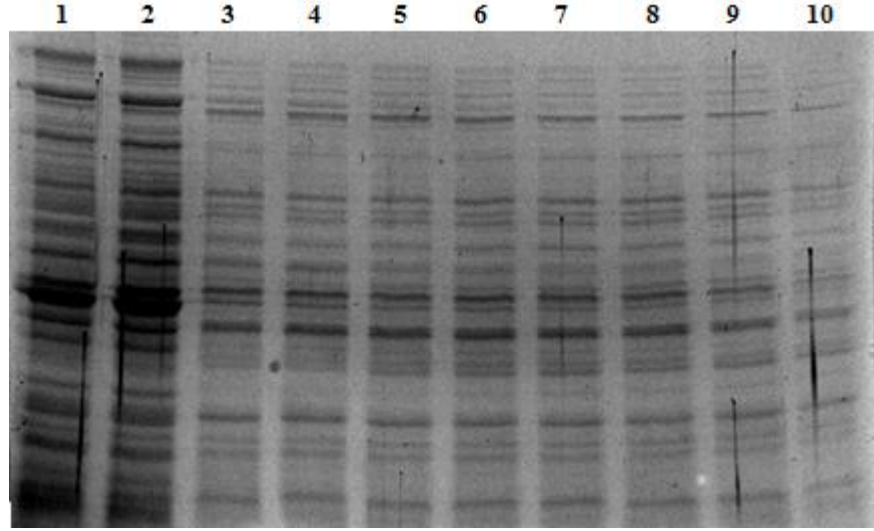
ProteinazK Konsantrasyonu	İnhibitör Konsantrasyonu	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
10 µg/ml	10 mM	55	2, 5, 10, 15, 20
10 µg/ml	10 mM	60	2, 5, 10, 15
10 µg/ml	5 mM	60	2, 5
10 µg/ml	1 mM	60	2, 5
7.5 µg/ml	10 mM	60	5, 10, 15
5 µg/ml	10 mM	55	2, 5, 10, 15
2.5 µg/ml	10 mM	55	2, 5, 10, 15
1 µg/ml	10 mM	55	2, 5, 10, 15
0.5 µg/ml	10 mM	55	2, 5, 10, 15

2.2.1.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Korunmuş Bant Analizi

Proteaz uygulamasından korunmuş proteinlerin saptanması için SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrezinde ayırma ve yoğunlaşma jeli olmak üzere, yoğunlukları farklı iki ayrı ortam birlikte kullanılmaktadır, bu jellerin hazırlanması sırasında uygun boyut ve şekillerde cam plakalar bulunmaktadır. Bu sistemde ayırma jelinin konsantrasyonu çalışmalarımızda kullanıldığımız örneklerin moleküler ağırlığına göre değişiklik gösterirken, yoğunlaşma jelinin konsantrasyonu genellikle sabittir. Hazırlanan bu jellerden ayırma jeli çalışmalarımızdaki örneğin asıl analiz edildiği, saptandığı yapıdır ve enzim çalışmalarında genellikle %10-12 yoğunlukta kullanılır. Yoğunlaşma jeli, ayırma jelinin üzerinde yer alır ve çalışma örneklerinin yüklenmesi için kuyucukların olduğu kısımdır. SDS-PAGE sisteminde jel içerisinde denatüre edici ajan olarak SDS bulunur.

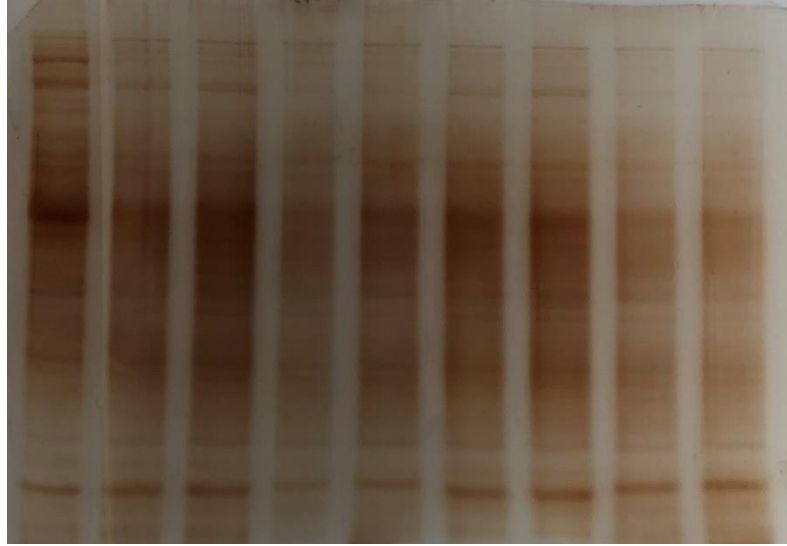
Belirtilen miktarlar ile ayırma ve yoğunlaşma jelleri hazırlanıp, örnek sayısına uygun tarak yerleştirildikten sonra, jellerin oda sıcaklığında polimerize olması sağlandı. Polimerize olmuş jelden tarak, oluşan örnek yükleme kuyucuklarına zarar vermeden çıkarıldı ve örnek yükleme tamponu ile karıştırılmış protein örnekleri 15-25 µl arasında kuyucuklara dolduruldu.

SDS jelin ilk kuyucuklarına kontrol grubu olmaları amacıyla konulan hücre lizatı+DMSO ve hücre lizatı+İnhibitör karışımlarına, proteazlar yerine 2 µl 1X TNC solüsyonu konuldu. Böylece proteaz inhibitörü konulmadan direkt olarak SDS yükleme tamponu ile muamele edilmiş oldu. Ardından 100-120 W, 100-140 dakika boyunca jel yürütüldü. Yürütülen jel 1 gece boyunca SDS boyama solüsyonu içerisinde bekletildi. 1 gecenin sonunda destaining solüsyon ile jeldeki fazla boya giderildi ve jel görüntüleme sistemi (Biorad Chemidoc) ile görüntülendi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Örnek jel görüntüsü. 1. kuyu: Hücre lizati+DMSO, 2. kuyu: Hücre lizati+ İnhibitör madde, 3. kuyu: 2.dk Hücre lizati+Enzim+ DMSO, 4. kuyu: 2. dk Hücre lizati+Enzim+İnhibitör madde, 5. kuyu: 5. dk Hücre lizati + Enzim + DMSO, 6. kuyu: 5. dk Hücre lizati+Enzim+İnhibitör madde, 7. kuyu: 10. dk Hücre lizati+Enzim+DMSO, 8. kuyu: 10. dk Hücre lizati+Enzim+İnhibitör madde, 9. kuyu: 15. dk Hücre lizati+Enzim+DMSO, 10. kuyu: 15. dk Hücre lizati+Enzim+İnhibitör madde

