



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***CHRY SOPHANOL MOLEKÜLÜNÜN IN SILIKO VE IN
VITRO ORTAMDA PSEUDOMONAS AERUGINOSA
QUORUM SENSING MEKANİZMASI VE BİYOFİLM
FORMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ***

AYLA YILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. N. Cenk SESAL

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Serdar DURDAĞI

İSTANBUL, 2020



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***CHRYSOPHANOL MOLEKÜLÜNÜN IN SILIKO VE IN
VITRO ORTAMDA PSEUDOMONAS AERUGINOSA
QUORUM SENSİNG MEKANİZMASI VE BİYOFİLM
FORMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ***

AYLA YILDIZ

520117013

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. N. Cenk SESAL

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Serdar DURDAĞI

İSTANBUL, 2020



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES



**DETERMINATION OF THE EFFECTS OF
CHRY SOPHANOL ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
QUORUM SENSING MECHANISM AND BIOFILM
FORMATION VIA *IN VITRO* AND *IN SILICO*
METHODS**

AYLA YILDIZ

520117013

MASTER THESIS

Department of Biology

Thesis Supervisor

Assoc. Prof. Dr. Nüzhet Cenk SESAL

Thesis CO- Supervisor

Prof. Dr. Serdar DURDAĞI

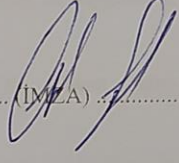
ISTANBUL, 2020

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

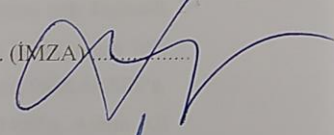
Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Ayla YILDIZ'ın "Chrysophanol Molekülünün *in siliko* ve *in vitro* Ortamda *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Mekanizması ve Biyofilm Formu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması, 07 Temmuz 2020 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

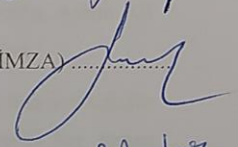
Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL (Danışman)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Prof. Dr. Serdar DURDAĞI (Eş-Danışman)

Bahçeşehir Üniversitesi (İMZA) 

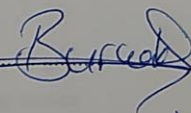
Doç. Dr. Suzan ABDURRAHMANOĞLU (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Dr. Öğr. Üyesi Didem BERBER (Üye)

Maltepe Üniversitesi (İMZA) 

Dr. Öğr. Üyesi Burçak GÜRBÜZ (Üye)

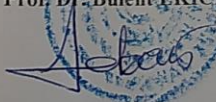
Marmara Üniversitesi (İMZA) 

O N A Y

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/07/2020 tarih ve 2020/16-02 sayılı kararı ile Ayla YILDIZ'ın Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ




TEŞEKKÜR/ ACKNOWLEDGMENT

Lisans eğitimimin son yılında yollarımızın kesiştiği ve yüksek lisans eğitimime kendisiyle devam ettiğim çok değerli danışmanım Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL'a,engin bilgi ve deneyimlerini esirgmeden paylaşılarak yoluma ışık tuttuğu ve beni her zaman desteklediği için en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Rehberliği, bilgisi ve önerileriyle bilgi birikimimi ve deneyimimi arttırmama yardımcı olan, akademik hayatıma yeni bir bakış açısı ile yön veren çok değerli eş danışmanım Prof. Dr. Serdar DURDAĞI'na en derin teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvarlarında deneylerimi yapmamı sağlayan Doç. Dr. Bülent Oktay AKKOYUNLU ve Doç. Dr. Murat ERDEM'e teşekkür ederim.

Yaşadığım tüm süreçlerde bir elini daima omzumda hissettiğim, çok kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Didem BERBER'e tüm samimiyetiyle bana kucak açtığı için teşekkür ederim. Deneyimlerini ve tecrübelerini içtenlikle paylaşan Barış GÖKALSIN'a, dostluğunu hissettiğim değerli arkadaşlarım Tunahan Irmak BAŞARAN'a, Arhun Ali BALKAN'a, Elif MURCAK'a ve tüm SesalLab üyelerine teşekkür ederim.

Bu süreçte gerek her şeyi sıfırdan ama içtenlikle öğreten gerekse tüm dostluğuyla yanımda olan Busecan AKSOYDAN'a; bilgi birikimi ve bakış açısıyla her zaman yanımda olan İsmail EROL'a ve bu süreçte bana rehberlik eden Dr. Öğr. Üyesi Berna DOĞAN'a teşekkür ederim. Tüm DurdağıLab üyelerine tüm nazikliği, içtenliği ve arkadaşlığı için çok teşekkür ederim.

Hayatımın tüm evrelerinde desteği ve güçlü sevgisiyle arkamda koca bir çınar gibi duran aileme, yolumdaki taşları kaldıran yol arkadaşım Zihni Can YILDIZ'a; her zaman eksik yanımlı tamamlayan canparçam Aynur YILDIZ'a; hayatımda tanıdığım en güçlü kadın olarak bu mücadelemi tamamlamama yardım ettiği için canım annem İnci YILDIZ'a ve kanatları altındayken her zaman güvende hissettiren ve daima destediğini hissettiğim canım babam Sinan YILDIZ'a en içten minnetlerimi sunarım.

Temmuz 2020

AYLA YILDIZ

İÇİNDEKİLER	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SEMBOLLER	ix
KISALTMALAR	x
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
TABLO LİSTESİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Antibiyotik Direnci	2
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Klinik Önemi	3
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Bakteriyel İletişim (Quorum Sensing-Salt Çoğunluğu Algılama)	4
1.4. Quorum Sensing İnhibisyonu: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İle Mücadelede Alternatif Yaklaşım	7
1.5. Bilgisayar Destekli Yaklaşımlar (Computer Based Approaches- Virtual Screenings- Bilgisayar Tabanlı Sanal Tarama)	8
1.5.1. Homoloji Modelleme	12

1.5.2. SWISS MODEL	14
1.6. <i>Chrysophanol</i> Molekülünün Farmakolojik Önemi	18
2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. <i>In siliko</i>	19
2.1.1.1. Kullanılan Donanımlar	19
2.1.1.2. Kullanılan Yazılımlar	19
2.1.1.3. Kullanılan Veribankaları	19
2.1.2. <i>In vitro</i>	19
2.1.2.1. Bakteri Suşları	19
2.1.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar	20
2.1.2.3. Kullanılan Cihazlar	21
2.1.2.4. Besiyerlerinin Hazırlanması	22
2.1.2.5. Kimyasalların Hazırlanması	23
2.2.Yöntem	24
2.2.1. <i>In siliko</i>	24
2.2.1.1. MetaCore/MetaDrug Analizi	24
2.2.1.2. <i>Chrysophanol</i> Molekülünün Üç Boyutlu Yapısının Hazırlanması	25

2.2.1.3. <i>P. aeruginosa</i> Quorum Sensing Sistemi ve Biyofilm Oluşumu Mekanizmasında Rol Oynayan Proteinlerin Üç Boyutlu Yapılarının Hazırlanması	26
2.2.1.4. RhlR ye ait Homoloji Model Oluşturulması	26
2.2.1.5. Proteinlerin Aktif Bölgelerinin Belirlenmesi	27
2.2.1.6. Moleküler Kenetlenme Simülasyonları	29
2.2.1.7. Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları	29
2.2.1.8. Moleküler Mekanik / Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı (MM / GBSA) Analizleri	30
2.2.2. <i>In vitro</i>	30
2.2.2.1. Bakteri Suşlarının Temini, Saklanması ve Çoğaltılması	30
2.2.2.2. Bakteri Suşlarının Uygulanacak Yoğunluklarının Belirlenmesi	31
2.2.2.3. <i>Chrysophanol</i> 'ün QSI Etkilerinin Belirlenmesi	31
2.2.2.4. <i>Chrysophanol</i> 'ün <i>P. aeruginosa</i> Biyofilm Formu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	32
2.2.2.5. <i>P. aeruginosa</i> 'ya Ait Virülans Faktörlerin İnhibisyonu	33
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	35
3.1. Bulgular	35

3.1.1. Metacore/MetaDrug Analizleri	35
3.1.2. Ligandların Hazırlanması	37
3.1.3. RhlR ye Ait Homoloji Model Oluşturulması	40
3.1.4. <i>Chrysophanol</i> 'ün las Sistemi Üzerine <i>in siliko</i> ve <i>in vitro</i> Analizi	43
3.1.4.1. Moleküler Kenetlenme	43
3.1.4.2. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları	46
3.1.4.3. MM/GBSA Analizleri	67
3.1.4.4. <i>lasB-gfp</i> suşu Üzerindeki Anti-QS Aktivitesi	69
3.1.4.5. Elastaz ve Proteaz Üretimine Etkisi	70
3.1.5. <i>Chrysophanol</i> 'ün rhl Sistemi Üzerine <i>in siliko</i> ve <i>in vitro</i> Analizi	70
3.1.5.1. Moleküler Kenetlenme	70
3.1.5.2. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları	72
3.1.5.3. MM/GBSA Analizleri	83
3.1.5.4. <i>rhlA-gfp</i> Suşu Üzerindeki Anti-QS Aktivitesi	84
3.1.6. <i>Chrysophanol</i> 'ün pqs Sistemi Üzerine <i>in siliko</i> ve <i>in vitro</i> Analizi	84
3.1.6.1. Moleküler Kenetlenme	84
3.1.6.2. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları	86

3.1.6.3. MM/GBSA analizleri	98
3.1.6.4. <i>pqsA-gfp</i> Suşu Üzerindeki Anti-QS Aktivitesi	99
3.1.6.5. Piyosiyanin Üretimine Etkisi	100
3.1.7. <i>Chrysophanol</i> 'ün PAO1 Üzerindeki Antibiyofilm Etkisi	101
3.2. Tartışma	104
3.2.1. LasI/R Sistemine <i>Chrysophanol</i> Molekülünün <i>in siliko</i> ve <i>in vitro</i> Etkisi	106
3.2.2. RhlR sistemine <i>Chrysophanol</i> Molekülünün <i>in siliko</i> ve <i>in vitro</i> Etkisi	113
3.2.3. PqsR sistemine <i>Chrysophanol</i> Molekülünün <i>in siliko</i> ve <i>in vitro</i> Etkisi	116
3.2.4. <i>Chrysophanol</i> Molekülünün Antibiyofilm Etkisi	119
4. SONUÇLAR	122
KAYNAKLAR	124
EKLER	144
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

CHRYSOPHANOL MOLEKÜLÜNÜN *IN SILIKO* VE *IN VITRO* ORTAMDA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING MEKANİZMASI VE BİYOFİLM FORMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Pseudomonas aeruginosa, ürettiği virülans faktörler ile akut ve kronik enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. Gelişen antibiyotik direnç mekanizmalarıyla *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde başarısız olunması virülans faktör mekanizmalarını hedefleyen yeni stratejiler geliştirilmesine önem kazandırmaktadır. Biyofilm oluşumunun ve virülans faktör üretiminin QS mekanizmasıyla kontrol edebildiği bilinmektedir.

Bu çalışmada, *Chrysophanol* molekülünün *P. aeruginosa* sensör suşları kullanılarak anti-QS etkisi; PAO1 yabanıl tip suşu kullanılarak antibiyofilm ve antivirülans etkisi incelenmiştir. Ayrıca *in siliko* olarak *P.aeruginosa* 'ya ait QS sinyal mekanizmasında görevli proteinler ile moleküler kenetlenme gibi çeşitli simülasyonlar gerçekleştirilmiştir. RhlR reseptörüne ait yapı homoloji modelleme ile elde edilmiştir. Moleküler kenetlenme ile bağlanma enerjisi en düşük olarak hesaplanan ve istenilen aminoasit bağlantılarını içeren protein-ligand kompleksleri alınarak moleküler dinamik simülasyonlarına tabi tutulmuş ve MM-GBSA metoduyla bağlanma serbest enerjileri hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak her proteinin kendi endojen agonisti ve QSI etkisi bilinen *Penicillic acid* molekülü kullanılmıştır. *Chrysophanol*, 135.8 μM 'lik ilk dozunda *lasB-gfp*, *rhlA-gfp* ve *pqsA-gfp* suşlarında sırası ile % 52.6, % 20.1 ve % 73.1 oranında inhibisyon belirlenmiştir. Aynı dozda antibiyofilm etkisi % 43.8 ve antivirülans özelliği piyosiyaninde % 96.4, elastazda % 88.3 ve proteazda %52.3'dür. Moleküler kenetlenme ve moleküler dinamik simülasyonlarında LasI, LasR ve PqsR sistemlerinde molekülün etkinliğinin başarılı ve stabilitesinin kararlı olduğu belirlenmiştir. *In vitro* inhibisyonlar göz önüne alındığında *in siliko* ve *in vitro* çalışmaların birbirleriyle tutarlı olduğu görülmüştür. *Chrysophanol* molekülün antivirülans ve QSI özelliğinin *in vitro* olarak belirlenmesi ve LasI, LasR, PqsR ve RhlR reseptörlerine ait detaylı *in siliko* hesaplamaların bu çalışmada yapılması ile literatüre katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF *CHRYSOPHANOL* ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* QUORUM SENSING MECHANISM AND BIOFILM FORMATION VIA *IN SILICO* AND *IN VITRO* METHODS

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes acute and chronic virulence associated infections. Developing antibiotic resistance mechanisms causes failure to treat *P.aeruginosa* infections. Consequently, new approaches are aimed at reducing virulence factors.

In this study, the anti-QS effect of *Chrysophanol* using *P. aeruginosa* sensor strains, antibiofilm and antivirulence effect using wild type strain PAO1 were investigated *in vitro*. Molecular docking simulations were carried out with proteins involved in the QS signaling mechanism of *P. aeruginosa*. The structure of the RhlR receptor was obtained by homology modeling. Protein-ligand complexes with the lowest binding energy and containing the desired amino acid connections were subjected to long molecular dynamics simulations and MM-GBSA free energies were calculated.