Görüntülenen jellerden daha hassas sonuç alabilmek amacıyla, yapılan çalışmalardaki bazı jellere gümüş boyama protokolü uygulandı. Fiksasyon aşamasında jel 60 ml aseton stok, 1,5 ml TCA ve 25 µl %37 CH₂O karışımı içerisinde 5 dakika bekletildi. Ardından 3 tekrarlı olarak 5'er saniye dH₂O ile jel durulandı, yine distile su içerisinde jel 5 dakika boyunca yıkandı. 3 tekrarlı 5'er saniyelik durulama işlemi tekrarlandı. Ardından jel 60 ml aseton içerisinde 5 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra 100 ml Na₂S₂O₃.5H₂O ve 60 ml dH₂O içerisinde 1 dakika bekletildi ve 3 tekrarlı olarak 5'er saniye dH₂O ile durulama işlemi gerçekleştirildi. Jel 0,8 ml AgNO₃ stok, 0,6 ml %37 CH₂O ve 60 ml dH₂O içerisinde 8 dakika bekletilmesinin ardından 2 tekrarlı olacak şekilde 5'er saniye dH₂O ile durulandı. Bant görüntüsü elde edilene dek jel 1,2 gr Na₂CO₃, 25 µl CH₂O, 25 µl Na₂S₂O₃.5H₂O stok ve 60 ml dH₂O içerisinde bekletildi. Ardından 0,6 ml %1 glasiyal asetik asit ve 59,4 ml dH₂O ile jel 30 saniye ve yalnız dH₂O ile 10 saniye durularak Şekil 2.2'deki görüntüsü alındı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Gümüş boyama görüntüsü

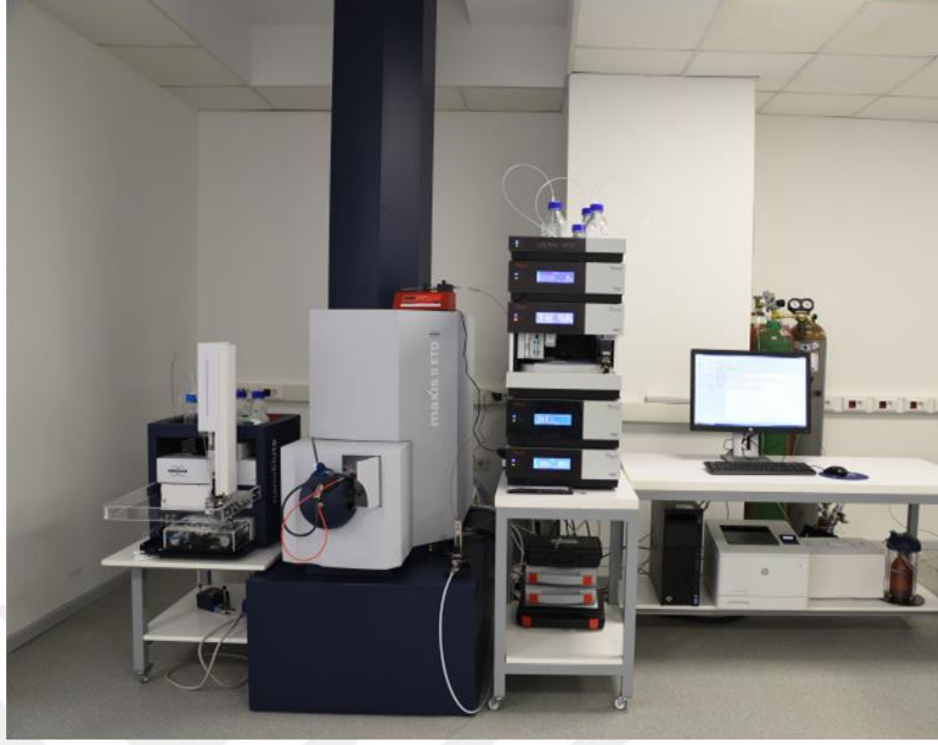
2.2.1.6. Korunmuş Bandın Jelden Kesilmesi

Jel görüntüsünden proteoliziz yapılmayan ve yapılan örnekler karşılaştırıldığında proteolizizden korunmuş protein bantları belirlendi. İstenilen bu bant steril bir şekilde SDS PAGE jelinden Shevchenko ve ark.'larının yöntemi ile ayrıldı. Ayrılan bant küçük parçalar halinde kesilerek temiz bir ependorf içerisine konuldu. Jel parçaları üzerine 100 µl amonyum bikarbonat (200 mM/asetonitril (1/1,v/v)) karışımı eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Çözelti döküldükten sonra jel üzerine 500 µl aseton ilave edildi. Karışım, jel parçaları beyazlayıncaya ve büzüşünceye kadar oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresince her 10 dakikada bir karışım vorteks edildi. Jel parçalarının beyazlamasının ardından aseton ortamdan uzaklaştırıldı ve 500 µl tripsin çözeltisi ilave edildi ardından 30 dakika buz içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda tripsin çözeltisi tamamen absorbe edildi ise bir miktar tripsin çözeltisi daha eklendi (yeterli düzeyde ise ekleme yapılmaksızın) ve 90 dakika aynı koşullar altında bekletildi. Daha sonra jel parçaları üzerini kaplayacak miktarda 100 mM amonyum bikarbonat çözeltisi eklendi ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından jel parçaları oda sıcaklığında soğutuldu ve protein hidroliz ürünlerinin ekstraksiyonuna geçildi. Hidrolizat üzerine 100 µl ekstraksiyon tamponu (%5 formik asit/asetonitril, 1/1, v/v) ilave edilerek 15 dakika, 37 °C'de inkübe edildi. Ardından 13.000 g'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüjün ardından süpernatant kabin içerisinde temiz ependorf tüplerine alındı ve örnekler evaporatörde

1 gece boyunca liyofilize edildi (asetonitril ayarında). Liyofilize örnekler üzerine % 0,1'lik (v/v) triflora asetik asit çözeltisi eklendi, karışım vortekslendi ve ultrasonik su banyosunda 5 dakika boyunca inkübe edildi. Karışım 10.000 rpm 15 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant alınarak evaporatörde 1 gece boyunca liyofilize edildi (TFA ayarında). Liyofilize edilen örnekler toz halinde oda sıcaklığında saklandı ve analize gönderildi.