In the first dose of 135.8 μ M of *Chrysophanol*, inhibition of *lasB-gfp*, *rhlA-gfp* and *pqsA-gfp* strains was 52.6%, 20.1% and 73.1%, respectively. The same dose of antibiofilm effect is 43.8% and the antivirulence feature is 96.4% in ptyrosinase, 88.3% in elastase and 52.3% in protease. Each protein has its endogenous agonist and the *Penicillic acid* molecule known for its QSI effect is used as a positive control. Our simulations indicated that the effectiveness of the molecule is successful and its stability is stable in QS systems. Considering *in vitro* inhibition, *in silico* and *in vitro* studies were found to be consistent with each other. It is thought that the antivirulence and QSI property of *Chrysophanol* is determined *in vitro* and detailed *in silico* calculations of each receptors will contribute to the literature.

SEMBOLLER/ SYMBOLS

%	:Yüzde
°C	:Santigrat Derece
g	:Gram
mg	:Miligram
µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
L	:Litre
M	:Molar
mM	:Milimolar
µl	:Mikrolitre
Å	:Angstrom
pKa	:Asit Ayrıştırma Sabiti
ΔG	:Serbest Bağlanma Enerjisi
ns	:Nanosaniye
ps	:Pikosaniye
φ	:Phi
ψ	:Psi
ω	:Omega
NaCl	:Sodyum Klorür
HCl	:Hidroklorik Asit
MgSO ₄	:Magnezyum Sülfat
CaCl ₂	:Kalsiyum Klorür
NaOH	:Sodyum Hidroksit
MgCl ₂	:Magnezyum Klorür

KISALTMALAR/ ABBREVIATIONS

2B	:2 Boyutlu
3B	:3 Boyutlu
3-oxo-C12-HSL	: N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserin Lakton
C4-HSL	: N-bütiril Homoserin Lakton
AI	:Autoinducer (Otoindüktör)
AI-1	: Autoinducer-1 (Otoindüktör-1)
AI-2	: Autoinducer-2 (Otoindüktör-2)
AIP	:Otoindüktör Peptid
ALA	:Alanin
ARG	:Arjinin
ASN	:Asparajin
ASP	:Aspartik Asit
CADD	: Computer Aided Drug Design (Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı)
CDC	:Center of Diseases Control (Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi)
CYS	:Sistein
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
ECDC	:European Center of Diseases Disease Prevention and Control (Avrupa Sağlık Önleme ve Kontrol Merkezi)
ECR	:Elastin Kongo Kırmızısı
eDNA	:Extracellular DNA (Hücre dışı DNA)
EPS	:Extra Polimeric Substance (Hücre Dışı Polimerik Madde)
FDA	:Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)

MM/GBSA	:Generalized Born Surface Area (Moleküler Mekanik / Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı)
GLN	:Glutamin
GLU	:Glutamik Asit
GLY	:Glisin
H-Bağı	:Hidrojen Bağı
HHQ	:2-heptil-3-hidroksi-4-(1H)-kinolon
HIS	:Histidin
HTVS	:Yüksek-Çıktılı Sanal Tarama (High Throughput Virtual Screening)
IFD	: Uyarlanmış Uyum Kenetleme (Induced Fit Docking)
ILE	:İzolösin
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KF	:Kistik Fibrosis
LBDD	:Ligand Based Drug Design (Ligand Bazlı İlaç Tasarımı)
LEU	:Lösin
LYS	:Lizin
MD	:Moleküler Dinamik (Molecular Dynamics)
MDR	:Multi Drug Resistant (Çoklu İlaç Dirençli)
NIH	: National Institute of Health (ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü)
NCBI	:National Center for Biotechnology Information
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans
NNQ	: 2-nonylquinolin-4(1H)-one
OPLS	:Optimized Potential for Liquid Simulations
PA	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PDB	:Protein Veri Bankası (Protein Data Bank)
PHE	:Fenilalanin
Pqs	: <i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal (<i>Pseudomonas</i> Kinolon Sinyali)
PRO	:Prolin
RFU	: Göreli Floresans Birimleri (Relative Fluorescence Unit)
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
UV	:Ultraviyole
vdW	:Van der Waals
QPLD	:Kuantum-Polarize Ligand Kenetleme (Quantum Polarized Ligand Docking)
QS	:Quorum Sensing (Salt Çoğunluğu Algılama)
QSAR	: Quantitative Structure Activity Relationship (Nicel Yapı Etkinlik İlişkisi)
QSI	:Quorum Sensing Inhibitorü
QZN	: 3-amino-7-chloro-2-nonylquinazolin-4(3H)-one
QQ	:Quorum Quenching
RMSD	:Root Mean Square Deviation (Kök Ortalama Kare Sapması)
RMSF	:Root Mean Square Fluctuation (Kök Ortalama Kare Dalgalanması)
SAM	:S-adenosyl-Methionine
SBDD	:Structure Based Drug Design (Yapı Bazlı İlaç Tasarımı)
SER	:Serin
SP	:Standard Presicion (Standar Hassasiyet)
THR	:Treonin
TRP	:Tryptofan

TYR	:Tirozin
VAL	:Valin
VMD	: Visual Molecular Dynamics (Görsel Moleküler Dinamik)
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
XDR	:Aşırı İlaç Dirençli
XP	:Extra Precision (Extra Hassasiyet)



ŞEKİL LİSTESİ	SAYFA
Şekil 1.1. Homoloji modelleme aşamaları (Cavasotto ve Phatak, 2009)	14
Şekil 1.2. Swiss-Model verilerinin yorumlanması	16
Şekil 3.1. SWISS-MODEL'de modellenen RhlR'ye reseptörüne ait kalite verileri	40
Şekil 3.2. Homoloji modellemesinden türetilen RhlR protein yapısının ramachandran grafiği A. Genel B. Glisin C.Prolin D. Pre-Prolin	41
Şekil 3.3. RhlR'ye ait referans yapı ve homoloji model için yapılan son 250 ns uzun MD RMSD/Zaman(ns) grafiği	42
Şekil 3.4. RhlR'ye ait referans yapı ve homoloji model için yapılan son 250 ns uzun simülasyonun RMSD/Zaman(ns) grafiği	42
Şekil 3.5. 1RO5 reseptörünün aktif bölgesi ve ilgili aminoasitler	43
Şekil 3.6. 2UV0 reseptörü ve endojen ligandın bulunduğu hidrofobik cep	44
Şekil 3.7. 1RO5 proteini ile A. <i>penicillic acid</i> , B. 3-oxo-C12-HSL, C. <i>Chrysophanol</i> komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı	45
Şekil 3.8. 2UV0 proteini ile A. <i>chrysophanol</i> , B. <i>penicillic acid</i> , C. 3-oxo-C12-HSL komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı	46
Şekil 3.9. 1RO5- ligand komplekslerinin 250 ns simülasyon boyunca konformasyonel değişiklikleri	47
Şekil 3.10. 1RO5- 3-oxo-C12-HSL kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	48
Şekil 3.11. 1RO5- <i>chrysophanol</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	48
Şekil 3.12. 1RO5- <i>penicillic acid</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	49
Şekil 3.13. 1RO5 (LasI) Protein RMSD/zaman (ns) grafiği	50