2.2.2. LC-MS/MS ile Proteomik Analizin Gerçekleştirilmesi

MS analizi için hazırlanan örnekler Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezine gönderildi ve analiz verileri elde edildi. Proteomik analizler Şekil 2.3'te gösterilen nLC (nano Liquid Chromatography) sistemine (BrukerNanoElute) bağlı ESI-QTOF-MS (ElectrosprayIonization-Quadrupole Time-of-Flight-Massspectrometer) sisteminde (BrukerMaxis II ETD QTOF MassSpectrometer, Resolution: 80.000) gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Yüksek düzeyde kütle doğruluğunu saptanması amacıyla sistemin analiz öncesinde çok noktalı kalibrasyonu sağlandı. Gönderilen numuneler ilk olarak nLC sisteminde bulunan şırınga yardımıyla cihaza bağlı olan 100 µm iç çaplı, 2 cm uzunluğundaki zenginleştirme kolonuna (AcclaimPepMap RSLC, Thermo) yüklendi. Daha sonra çözücü programlaması ile bu kolondan ayrılan peptitler, 75 µm iç çaplı, 50 cm uzunluğa sahip ve C18 parçacıkları içeren analitik kolona (AcclaimPepMap RSLC, Thermo) gönderildi ve peptit parçalarının birbirlerinden ayrılması sağlandı. nLC cihazından ayrılarak gelen peptit parçaları QTOF kütle spektrometresinde bulunan nano-ESI (Bruker captive spray) iyon kaynağına gönderildi ve iyonlaşmaları sağlandı. Her numune LC-MS/MS analizinde yaklaşık 1 mg peptit karışımına 20 dakikalık ayırma işlemi uygulandı. Peptitler zenginleştirme kolonuna tampon A (%0.1, v/v formik asit) ile yüklendikten sonra 15 dakikalık doğrusal %10-%50 gradient ile tampon B (%0.1 v/v formik asit, %60 v/v asetonitril) kullanılarak analitik kolondan ayrıldı. Ayrılma işlemi sonunda tampon B miktarı %98 yapılarak 450 ml/dk akış hızında 5 dakika yıkama gerçekleştirildi ve analiz tamamlandı. Tüm ayırma işlemleri sırasında kolon sıcaklığı 60°C tutuldu.



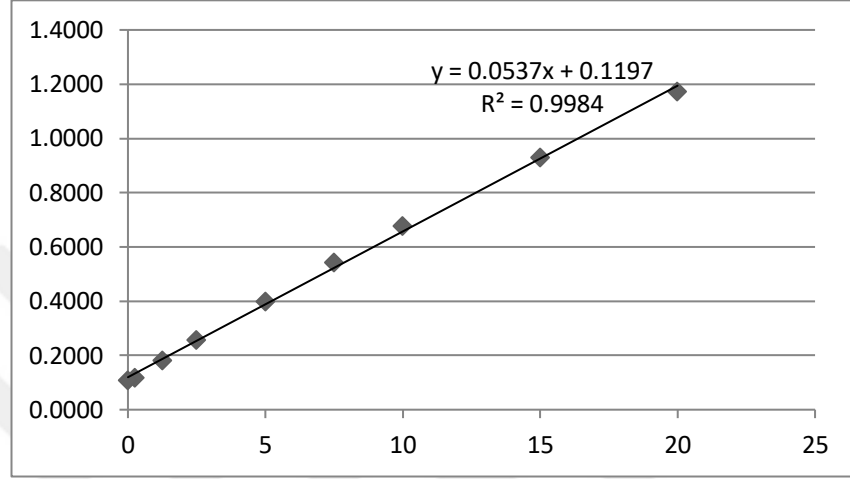
Şekil 2.3. ESI-QTOF-MS sistemi

Kütle spektrometrik veriler Top5 data-dependent MS/MS yöntemiyle elde edildi. Bu çalışmada Tripsin ile parçalanmış peptit parçalarının hem normal MS taraması ile moleküler iyonları hem de QTOF içerisinde yer alan CID (Collision Induced Dissociation) hücrelerinde bu moleküllerin kontrollü bir şekilde parçalanmasıyla (auto MS/MS) tandem kütle spektrometrik verileri elde edildi. Elde edilen bu veriler işlendikten sonra Mascot (MatrixScienceInc., A.B.D) arama motoru ile elde edilen proteinlerin tarama işlemleri gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Hücre Protein Lizatı BSA Sonuçları

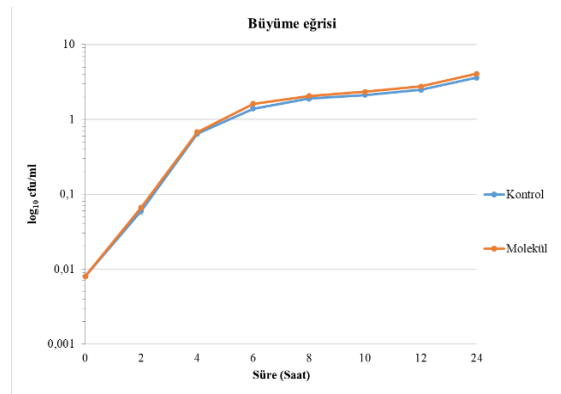
P. aeruginosa hücre lizatlarından elde edilen protein miktarı konsantrasyonu standart grafik ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Yapılan çift tekrarlı BSA analizinde 0,8 mg/ml protein miktarı tespit edilmiş ve çalışmalarda bu oran kullanılmıştır.