Şekil 3.14. 1RO5 (LasI) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği	51
Şekil 3.15. 1RO5 adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ Time (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği	52
Şekil 3.16. 1RO5 adlı proteine ait RMSF/Rezidü Numarası grafiği	53
Şekil 3.17. 1RO5- <i>chrysophanol</i> kompleksine ait protein ligand histogramı	54
Şekil 3.18. 1RO5-3- <i>oxo-C12-HSL</i> kompleksine ait protein ligand histogramı	55
Şekil 3.19. 1RO5- <i>penicillic acid</i> kompleksine ait protein ligand histogramı	56
Şekil 3.20. LasR-ligand komplekslerine ait 0-125-250 nanosaniye görüntüleri	57
Şekil 3.21. 2UV0-3- <i>oxo-C12-HSL</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüler	58
Şekil 3.22. 2UV0- <i>chrysophanol</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	58
Şekil 3.23. 2UV0- <i>penicillic acid</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	59
Şekil 3.24. 2UV0 (LasR) Protein RMSD/zaman (ns) grafiği	60
Şekil 3.25. 2UV0 (LasR) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği	61
Şekil 3.26. 2UV0 (LasR) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ Time (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği	62
Şekil 3.27. 2UV0 (LasR) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSF(Å)/Rezidü Numarası değerlerine bağlı olan Protein-RMSF grafiği	63
Şekil 3.28. 2UV0- <i>chrysophanol</i> kompleksine ait protein ligand histogramı	64
Şekil 3.29. 2UV0- 3- <i>oxo-C12-HSL</i> kompleksine ait protein ligand histogramı	65
Şekil 3.30. 2UV0- <i>penicillic acid</i> kompleksine ait protein ligand histogramı	66

Şekil 3.31. LasI protein ve ligand komplekslerine ait MMGBSA grafikleri	67
Şekil 3.324. LasR protein ve ligand komplekslerine ait MMGBSA grafikleri	68
Şekil 3.33. 135,8 μ M, 67,9 μ M ve 33,9 μ M konsantrasyonlarındaki <i>chrysophanol</i> çözeltisinin <i>P. aeruginosa lasB-gfp</i> suşu QS mekanizmasının inhibisyona ait RFU/OD grafiği. Kontrol grubuna <i>chrysophanol</i> çözeltisi eklenmemiştir.	69
Şekil 3.34. <i>Chrysophanol</i> çözeltisinin 135,8 μ M dozuna ait elastaz (OD495nm) ve proteaz (OD600nm) üretimine ait OD ölçümleri grafiği. Kontrol grubuna <i>Chrysophanol</i> çözeltisi eklenmemiştir.	70
Şekil 3.35. RhlR reseptörünün aktif bölgesi ve ilgili rezidüler	71
Şekil 3.36. RhlR proteini ile A. <i>chrysophanol</i> , B. <i>penicillic acid</i> , C. <i>C4-HSL</i> komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı	72
Şekil 3.37. RhlR-ligand komplekslerine ait 0-125-250 nanosaniye görüntüleri	73
Şekil 3.38. RhlR- <i>C4-HSL</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	73
Şekil 3.39. RhlR- <i>chrysophanol</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	74
Şekil 3.40. RhlR- <i>penicillic acid</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	75
Şekil 3.41. RhlR yapısına ait homoloji modelin RMSD/ zaman (ns) grafiği	76
Şekil 3.42. RhlR'ye ait protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği	77
Şekil 3.43. RhlR'ye ait protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği	78
Şekil 3.44. RhlR homoloji modeline ait RMSF/Rezidü Numarası grafiği	79
Şekil 3.45. RhlR homoloji model- <i>chrysophanol</i> kompleksine ait protein-ligand histogramı	80

Şekil 3.46. RhlR homoloji model- <i>C4-HSL</i> kompleksine ait protein-ligand histogramı	81
Şekil 3.47. RhlR homoloji model- <i>penicillic acid</i> kompleksine ait protein-ligand histogramı	82
Şekil 3.48. RhlR protein ve ligand komplekslerine ait MM/GBSA grafikleri	83
Şekil 3.49. 135,8 μ M, 67,9 μ M ve 33,9 μ M konsantrasyonlarındaki <i>chrysophanol</i> çözeltisinin <i>P. aeruginosa rhlA-gfp</i> suşu QS mekanizmasının inhibisyonu ait RFU/OD grafiği. Kontrol grubuna <i>chrysophanol</i> çözeltisi eklenmemiştir.	84
Şekil 3.50. 4JVI reseptörünün aktif bölgesi ve ilgili rezidüleri	85
Şekil 3.51. 4JVI proteini ile A. <i>chrysophanol</i> , B. <i>QZN</i> , C. <i>NNQ</i> ve D. <i>penicillic acid</i> komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı	86
Şekil 3.52. PqsR-ligand komplekslerine ait 0-125-250 nanosaniye görüntüleri	87
Şekil 3.53. 4JVI-agonist (<i>NNQ</i>) kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	88
Şekil 3.54. 4JVI-antagonist (<i>QZN</i>) kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	88
Şekil 3.55. 4JVI- <i>chrysophanol</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	89
Şekil 3.56. 4JVI- <i>penicillic acid</i> kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri	89
Şekil 3.57. PqsR'ye ait Protein-RMSD grafiği	90
Şekil 3.58. PqsR'ye ait protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği	91
Şekil 3.59. PqsR proteinine ait ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ Time (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği	92
Şekil 3.60. PqsR proteinine ait RMSF/Rezidü Numarası grafiği	93

Şekil 3.61. PqsR- <i>chrysophanol</i> kompleksine ait protein ligand histogramı	94
Şekil 3.62. PqsR- <i>NNQ</i> (agonist) kompleksine ait protein-ligand histogramı	95
Şekil 3.63. PqsR- <i>QZN</i> (antagonist) molekülüne ait protein-ligand histogramı	96
Şekil 3.64. PqsR- <i>penicillic acid</i> molekülüne ait protein-ligand histogram	97
Şekil 3.65. PqsR protein ve ligand komplekslerine ait MM/GBSA grafikleri	98
Şekil 3.66. 135,8 μ M, 67,9 μ M ve 33,9 μ M konsantrasyonlarındaki <i>chrysophanol</i> çözeltisinin <i>P. aeruginosa pqsA-gfp</i> suşu QS mekanizmasının inhibisyona ait RFU/OD grafiği. Kontrol grubuna <i>chrysophanol</i> çözeltisi eklenmemiştir.	99
Şekil 3.67. <i>Chrysophanol</i> 'ün 135,8 μ M dozunun OD520nm'de piyosiyanin üretimine etkisi. Kontrol grubuna <i>chrysophanol</i> çözeltisi eklenmemiştir.	100
Şekil 3.68. 135,8 μ M, 67,9 μ M ve 33,9 μ M konsantrasyonlarındaki <i>chrysophanol</i> çözeltisinin <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşu üzerine biyofilm (OD-590nm) inhibisyonu grafiği. Kontrol grubuna <i>chrysophanol</i> eklenmemiştir.	101