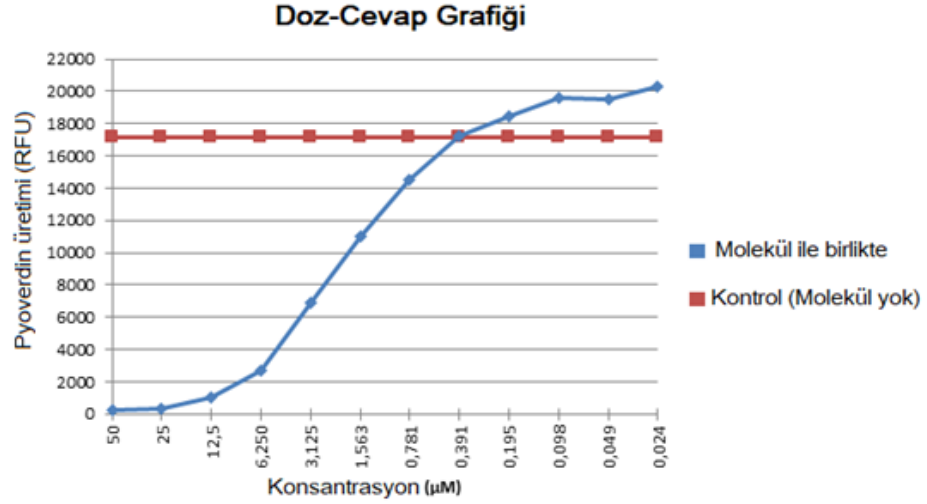
Şekil 3.1. BCA Standart Eğrisi

3.2. İnhibitör Molekülün Etkisinin Kanıtlanması

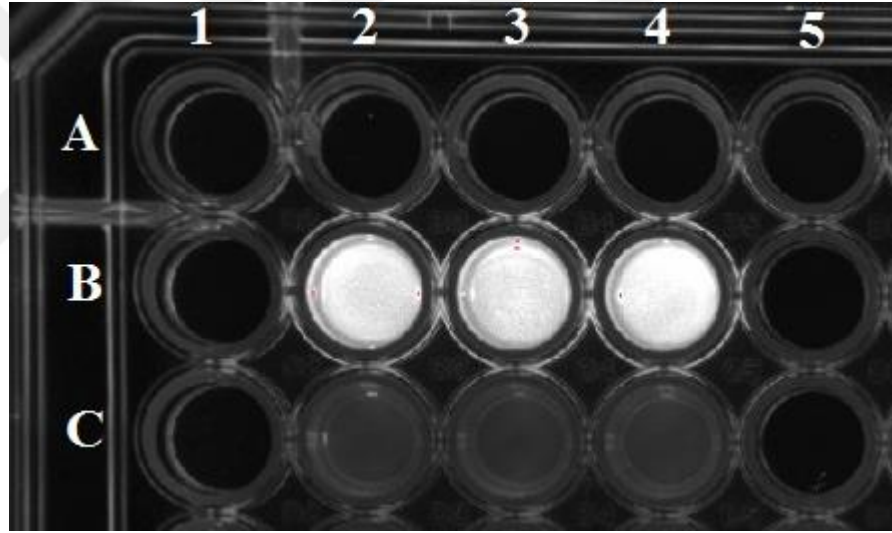
Yapılan testler sonucunda piperidinkarboksiamid türevi molekülün *P. aeruginosa* hücrelerinin büyümesi üzerine bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.2). Aynı molekülün düşük konsantrasyonlarda (IC₅₀= 2µM) piyoverdin salgılanmasını açıkça engellediği yapılan doz-cevap grafiği (Şekil 3.3) ve görüntüleme yöntemi ile gösterilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.2. 25 µM inhibitör molekül varlığında yapılan büyüme eğrisi grafiği



Şekil 3.3. Piyoverdin üretiminin inhibitör madde dozuna bağlı değişim grafiği

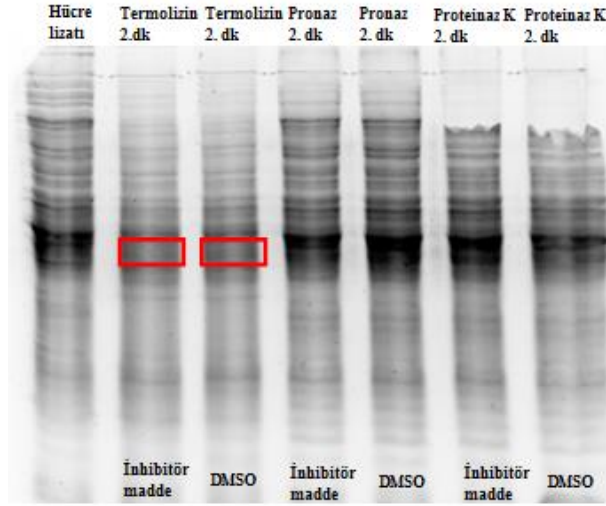


Şekil 3.4. Piyoverdin indüklü besiyerinde inhibitör madde eklenmemiş (B2-4) ve 10 µM inhibitör madde eklenmiş *PAOI* (C2-4) kültürü floresan görüntüsü

3.3. İnhibitör Molekülün Moleküler Hedefinin Belirlenmesi

Piyoverdin indüklü besiyerinde inhibitör madde etkinliğini kanıtlamak amacıyla yapılan çalışmalarda, 10 µM derişimde inhibitör madde eklenmiş 3 tekrarlı gözlemede inhibitör maddenin, *PAOI* suşunda floresan özelliği inhibe ettiği görülmüştür. Hazırlanan hücre lizatları BSA analizlerinde, genellikle 0,8 mg/ml protein içeren, protein hücre lizatları ile çalışılmıştır. Periplazmik hücre lizatları ve piyoverdinindüklü hücre lizatları ile yapılan çalışmalarda istenilen korunmuş bant verisine ulaşılamamıştır.

Pai ve ark. yöntemi ile; hücre lizatı ve 10 mM inhibitör molekül karışımında, 0,25 mg/ml Termolizin enzimi uygulamasının 2.dk'sında Şekil 3.5'te belirtildiği gibi, proteaz enziminden korunmuş bir bant gözlemlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Termolizin enzimi muamelesinin 2.dakikasında kontrol grubundan ayrı olarak gözlemlenen korunmuş protein bandı

Kontrol grubunda olmayan bu bant SDS-PAGE'den gerekli protokollere uyularak alınmış ve LC-MS analizine tabi tutulmuştur. LC-MS analizinde bu korunmuş bant ile kontrol grubu jeli üzerindeki proteinler karşılaştırılmış ve 8 adet birbirinden farklı proteazdan korunmuş protein bulunmuştur. Bulunan bu proteinlerin inhibitör madde ile etkileşime girdiği ve böylece proteazdan korunduğu düşünülmektedir.

3.4. LC-MS/MS ile Proteomik Analiz Sonuçları

Proteomik analizler nLC (nano Liquid Chromatography) sistemi (Bruker NanoElute) bağlı ESI-QTOF-MS (Electrospray Ionization – Quadrupole Time-of-Flight – mass spectrometer) sisteminde (Bruker Maxis II ETD QTOF Mass Spectrometer, Resolution: 80 000) gerçekleştirilmiştir.

Yüksek düzeyde kütle doğruluğu sağlamak için sistem, analizler öncesinde çok noktalı kalibrasyon tekniğiyle kalibre edilmiştir. Bu çalışma esnasında Tripsin ile parçalama sonrası elde edilen peptit parçalarının hem normal MS taramasıyla moleküler iyonları (precursor ions) belirlenmiş aynı zamanda QTOF içerisinde yer alan CID (Collision Induced Dissociation) hücresinde bu moleküller kontrollü bir şekilde parçalanarak (auto MS/MS) tandem kütle spektrometrik proteomik verileri elde edilmiştir.

Kütle spektrometrik (MS) analizler sonucu elde edilen veriler işlendikten sonra Mascot (Matrix Science Inc., A.B.D) arama motoru yardımıyla protein tanımlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen MASCOT sonuçlarına ait örnekler Şekil 3.6'da belirtilmiştir (Şekil 3.6).