TABLO LİSTESİ/ LIST OF TABLES	SAYFA
Tablo 1.1. Homoloji modelleme sunucuları	13
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan suşlar	31
Tablo 3.1. <i>Chrysophanol</i> ve <i>penicillic acid</i> moleküllerinin toksik etkilerinin tahmini verileri	35
Tablo 3.2. <i>Chrysophanol</i> ve <i>penicillic acid</i> moleküllerinin terapötik etkilerinin tahmini verileri	36
Tablo 3.3. <i>Chrysophanol</i> , agonist ve antagonist moleküllerin 2 boyutlu yapıları (PubChem)	38
Tablo 3.4. LasI ve LasR proteinlerine ait moleküler kenetlenme skorları	44
Tablo 3.5. A. LasI, B. LasR, C. PqsR ve D. RhlR reseptörleri ve ligandlara ait kenetlenme skoru, MD analizlerinin ve MM/GBSA analizlerinin ortalama değerleri	102
Tablo 3.6. <i>Chrysophanol</i> molekülünün in vitro deneylerine ait yüzde inhibisyon verileri	103

1. GİRİŞ

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisindeki birincil problem, antibiyotiklerin yanlış veya eksik kullanımlarına bağlı olarak bakterilerin antibiyotiklere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmesi ve bu sebeple bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin tedavide yetersiz kalması olarak bilinmektedir. Artan antibiyotik direnci ile fırsatçı patojenlerin yaygınlaşması sonucu insan sağlığı ciddi problemlerle karşı karşıya kalmaktadır (Neufeld ve ark., 2017). Epidemiyolojik çalışmalar, antibiyotik tüketimi ile dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkması ve yayılması arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermektedir (Ventola, 2015). Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (Center for Disease Control, CDC) verilerine göre, ABD'de çoklu antibiyotik direncine sahip bakteri kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle her yıl en az 23.000 kişinin doğrudan, çok daha fazlasının ise antibiyotik dirençli enfeksiyonlar sebebiyle dolaylı yoldan öldüğü belirtilmektedir (CDC, 2013). Avrupa Sağlık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne (European Center for Disease Prevention and Control, ECDC) göre Avrupa'da bakteri kaynaklı enfeksiyonların 25000'inin antibiyotik direnci sebebiyle ölümle sonuçlandığını bildirmektedir. ECDC verilerine göre Avrupa'da bakteriyel enfeksiyon kaynaklı sağlık problemleri nedeniyle yılda 15 milyar Euro, CDC verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 35 milyar dolar kayıp meydana gelmektedir.

Buna ek olarak her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde 51.000 kişi *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonu geçirmektedir. 6.000'den fazlası (%13) çoklu ilaç direncine maruz kalmakta olup, her yıl *P. aeruginosa* enfeksiyonu sebebiyle 400'den fazla kişi hayatını kaybetmektedir (Mungroo ve ark., 2016). *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma ve virülans faktörleri üretme özelliği ile antibiyotik direnci geliştirmesi ve sebep olduğu enfeksiyonun kronikleşmesi dolayısıyla klinik açıdan önemli bir patojen haline gelmektedir.

ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, çoğu enfeksiyonun %65 ila %80'inin biyofilmler tarafından kaynaklandığını belirtmektedir (Lewis, 2007; Grandclément ve ark., 2016). *P. aeruginosa*'nın patojenezini, yapışmayı düzenleyen ve/veya konakçı hücre sinyal yollarını kesen birkaç bakteriyel virülans faktörü tarafından kontrol edilmektedir

(Valentini ve ark., 2017). *P. aeruginosa* hücresel (flagella, pili, lektinler, aljinat/biyofilm ve lipopolisakkarid) ve hücre dışı (proteazlar, hemolizinler, sitotoksin, piyosianin, sideroforlar, ekzotoksin A, ekzoenzim S ve ekzoenzim U) virülans faktörleri üretmektedir (Strateva ve Mitov, 2011). Biyofilm oluşumunun ve birçok virülans faktör üretiminin Quorum sensing (QS) mekanizması ile bağlantılı bir süreç olduğu bilinmektedir (Kalia ve ark., 2013).

1.1. Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler geçmişten bu yana bakteri kaynaklı enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan terapötik ilaçlardır (Defoirdt, 2018). Patojenik bakterilerin geleneksel olarak kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmesi dünya çapında bir sağlık problemi haline gelmiştir. Ayrıca potansiyel direnç mekanizmalarıyla (mutasyonlar, konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyon gibi) bakterilerin kazandığı antibiyotik direnci, nesiller boyunca aktarılmaktadır (Sommer ve ark., 2017). Aşırı ve/veya kontrolsüz antibiyotik kullanımına bağlı olarak çoklu ilaca dirençli (MDR) ve aşırı ilaca dirençli (XDR) bakteri suşları ortaya çıkmıştır. Bu dirençli bakterilerin prevalansındaki artış, klinikte geleneksel antibiyotiklerin etki mekanizmalarının sınırlandırılmasına veya kaybına neden olmaktadır (Banin ve ark., 2017). Bu durumun sağlık alanında artan ölümlere ve büyük ekonomik kayıplara sebep olacağı bildirilmiştir. Ancak, antibiyotik direncinin artışına engel olmak imkansız gibi görünmektedir, çünkü hali hazırda günümüzde kullanılan ilaçlar uzun vadeli bir etkinlik beklenmeksizin önceden keşfedilen antibiyotiklerin modifikasyonlarıdır. Yeterli terapötik aktiviteye, farmakokinetik dinamiğe ve güvenilirliğe sahip yeni antibiyotik sınıflarının keşfinin, katı düzenlemeler ve ekonomik sorunlar nedeniyle zorlaşması (Wright, 2017) yeni tedavi stratejilerine olan ihtiyacı arttırmıştır. ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC), ABD'de ilaç direnci ve yetersiz kalan tedavi yöntemlerinden ötürü 2013 yılında ortalama 23.000 ölüm meydana geldiğini ve ayrıca antibiyotik direncine bağlı olarak görülen enfeksiyonların tedavisi için yılda yaklaşık 20 milyar dolar harcadığını açıklamıştır. Yine 2013 yılında, antibiyotik direnci nedeniyle Hindistan'da 58.000'den fazla bebeğin öldüğü bildirilmiştir (Rather ve ark., 2017). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yeni antibiyotik sınıflarına duyulan acil ihtiyacı vurgulayarak patojenler için kritik, yüksek ve orta düzey olarak kategorize

edilen antibiyotik öncelikleri listesi yayınlamıştır. Bu listeye göre, *P. aeruginosa* yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesi noktasında kritik bir önceliğe sahiptir (Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2017). CDC verilerine göre, ABD’de her yıl görülen 51.000 *P. aeruginosa* enfeksiyonunun 6.000’den fazlasının (%13) çoklu ilaç direnci nedeniyle ortaya çıktığı ve bu enfeksiyonların 400’ünün ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Bu nedenle, geleneksel olmayan ve yeni keşfedilecek antibiyotik bileşiklerin keşfine olan ihtiyaç mühimdir. Bu pencereden bakıldığında, araştırmacılar antibiyotik benzeri etken maddelerin doğal ürünlerden elde edilebileceğine inanmaktadırlar. Ancak, ilaç keşif sürecinde; ilaç boyutu, etik kaygılar, geniş spektrumda etkinlik ve toksik olmama gibi dikkat edilmesi gereken sıkı kriterler bulunmaktadır.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*’nın Klinik Önemi