MASCOT Search Results
Protein View: ATOB_PSEAE
 Acetyl-CoA acetyltransferase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1) OX=208964 GN=atoB PE=3 SV=1
 Database: SwissProt
 Score: 131
 Monoisotopic mass (M₀): 40608
 Calculated pI: 6.03
 Taxonomy: Pseudomonas aeruginosa PAO1
 Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of ATOB_PSEAE against nr.
 Search parameters
 MS data file: 281474976710737.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)

MASCOT Search Results
Protein View: BAMB_PSEAE
 Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1) OX=208964 GN=bamB PE=1 SV=1
 Database: SwissProt
 Score: 105
 Monoisotopic mass (M₀): 40429
 Calculated pI: 5.33
 Taxonomy: Pseudomonas aeruginosa PAO1
 Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of BAMB_PSEAE against nr.
 Search parameters
 MS data file: 281474976710737.mgf
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)

Şekil 3.6. Örnek olarak seçilmiş MASCOT protein arama motoru sonuçları

Family	Member	Database	Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of significant matches	Num. of sequences	Num. of significant sequences	empAI	Description
1	1	SwissProt	UCC_PSEA	467	41830	38	35	5	5	0.5	Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
2	1	SwissProt	ORD_PSEA	272	48330	20	16	3	2	0.15	Porin D OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
3	1	SwissProt	HHC_PSEA	159	43589	17	11	4	3	0.26	Aromatic-amino-acid aminotransferase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
4	1	SwissProt	TOB_PSEA	131	40608	27	11	5	3	0.29	Acetyl-CoA acetyltransferase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
5	1	SwissProt	SAT_PSEAI	119	43463	7	7	1	1	0.08	Aspartate aminotransferase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
6	1	SwissProt	FTU_PSEA	119	43684	24	15	4	4	0.37	Elongation factor Tu OS=Pseudomonas aeruginosa (strain UCBPP-Pseudomonas aeruginosa)
7	1	SwissProt	AMB_PSEF	105	40429	8	7	2	2	0.18	Outer membrane protein assembly factor BamB OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
8	1	SwissProt	BPD_PSEA	99	42390	9	9	1	1	0.08	Chitin-binding protein CbpD OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
9	1	SwissProt	RAC_PSEA	98	39858	5	4	2	1	0.09	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and alanine-binding protein OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
10	1	SwissProt	HAS_PSEA	81	40697	7	6	1	1	0.09	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
11	1	SwissProt	SPQ_PSEA	74	38620	9	7	2	2	0.19	Glutaminase-asparaginase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
12	1	SwissProt	HZS_PSEA	52	43732	4	4	1	1	0.08	5-methylphenazine-1-carboxylate 1-monooxygenase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)
13	1	SwissProt	NETZ_PSEA	50	43386	1	1	1	1	0.08	O-succinylhomoserine sulphydrylase OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)

Şekil 3.7. İnhibitör madde içeren örnekteki korunmuş banttardan elde edilen proteinlerin LC-MS/MS sonucu. Sarı renk ile işaretlenmiş proteinler inhibitörsüz örneklerde de gözlemlenirken mavi renk ile işaretlenmiş proteinler yalnızca inhibitör varlığında gözlemlenmiştir

İnhibitör varlığında proteaz uygulamasından korunduğu düşünülen Şekil 3.7'de belirtilen toplam 13 protein varlığı tespit edilmiştir. Bu proteinlerden 6 tanesi kontrol grubunda yer alan inhibitörsüz örneklerin LC-MS analizinde de yer alırken, diğer 7 proteinin yalnızca inhibitör varlığında hazırlanan örneklerde bulunduğu görülmüştür.

Tablo 3.1. LC-MS sonucu korunmuş bantta elde edilen farklı proteinler ve LC-MS skorları

Skor	Protein
119	Aspartat aminotransferaz
105	Dış zar protein birleşme faktörü BamB
99	Kitin bağlayıcı protein
81	Aspartat semialdehit dehidrojenaz
74	Glutamin asparajinaz
52	5-metilfenazin-1-karboksilat-1-monooksijenaz
50	O-süksinilhomoserinsülfhidrilaz

LC-MS skoru 50 ve üzerinin anlamlı olduğu 7 sonuç elde edilmiş ve Tablo 3.1'de verilmiştir (Tablo 3.1). QTOF analizi sonucu en yüksek skora sahip proteininin "Aspartat aminotransferaz" enzimi olduğu görülmektedir. Analiz sonucunda inhibitör molekülün hedefinin literatür taramalarında piyoverdin üretiminde görev aldığı belirlenen Aspartat aminotransferaz proteini olabileceği sonucuna varılmıştır.

4. TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan DARTS yöntemi literatürde çoğunlukla ökaryot organizmalarda uygulanan bir yöntem olarak bilinmektedir. Bu çalışmada ise bu yöntem, prokaryotlara uyarlanmış ve aynı zamanda inhibitör maddenin doğal hali ile kullanılması sağlanmıştır. Bu yöntem alternatif olarak kimyasal maddeye etiket (biotin vb ajanlar) eklenmesi ile kromatografik yöntemler veya aktivite tabanlı yöntemler kullanılabilir (Ha et al, 2021; Ziegler et al, 2013).

LC-MS analiz sonuçları incelendiğinde inhibitör molekülün birden fazla virülans mekanizmada görev alan proteinler ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar incelenirken 50 ve üzeri değer veren proteinlerin anlamlı sonuç verdiği bilinmektedir ve ayrıca virülansa etkili olduğu düşünülen proteinlerin yüksek skor verdiği görülmüştür. LC-MS sonucu elde edilen proteinlerden aspartat aminotransferaz; virülansda etkisi olduğu düşünülen bir enzimdir. PvdH tarafından üretilen L-2,4-diaminobutirat ile aminotransferaz birlikte çalışarak Piyoverdin sentezinde önemli bir rol almaktadır (Vandenendeet al, 2004). Yüksek SGOT (Serum levels of aspartate aminotransferase) seviyelerinin ortaya çıkması da hücre zarının çok hızlı bir şekilde hasar görmesine neden olmaktadır (Pavlovskiset al., 1946).

Gram-negatif bakteriler iç zar ve dış zar olmak üzere çift lipid tabakası ile çevrilidir. Bu zarların yapısında önemli farklılıklar bulunmaktadır. İç zar simetrik bir fosfolipid tabakasından oluşur ve ağırlıklı olarak α -sarmal proteinleri barındırırken, dış zar asimetrik ve esas olarak β -bariyer proteinleri içerir.

Dış zar proteini ailesi, temel fizyolojik işlevleri yerine getirir, aynı zamanda virülans ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinleri de içerir. Bu nedenle hücresel canlılığın korunmasında temel bir rol oynar (Knowles et al., 2009). Dolayısıyla dış zar protein birleşme faktörü BamB, bakterinin dış zarının şekillenmesinde görev alırken aynı zamanda virülansda etkili olabilecek proteinler arasında yer almaktadır. BamB'nin genomdan silinmesinin bazı patojenik bakterileri zayıflattığı görülmüş ve mikroorganizmanın bazı antibiyotiklere karşı hassas hale geldiğibildirilmiştir (Klein et al, 2019). BamB'nin, DNA kırılması, DNA onarımı ve homolog rekombinasyon ile bağlantılı olduğu bazı çalışmalarca bildirilmiştir. BamB'nin diğer proteinlerle homolojiye dayalı olarak yedi veya sekizli β -bariyer yapılarına sahip olduğu tahmin edilmektedir (Knowles et al, 2009).