Pseudomonas aeruginosa, toprak, deniz suyu, tatlı su, bitki, hayvan, ev ve hastane gibi çeşitli ortamlarda koloni oluşturabilen aerobik ve Gram negatif bir bakteridir. Eğlence, tedavi, spor gibi birçok nedenle insanlar arasında sık kullanılan yüzme havuzları, kaplıcalar ve jakuziler halk sağlığı açısından ciddi riskler taşımaktadırlar (Mena ve Gerba, 2009). Ayrıca *P. aeruginosa* salgınlarının kaplıcalarda, jakuzilerde ve sıcak su kuyetlerinde görülme sıklığının diğer organizmalara oranla yüksek olduğu bildirilmiştir. Su kaynaklı hastalıklardan korunmak için yapılan klor uygulamasının, klora dirençli patojenlerin çoğalmasını engelleyemediği ve dezanfeksiyon yan ürünlerinin (DBP) oluşumuna bağlı olarak kanserojenite gibi sağlık riskleri taşıdığı bildirilmiştir (Yeh ve ark., 2014; Cheema ve ark., 2017). Ayrıca, *P. aeruginosa*’nın <1 mg/L kalıntı klor seviyelerinde bile tüm yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabilme kabiliyetine sahip olduğu bildirilmektedir (Guida ve ark., 2016).

CDC ve ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) beyannamesine göre, ABD’deki tüm hastane enfeksiyonlarının sırasıyla % 65’i ve % 80’i bakteri biyofilmleri ile ilişkilidir (Joo ve Otto, 2012). Ancak, çoğunlukla biyofilm oluşumlarına bağlı enfeksiyon geçiren hastalarda klinik uygulamadaki tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Bu bakterilerin biyofilm formlarının planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Olson ve ark., 2002). Yüzme havuzlarında oluşan biyofilm tabakasının

ortadan kaldırılabilmesi için dezenfektan olarak kullanılan klorun normal değerinden 3000 kat fazla kullanıldığında etkili olduğu bildirilmiştir (Kekeç ve ark., 2016). Klor uygulaması kendi başına etkili olamadığından, bu sorunun üstesinden gelmek için yeni alternatif yaklaşımlar geliştirilmelidir. Bu fırsatçı patojenin klinikteki önemi, çoklu olarak antimikrobiyallere direnç geliştirebilme özelliğinden, virülans faktörleri (örneğin, ekzoproteazlar, sideroforlar, rhamnolipidler, piyosianin, elastaz, ekzotoksin A, fosfolipaz C) salgılamasından, toplum veya hastane kaynaklı enfeksiyonlarla sonuçlanan biyofilm yapısı oluşturabilmesinden kaynaklıdır. *P. aeruginosa*, immün sistemi baskılanmış hastalarda kistik fibrozise, zatürre, idrar yolu enfeksiyonları, cerrahi bölge enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları ve yanık ünitelerinde görülen deri enfeksiyonları gibi kalıcı hastane enfeksiyonlarına neden (Driscoll ve ark., 2007). Kistik Fibrozis (KF), *P.aeruginosa*'nın sebep olduğu kronik akciğer enfeksiyonlarına bağlı yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip genetik bir hastalıktır (Lyczak ve ark. 2002). 2004 yılında ABD Kistik Fibrozis Vakfı (Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry), solunum yollarından alınan kültürlerin %57.3'ünde *P. aeruginosa*'nın tanımlandığını bildirmiştir (Driscoll ve ark., 2007). Avrupa Kistik Fibrozis Derneği verilerine ve yeni doğan tarama programlarına göre, 16 Avrupa ülkesinde 2025'teki KF insidansının yaklaşık olarak %50 artacağı ve bu artışın %75'inin yetişkinlerde, %20'sinin çocuklarda görüleceği tahmin edilmektedir (Schwarz ve ark., 2018).

1.3.*Pseudomonas aeruginosa*'da Bakteriye İletişim (Quorum Sensing-Salt Çoğunluğu Algılama)

Geçmişte, bakterilerin planktonik (serbest yüzen) tek hücreler halinde bir arada yaşadığına ve çok hücreli organizmalarda görülen çevresel değişikliklere tepki vermediğine inanılmaktaydı. Zamanla planktonik hücrelerin var olmaları için diğer organizmalarla rekabet etmeleri ve doğada kalmak zorunda olmaları sebebiyle doğada tek olarak var olamayacakları doğrulanmıştır (Vu ve ark., 2009). Yakın geçmişte ise, bakterilerin sosyal davranışlarını kontrol etmelerini sağlayan salt çoğunluğu algılama-quorum sensing (QS) sistemi ile iletişim kurdukları belirlenmiştir (Fuqua ve ark. 2001). Ortamdaki yüksek bakteri popülasyonu yoğunluğu; tür içi, türler arası veya alemler arası etkileşimler için QS sisteminin tetiklenmesine yol açmaktadır (Waters ve Bassler, 2005;

Choudhary ve Schmidt-Dannert, 2010; Clinton ve Rumbaugh, 2016). Otoindüktör (autoinducer, AI)ler olarak adlandırılan küçük moleköl ağırlıklı ve kolaylıkla diffüze olabilen kimyasal sinyal molekülleeri bakterinin mikroçevresine salınmaktadır (Galloway ve ark., 2012). Üç ana AI türü tanımlanmıştır: (i) Gram negatif bakteriler için homoserin laktonlar (HSL'ler) olarak da bilinen AI-1; (ii) Gram pozitif bakteriler için otoindükleyici peptitler (AIP); (iii) Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin kendi aralarındaki iletişimi sağlamak için ise otoindüktör-2 (AI-2) (Parsek ve Greenberg, 2005; Rutherford ve Bassler, 2012).

P. aeruginosa, tür içi iletişim kurmak için hiyerarşik olarak birbiriyle ilişkili dört QS sistemine sahiptir: las, rhl, pqs ve iqs (Lee ve Zhang, 2015; Papenfort ve Bassler, 2016). *P. aeruginosa*, sinyal molekülleeri olarak N-açil homoserin lakton (AHL)ları kullanmaktadır. *P. aeruginosa* QS sistemi Lux homologları olan LasRI ve RhlRI'yı içermektedir. N- (3-oksododekanoil) homoserin lakton (3-okso-C12-HSL, OdDHL), LasI sentaz tarafından sentezlenir ve daha sonra, bu otoindüktör, *lasA* proteaz, *lasB* elastaz, apr, alkalin proteaz ve ekotoksin A gibi virölans genlerinin transkripsiyonuyla sonuçlanan reseptör LasR'ye bağlanır. *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun *las* sistemi tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Las sistemi rhl sistemi üzerinde de düzenleyici rol oynamaktadır (Pesci ve ark., 1997; Lee ve Zhang, 2015). Rhl sistemi ise benzer şekilde RhI, RhR ve otoindüktör N-butanoil-homoserin laktonu (C4-HSL, BHL) içerir. C4-HSL salınımı ile rhamnolipid, piyosyanin, elastaz, hidrojen siyanid ve lektinlerin üretimi tetiklenir. Üçüncü QS sistemi olan “*Pseudomonas* quinolone signal” (pqs) sisteminin regülatör olarak PqsR'yi, sinyal sentezi için pqsABCDE-phnAB operonunu ve PqsH'ı ve sinyal molekülleeri olarak 2-heptil-3-hidroksi-4-(1H)-kinolon (HHQ) ve 2-heptil-4-hidroksikinolonun dahil olduğu 2-alkil 4-kinolon (AQ)ları içerdiği bildirilmiştir (Lee ve Zhang, 2015).

QS sistemi tarafından düzenlenen genlerin, türe özgü virölans faktörlerini ve bakteri ile konak arasındaki etkileşimi sağlayan diğer genleri kodladığı bilinmektedir (Hentzer ve ark., 2003) Ayrıca, *P. aeruginosa* QS ile ilişkili genlerin (% 10'dan fazla) direnç ve stres koşullarında; elastaz, proteaz, ekzotoksin A, rhamnolipid, piyosyanin, aljinat, lipaz, piyoverdin, lektinler vb., birçok virölans faktörlerinin salınımından,

motiliteden, antibiyotik direncinden, biyofilm oluşumu için metabolik yolların düzenlenmesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Moradali ve ark., 2017).

LasB geni elastaz üretiminden sorumlu olduğu gibi konakta elastin, kollajen ve diğer matriks proteinlerinin degradasyonunu tetiklemekte görevli olduğu bilinmektedir. *LasA* geninin ürettiği proteaz enzimi, epitelyal bariyerin bozulmasına ve *P.aeruginosa* kolonizasyonunun artmasına neden olur. *ToxA* geni tarafından salgılanan ekzotoksin, hücre ölümüyle birlikte bakteriyel kolonizasyonun artmasına neden olur. *RhlAB* geni tarafından kodlanan rhamnosiltransferazların (rhamnolipid) üretimi, konakta makrofaj ve polimorfonükleer lenfositlerin nekrozu ve ayrıca biyofilm oluşumuyla sonuçlanır. Lektin, *lecA* (galaktofilik lektin) tarafından kodlanır ve hava yollarındaki siliyaların paralizine ve kolonizasyonun artmasına yol açar. *hcnABC*, akciğer fonksiyonlarında bozulma ile sonuçlanan hidrojen siyanür üretiminden sorumlu olan başka bir QS ile ilişkili genidir. *phzABCDEFG* *phzM* geni ile düzenlenen piyosiyanın üretimi, oksidatif strese ve nötrofil hasarına neden olarak *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı verilen hızlı inflamatuvar yanıtın kaybına sebep olmaktadır (Lee ve Zhang, 2015).

QS ile ilişkili biyofilm oluşumu bakteriyel patogeneizde önemli bir role sahiptir (Costerton ve ark., 1999). Biyofilmler bakterilerin toplu davranışlarının bir sonucu olarak oluşmaktadır (Hentzer ve Givskov, 2003). Biyofilmler, eDNA (hücre dışı- extracellular DNA), lipid, ekzopolisakkarit, protein ve diğer makromolekülleri içeren hücre dışı polimerik madde (EPS) matrisinde bakteri hücrelerinin yüzeye tutunduğu hücre topluluklarıdır (Flemming ve Wingender, 2010).

Biyofilm oluşumu sürecinde bakteriler yüzeye tip IV pili ve adhezinler ile bağlanmaktadır. Bu aşamada, geri dönüşümsüz bir bağlanma meydana gelir ve ardından mikrokoloniler oluşur. Biyofilmin olgunlaşması çevresel koşullara ve QS tarafından düzenlenen çeşitli faktörlere bağlıdır. Rhamnolipidin aşırı ekspresyonu ise, dağılmaya neden olarak bakterilerin diğer yüzeylerde de kolonileşmesini sağlamaktadır. Biyofilm oluşumu dezenfektanlara, antibiyotiklere, UV'ye vb. karşı direnç sağlayarak istilacı patojenlerin konağın immün reaksiyonlarına karşı savaşmasına izin vermektedir (Costerton ve ark., 1999). Biyofilm formu içinde bulunan bakteriler planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere karşı 10-1000 kat daha dayanıklıdır (Olson ve ark.,

2002). Ayrıca biyofilm yapısı içindeki bakteriler antibiyotiklere karşı direnç gösterme eğiliminde olması çoklu ilaç direncine sebebiyet vermektedir (Lewis, 2007). Antibiyotiklere ve konak bağışıklık sistemine rağmen gelişen bu direnç göz önüne alındığında, kolonizasyon ve biyofilm oluşumunun artmasıyla kronik enfeksiyonların tedavisinin güç olduğu açıktır. Bjarnsholt ve ark., (2009) KF hastalarında kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının yoğun antibiyotik tedavisi ile baskılanabileceğini ancak özellikle olgun biyofilm formu içinde bulunan bakterilerin tamamen yok edilemeyeceğini bildirmişlerdir.

1.4.Quorum Sensing İnhibisyonu: *Pseudomonas aeruginosa* İle Mücadelede Alternatif Yaklaşım

Bilindiği üzere, virülans faktörlerinin mikroorganizmalar tarafından üretilmesi hastalığın klinik seyrinde önem taşımaktadır. Bu faktörler, bakteriyel patojenite ile konak direnci arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak konak immün sisteminde hasara neden olabilir (Peterson, 1996). Bakteriyel enfeksiyonlar için geleneksel tedavi yöntemleri bakteriyi öldürmeyi veya gelişimini durdurmayı hedef alan aktif bileşiklerdir (Hentzer ve Givskov, 2003). Fakat önceki bölümlerde belirtildiği gibi, antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç sayesinde geleneksel antibiyotik tedavileri yetersiz kalması halk sağlığında ciddi problemlerin yaşanmasına sebep olmaktadır (Dickey ve ark., 2017). Günümüzde araştırmacılar, bakteriyel antibiyotik direnci ile mücadele için alternatif olarak antivirülans yaklaşımlarına odaklanmıştır. Bu alternatif yaklaşımlarda hedeflenen antibiyotiklerin etki mekanizmasından farklı olarak bakterileri öldürmek veya gelişimlerini inhibe etmek yerine, bakterilerin virülans faktörlerini üretmesini engelleyerek bakteriyel enfeksiyonları ve konakta oluşabilecek hasarları önlemektir (Grandclement ve ark., 2016). Bu yaklaşımın, geleneksel antibiyotiklere karşı ilaç direnci açısından üstün özellikleri olduğu varsayılmaktadır (Dickey ve ark., 2017; Defoirdt, 2018).