Kitin yapısı böceklerin dış iskeletlerinde, kabukluların kabuklarında, birçok mantar ve alg hücre duvarlarında ve nematodlarda yapısal bir bileşen olarak bulunur. Aynı zamanda *P. aeruginosa*'da da bulunan kitin bağlayıcı proteinler CbpD, hücre dışı ortama tip II salgılama yoluyla salgılanmaktadır. Kitin bağlayıcı proteinler (CbpD'ler), her yerde bulunan biyolojik polimer kitinin bozunmasında temel bir rol oynar ve bozunma ürünleri, deniz ve toprakta yaşayan bakteriler için önemli bir besin kaynağı olarak hizmet eder (Frederiksen et al., 2013). Son çalışmalar, bakteriyel CbpD'lerin, kitini enzimatik olarak parçalayabildiğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, bu proteinler için daha açıklayıcı bir terim olan litik polisakkarit monooksijenaz ismi önerilmiştir (Aachmann et al., 2012). CbpD'nin, kitin içeren substratlara bağlanmaya aracılık ederek veya ökaryotik hücrelerde N-asetilglukozamin kalıntıları içeren N-glikosillenmiş hücre duvarı reseptörleri ile etkileşime girerek *P. aeruginosa* patojenitesinde bir rol oynadığı öne sürülmüştür. *P. aeruginosa*'nın bir kitinaz kadar CbpD üretme yeteneği tanımlanmış ve yapılan son çalışmalarda CbpD'nin kistik fibrozlu akciğerlerde bakteriyel kolonizasyonda önemli roller oynadığı gösterilmiştir. (Folders et al., 2000; Folders et al., 2001; Manos et al., 2008). CbpD proteininden yoksun suşların ise virülans özellikleri azalmış ve piyoverdin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerinde azalmalar meydana gelmiştir (Askarian et al., 2021).

Asd geni; diaminopimelik asit, lizin, metionin ve treonin için biyosentetik yollarda anahtar bir enzim olan aspartat semialdehit dehidrojenazı kodlamaktadır (Hoang et al., 1997). Aspartat semialdehit dehidrojenaz (ASADH, EC 1.2.1.11) bakteri, mantar ve yüksek bitkilerde bulunan temel bir enzimdir. Bakteri hücre duvarlarının bir bileşenidir ve lizin üretmek için dekarboksilatlanır (Hadfield et al., 2001). Bu temel ürünlerin biyosentezinin inhibisyonu, yeni antibiyotik, mantar öldürücü veya herbisidal bileşiklerin geliştirilmesi için olası bir strateji olacaktır. Aynı zamanda aspartat semialdehit dehidrojenazın piyoverdin sentezinde önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni, aspartat semialdehit dehidrojenazın bakteri hücre duvarlarının çapraz bağlanması için çok önemli bir bileşen olan diaminopimelik asit (DAP) üretiminde oynadığı roldür. Ayrıca DAP, piyoverdin sentezinde önemli görevlere sahip bir proteindir (Vandenende, 2004). Dolayısıyla aspartat semialdehit dehidrojenaz mikroorganizma virülansında büyük öneme sahip bir proteindir denilebilir.

Pseudomonas glutamin asparaginaz enzimi (PGA); amidohidrolazlar ailesinden bir protein olup glutamin ve asparajinin D ve L izomerlerinin hidrolizini katalize eder (Ortlund et al., 2000). Büyüme ortamında glutamik asidin varlığı, optimal enzim üretimi için gereklidir ve glikoz, glutaminaz-asparaginaz üretimini engellemektedir (Lubkowskiet al., 1994). Literatürde bu proteinin piyoverdin üretimi ile ilgisi bulunamamıştır. 5-metilfenazin-1-karboksilat-1-monooksijenaz ise virülans rol oynayan mavi pigmentli bir fenazin türevidir olan piyosiyenin biyosentezinde yer alır. 5-metilfenazin-1-karboksilatın (5-metil-PCA) mavi pigmentli piyosiyane oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder. Ayrıca fenazin-1-karboksilat (PCA) üzerine de etki ederek onu 1-hidroksifenazine (1-HP) dönüştürmektedir (Parsons et al., 2007). 5-metilfenazin-1-karboksilat-1-monooksijenaz proteininin piyoverdin üretimi üzerine etkisi bulunamamıştır ancak 5-metilfenazin-1-karboksilat-1-monooksijenaz proteini yoksunluğunda virülans özelliklerinde azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir (Mavrodiet al., 2001).

P. aeruginosa'da metiyonin biyosentezinde O-süksinilhomoserin sülfhidrilaz enziminin gerekli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *P. aeruginosa*, doğrudan sülfhidrilasyon için substrat olarak O-süksinilhomoserin kullanan, şimdiye kadar tarif edilen tek organizmadır. Fe⁺² eklendikten sonra O-süksinilhomoserin sülfhidrilazın etkinliğinin %115 arttığı bildirilmiştir (Zhu et al., 2021). Yapılan çalışmalarda ise O-süksinilhomoserin sülfhidrilaz enziminin *P. aeruginosa* yapısına katıldığı ancak piyoverdin üretimi veya mikroorganizma virülansı üzerine ilgisi olup olmadığı bulunamamıştır (Fogolino et al., 1995).

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş ve bu nedenle hastane kaynaklı enfeksiyonların birçoğundan sorumlu olan *P. aeruginosa*'nın; patojen özelliğini sağlayan piyoverdin isimli molekülün üretimini engellediği tespit edilmiş piperidinkarboksiamid (N,N-diethyl-1-[(4-methoxy-1-naphthyl)methyl]-3-piperidinecarboxamide) türevi bir inhibitör molekülün, mikroorganizma üzerindeki moleküler hedefleri belirlenmiştir. İnhibitör molekül varlığında uygulanan proteaz uygulamasında, proteazlardan korunduğu düşünülen toplam 13 protein bulunmuştur. Bu proteinlerden 6 tanesi, inhibitör molekül içermeyen kontrol grubu örneklerinin LC-MS analizinde de yer alırken, diğer 7 protein yalnızca inhibitör molekül varlığında görülmüştür. Bu proteinler; Aspartat aminotransferaz, Dış zar protein birleşme faktörü BamB, Kitin bağlayıcı protein, Aspartat semialdehit dehidrojenaz, Glutamin asparajinaz, 5-metilfenazin-1-karboksilat-1-monooksijenaz ve O-süksinilhomoserin sülfhidrilaz proteinleridir. Sonuçlardan 50 ve üzeri LC-MS değeri veren proteinlerin anlamlı sonuç verdiği bilinmektedir. Böylece 50 ve üzeri değer veren bu proteinlerin anlamlı sonuçlar verdiği, yani inhibitör molekülün hedeflediği proteinler olabileceği düşünülmektedir. İnhibitör madde ile etkileşime girerek proteazdan korunan bu proteinlerin *P. aeruginosa* virülansı üzerine etkili olduğu görülmektedir. İnhibitör maddenin asıl moleküler hedefinin ise QTOF skoru en yüksek çıkan ve piyoverdin üretimi üzerine doğrudan etkisi olduğu belirtilen Aspartat aminotransferaz proteini olabileceği düşünülmektedir.

Daha önce hakkında çalışma yapılmamış bu kimyasal maddenin moleküler hedeflerinin belirlenmesi, *P. aeruginosa* virülansı üzerine etkilerinin kanıtlanması bu çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada biyolojik aktif maddelerin moleküler hedef veya hedeflerinin neler olduğuna yönelik veriler olmasına rağmen, keşfedilen kimyasal maddelerin moleküler hedeflerinin ne olduğu, hangi proteinlerle etkileştiği veya hangi mekanizmalara etki ettiği bilgisi sınırlı kalmaktadır. Bu bakımdan bu çalışmanın yeni ilaç adaylarının keşfi ve moleküler hedeflerinin belirlenmesi çalışmalarına katkısı olacaktır. Bu çalışma ayrıca birçok bakterinin antibiyotik direncinin önüne geçebilmek için düşünülen stratejilerden antivirülans terapi üzerine yapılacak bilimsel çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Aachmann, F. Sørli, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. & Vaaje-Kolstad, G. (2012). NMR structure of a lytic polysaccharide monoxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18779-18784.
- Ackerley, D. Caradoc-Davies, T. & Lamont, I. (2003). Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 185(9), 2848-2855.
- Alcorn, J. & Wright, J.R. (2004). Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30871-30879.
- Armstrong, J. W. (1999). A review of high-throughput screening approaches for drug discovery. *Am. Biotechnol. Lab*, 17(1), 26-28.
- Askarian, F., Uchiyama, S., Masson, H., Sørensen, V., Golten, O., Bunæs, A. C., Vaaje-Kolstad, G. (2021). The lytic polysaccharide monoxygenase CbpD promotes *Pseudomonas aeruginosa* virulence in systemic infection. *Nature Communications*, 12(1), 1230. doi:10.1038/s41467-021-21473-0.
- Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., & Hultgren, S. J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 17-27.
- Conlon, B. P., Nakayasu, E. S., Fleck, L. E., LaFleur, M. D., Isabella, V. M., Coleman, K., & Lewis, K. (2013). Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*, 503(7476), 365-370.
- Cornelis, P., & Aendekerk, S. (2004). A new regulator linking quorum sensing and iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 150(4), 752-756.
- Felise, H. B., Nguyen, H. V., Pfuetzner, R. A., Barry, K. C., Jackson, S. R., Blanc, M. P., & Miller, S. I. (2008). An inhibitor of gram-negative bacterial virulence protein secretion. *Cell host & microbe*, 4(4), 325-336.
- Finlayson, E. A., & Brown, P. D. (2011). Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Medical Journal*, 60(1).
- Fogolino, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G., & Patte, J. C. (1995). A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 141(2), 431-439.
- Folders, J., Algra, J., Roelofs, M. S., Van Loon, L. C., Tommassen, J., & Bitter, W. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7044-7052.
- Folders, J., Tommassen, J., Van Loon, L. C., & Bitter, W. (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 182(5), 1257-1263.
- Folschweiller, N., Schalk, I. J., Celia, H., Abdallah, M. A., Pattus, F., & Kieffer, B. (2000). The pyoverdinin receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Membrane Biology*, 17(3).
- Gera, C., & Srivastava, S. (2006). Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. *Current science*, 666-676.
- Govan, J., & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia. *Microbiological reviews* 539.

- Ha, J., Park, H., Park, J., & Park, S. B. (2021). Recent advances in identifying protein targets in drug discovery. *Cell Chemical Biology*, 28(3), 394-423.
- Hadfield, A., Shammass, C., Kryger, G., Ringe, D., Petsko, G. A., Ouyang, J., & Viola, R. E. (2001). Active site analysis of the potential antimicrobial target aspartate semialdehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, 40(48), 14475-14483.
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 654-665.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., & Givskov, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal*, 22(15), 3803-3815.
- Hoang, T. T., Williams, S., Schweizer, H. P., & Lam, J. S. (1997). Molecular genetic analysis of the region containing the essential *Pseudomonas aeruginosa* asd gene encoding aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase. *Microbiology*, 143(3), 899-907.
- Karatuna, O., & Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38(1), 42-51.
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338-344.
- Klein, K., Sonnabend, M. S., Frank, L., Leibiger, K., Franz-Wachtel, M., Macek, B., & Bohn, E. (2019). Deprivation of the periplasmic chaperone SurA reduces virulence and restores antibiotic susceptibility of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 10, 100.
- Knowles, T. J., Scott-Tucker, A., Overduin, M., & Henderson, I. R. (2009). Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 206-214.
- Kim, E. J., Wang, W., Deckwer, W. D., & Zeng, A. P. (2005). Expression of the quorum-sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. *Microbiology*, 151(4), 1127-1138.
- Kimura, Y., Miyake, R., Tokumasu, Y., & Sato, M. (2000). Molecular cloning and characterization of two genes for the biotin carboxylase and carboxyltransferase subunits of acetyl coenzyme A carboxylase in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology*, 182(19), 5462-5469.
- King, A., & Phillips, I. (1978). The identification of pseudomonads and related bacteria in a clinical laboratory. *Journal of Medical Microbiology*, 11(2), 165-176.
- King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate immunity*, 15(5), 261-312.
- Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses*, 36(2), 78-91.
- Lagoumintzis, G., Christofidou, M., Dimitracopoulos, G., & Paliogianni, F. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor κ B and activator protein 1 in human monocytes. *Infection and immunity*, 71(8), 4614-4622.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 7072-7077.

- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*, 10(12), 599-606.
- Lederberg, J., (2000). *Pseudomonas*. *Encyclopedia of Microbiology. Second Edition. Volume 3.*, 2000. p. 876-891. San Diego, USA.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 582-610.
- Lubkowsky, J., Wlodawer, A., Ammon, H. L., Copeland, T. D., & Swain, A. L. (1994). Structural characterization of *Pseudomonas* 7A glutaminase-asparaginase. *Biochemistry*, 33(34), 10257-10265.
- Maeda, T., García-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., Garcia, L. R., Tomás, M., & Wood, T. K. (2012). Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *The ISME journal*, 6(3), 493-501.
- Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A., Thibodeaux, B. A., O'Callaghan, R. J., & Wright, J. R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(2), L409-L418.
- Manos, J., Arthur, J., Rose, B., Tingpej, P., Fung, C., Curtis, M., & Harbour, C. (2008). Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *Journal of medical microbiology*, 57(12), 1454-1465.
- Martis, E. A., Radhakrishnan, R., & Badve, R. R. (2011). High-throughput screening: the hits and leads of drug discovery-an overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (Issue), 02-10.
- Mauldin, P. D., Salgado, C. D., Hansen, I. S., Durup, D. T., & Bosso, J. A. (2010). Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 109-115.
- Maura, D., Ballok, A. E., & Rahme, L. G. (2016). Considerations and caveats in anti-virulence drug development. *Current opinion in microbiology*, 33, 41-46.
- McConkey, B. J., Sobolev, V., & Edelman, M. (2002). The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*, 845-856.
- Meliani, A., & Bensoltane, A. (2015). Review of *Pseudomonas* attachment and biofilm formation in food industry. *Poult. Fish. Wildl. Sci*, 3, 2-7.
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., & Holder, I. A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 64(2), 518-523.
- Mitov, I., Strateva, T., & Markova, B. (2010). Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 588-595.
- Mühlen, S., & Dersch, P. (2015). Anti-virulence strategies to target bacterial infections. *How to overcome the antibiotic crisis*, 147-183.
- Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Reis, C. R., Muntendam, R., Raj, H., Jeronimus-Stratingh, C. M., & Quax, W. J. (2014). PvdP is a tyrosinase that drives maturation of the

- pyoverdine chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 196(14), 2681-2690.
- Nidadavolu, P., Amor, W., Tran, P. L., Dertien, J., Colmer-Hamood, J. A., & Hamood, A. N. (2012). Garlic ointment inhibits biofilm formation by bacterial pathogens from burn wounds. *Journal of medical microbiology*, 61(5), 662-671
- Nouraldin, A. A. M., Baddour, M. M., Harfoush, R. A. H., & Essa, S. A. M. (2016). Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Alexandria Journal of Medicine*, 52(2).
- Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Molecular microbiology*, 45(5), 1277-1287.
- Ortlund, E., Lacount, M. W., Lewinski, K., & Lebioda, L. (2000). Reactions of *Pseudomonas* 7A glutaminase-asparaginase with diazo analogues of glutamine and asparagine result in unexpected covalent inhibitions and suggests an unusual catalytic triad Thr-Tyr-Glu. *Biochemistry*, 39(6), 1199-1204.
- Pai, M. Y., Lomenick, B., Hwang, H., Schiestl, R., McBride, W., Loo, J. A., & Huang, J. (2015). Drug affinity responsive target stability (DARTS) for small-molecule target identification. In *Chemical biology* (pp. 287-298). Humana Press, New York, NY.
- Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.
- Parsons, J. F., Greenhagen, B. T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., & Ladner, J. E. (2007). Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 46(7), 1821-1828.
- Pavlovskis, O. R., Voelker, F. A., & Shackelford, A. H. (1976). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in mice: histopathology and serum enzyme changes. *Journal of Infectious Diseases*, 133(3), 253-259.
- Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., & Saier Jr, M. H. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149(11), 3051-3072.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11229-11234.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 179(10), 3127-3132.
- Pier, G. B., & Ramphal, R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa*, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6. baski" kitabında s. 2587-615. Churchill Livingstone. New York.
- Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 149-161.
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1-52.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H., & Hamood, A. N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infection and immunity*, 67(11), 5854-5862.

- Salyers, A. A., Whitt, D. D., & Whitt, D. D. (1994). *Bacterial pathogenesis: a molecular approach (Vol. 1)*. Washington, DC: ASM press.
- Shaver, C. M., & Hauser, A. R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and immunity*, 72(12), 6969-6977.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860.
- Sırıken, B., & Veli, Ö. *Pseudomonas aeruginosa*: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (18), 42-52.
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888), 552-555.
- Soukarieh, F., Williams, P., Stocks, M. J., & Camara, M. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems as drug discovery targets: Current position and future perspectives. *Journal of medicinal chemistry*, 61(23), 10385-10402.
- Şen, A., & Halkman, A. K. (2006). Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(2), 2-13.
- Tacconelli, E. (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development.
- Takase, H., Nitani, H., Hoshino, K., & Otani, T. (2000). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infection and immunity*, 68(4), 1834-1839.
- Taylor, P. K., Yeung, A. T., & Hancock, R. E. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of biotechnology*, 191, 121-130.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., & Pritchard, D. I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infection and immunity*, 66(1), 36-42.
- Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., & Jahn, D. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4), 282-292.
- Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551.
- Vandenende, C. S., Vlasschaert, M., & Seah, S. Y. (2004). Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 186(17), 5596-5602.
- Vasil, M. L., & Ochsner, U. A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular microbiology*, 34(3), 399-413.
- Ziegler, S., Pries, V., Hedberg, C., & Waldmann, H. (2013). Target identification for small bioactive molecules: finding the needle in the haystack. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(10), 2744-2792.
- Zhu, W. Y., Niu, K., Liu, P., Fan, Y. H., Liu, Z. Q., & Zheng, Y. G. (2021). Identification and Characterization of an O-Succinyl-L-Homoserine Sulfhydrylase From *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*. *Frontiers in chemistry*, 225.

- Wendenbaum, S., Demange, P., Dell, A., Meyer, J. M., & Abdallah, M. A. (1983). The structure of pyoverdine Pa, the siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Tetrahedron Letters*, 24(44), 4877-4880.
- Wiener-Kronish, J. P., & Pittet, J. F. (2011, April). Therapies against virulence products of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. In *Seminars in respiratory and critical care medicine* (Vol. 32, No. 02, pp. 228-235). © Thieme Medical Publishers.
- Wiener-Kronish, J. P., Sakuma, T., Kudoh, I., Pittet, J. F., Frank, D., Dobbs, L. & Matthay, M. A. (1993). Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *Journal of applied physiology*, 75(4), 1661-1669.
- Woods, D. E. (2004). Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends in microbiology*, 12(10), 437-439.
- Xiao, R., & Kisaalita, W. S. (1997). Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine.



ÖZ GEÇMİŞ

Esra UYANIK, Samsun Tülay Başaran Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2018 yılında mezun oldu. 2019 yılında OMÜ LEE Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Mezuniyetinden bu yana TÜBİTAK araştırmacısı olarak görev yapan Esra Uyanık iyi derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0001-6623-0499

Yayımlar:

1. Uyanık E., Kul Ç. S., Çağlar N., Doruk T., New Small Molecule Inhibits Pyoverdinin Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Congress 30 June - 2 July, 2022. Belgrade/SERBIA

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. TÜBİTAK 3501 Kariyer Geliştirme Programı, 119Z837 nolu '*Pseudomonas aeruginosa*'da Pyoverdinin Üretimini Engelleyen Bir İnhibitörün Moleküler Hedefinin Belirlenmesi, Molekülün ve Hedefinin *Pseudomonas aeruginosa*'nın Virulansı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi' projesinde bursiyer