QS sisteminin bloke edilmesi antivirülans yaklaşımlardan biri olarak bilinmektedir. Quorum quenching (QQ), QS sinyalizasyonunu bloke etme diğer bir deyişle bakteriyel haberleşmeyi engelleme işlemindeki tüm süreçleri kapsamaktadır

(Dong ve ark., 2001). Bakteriyel iletişimi engelleme potansiyeline sahip doğal bileşiklerin olduğu literatürde bildirilmiştir (Hentzer ve Givskov, 2003). Literatürde QS mekanizmasını inhibe etme (QSI) potansiyeli taşıyan çeşitli enzimler ve kimyasal bileşikler tanımlanmıştır. Aksoydan (2014), doğal bir polimer olan kitosan ve kitosan nanoparçacıklarının antibakteriyel ve anti-QS etkisinin *in siliko* ve *in vitro* ortamlarda incelenmesini araştıran çalışmasında kitosan-TPP nanoparçacıkların fosfat limitasyonu, antimikrobiyal peptit, katyonik antimikrobiyal peptit ve redoks sinyalleri gibi mekanizmalarda kitosan moleküllerine göre daha yüksek bir skor gösterdiğini belirtmiştir.

Ancak bir molekülün QSI özelliği taşıması için düşük moleküler ağırlıkta, yüksek spesifite gösteren verimli ve stabil bileşikler olması gerektiği bildirilmiştir. Ayrıca QSI bileşiklerin konak için olumsuz etkilere sebebiyet vermemesi ve hidrolitik enzimlerden etkilenmemesi gerektiği bildirilmiştir (Kalia, 2013). Öte yandan, bazı bileşikler reseptörlere bağlanır ve agonist olarak etkilerini aktive eder ve QS ile ilişkili genlerde yukarı regülasyona neden olur. QSI'lerin bu anlamda inhibisyon hedefleri üzerinde antagonistik etkiler göstermesi tercih edilmektedir. QS sistemi; QS sinyal biyosentezinin inhibisyonu, QS sinyal moleküllerin degrade edilmesi veya sinyal molekülünün algılanmasının inhibisyonu gibi yaklaşımlarla inhibe edilebilmektedir (Rasmussen ve Givskov, 2006; LaSarre ve Federle, 2013).

1.5.Bilgisayar Destekli Yaklaşımlar (Computer Based Approaches- Virtual

Screenings- Bilgisayar tabanlı sanal tarama):

İlaç keşfi sürecinde, terapötik hedeflere uygun potansiyel etkileşime sahip yeni ilaçların geliştirilmesi önemli bir yer tutmaktadır (Batoool ve ark., 2019). Geleneksel olarak, öncü tanımlama, deneysel yüksek verimli tarama (HTS- high througput screening) ile sağlanır, ancak zaman alıcı ve yüksek maliyetlidir (Cheng ve ark., 2012). Hedef tanımlama sürecinin başından FDA onaylı bir ilacın geliştirilmesine kadar tipik bir ilaç keşif döngüsünün tamamlanması yaklaşık 2.6 milyar dolar (Mullard, 2014) maliyet ile 14 yıla (Song ve ark., 2009) kadar sürmektedir. Bu duruma ek olarak, son yıllarda, klinik

Çalışmaların farklı aşamalarındaki başarısızlık nedeniyle piyasadaki yeni ilaçların sayısında bir düşüş olduğu kaydedilmiştir (Lavecchia ve Cerchia, 2016).

Kasım 2018'de, FDA onaylı yeni ilaçların geliştirilmesi için temel denemelerin toplam maliyetini tahmin etmek için yapılan bir çalışmada; FDA tarafından 2015-2016 döneminde onaylanan 59 yeni ilacın ortalama etkinlik maliyetinin 19 milyon dolar olduğu belirtilmiştir (Moore ve ark., 2018). Bu nedenle, hesaplamalı yöntemler ile etkin, düşük maliyetli ve geniş spektrumlu alternatifler geliştirerek geleneksel ilaç keşif yöntemlerinin sınırlamalarının üstesinden gelmek gerekmektedir (Batoool ve ark., 2019).

Son yıllarda biyolojik hastalıkların tanımlanmasında küçük molekül veri bankalarından elde edilen moleküller umut vadetmektedir (Sahin & Durdağı, 2020; Salmas ve ark.,2017). Hesaplamalı biyoloji ve biyofizik teknikleri, terapötik ilaç olarak yeni moleküllerin bulunmasında veya tanımlanmasında, bu ligandların makromoleküllere bağlanma afinitelerinin yüksek doğrulukla tahmin edilebilmesi sebebiyle büyük önem taşımaktadır. Ayrıca bu teknikler ilaç adayının belirlenmesindeki süreyi ve maliyeti azaltarak klinik araştırma sürelerini hızlandırması ile ilaç keşfinin daha pratik hale gelmesi beklenmektedir (Sahaboğlu ve ark., 2019)

Geleneksel ilaç keşif yöntemlerinin (klasik veya ileri farmakoloji) aksine, rasyonel ilaç tasarımı verimli ve ekonomiktir (Batoool ve ark., 2019). Akılcı ilaç tasarım yöntemi aynı zamanda ters farmakoloji olarak da bilinir, çünkü ilk adım, daha sonra küçük moleküllu kütüphanelerin taranması için kullanılan hedef proteinleri tanımlamaktır (Swinney ve ark., 2011). Biyomoleküler spektroskopik yapı belirleme yöntemlerinde kaydedilen ilerlemeler ile birlikte yapısal ve moleküler biyolojide çarpıcı ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu yöntemler, 100.000'den fazla proteinin üç boyutlu (3B) yapısının açığa çıkartılmasını sağlamıştır (Ferreira ve ark., 2015). Bu tür verilerin depolanması (ve düzenlenmesi) ile birlikte, gün geçtikçe daha sofistike ve başarılı hesaplama teknikleri geliştirilmesiyle devam etmektedir. İnsan Genom Projesinin tamamlanması ve biyoinformatikteki gelişmeler, çok sayıda hedef protein bulunması nedeniyle ilaç geliştirme hızını artırmıştır. Terapötik açıdan önemli proteinlerin 3B yapılarının mevcudiyeti, ligand bağlanma bölgelerinin tanımlanmasını kolaylaştırır ve yapı bazlı ilaç tasarımı (Structure Based Drug Design, SBDD) için temel hazırlamaktadır.

Hesaplamalı yaklaşımlar, antibiyotik ilaç tasarım sürecini hızlandırmak için deneyleri yorumlamak ve yönlendirmek için yararlı araçlardır. Yapı bazlı ilaç tasarımı veya ligand bazlı ilaç tasarımı (Ligand Based Drug Design, LBDD), mevcut iki bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD) yaklaşımı türüdür. SBDD yöntemleri, ilgili biyolojik fonksiyonları için önemli olan kilit yerleri ve etkileşimleri tanımlamak için, tipik olarak proteinlerin veya nükleik asitlerin 3B yapısal bilgilerini analiz eder. Bu tür bilgiler daha sonra hedefe spesifik yollarla rekabet edebilecek ve böylece mikroorganizmaların hayatta kalması için gerekli biyolojik yolları engelleyebilecek antibiyotik ilaçların tasarlanmasında kullanılabilir. LBDD yöntemleri, bir yapı-aktivite ilişkisi (SAR) olarak adlandırılan fizyokimyasal özellikleri ve antibiyotik aktiviteleri arasında bir ilişki kurmak amacıyla bilinen antibiyotik moleküllerine odaklanır (Yu ve MacKerell, 2017).

SBDD tekniğinde, hedef yapıya ilişkin yapısal bilgiler, X-Işını kırınımı, NMR veya elektron mikroskopi teknikleri kullanılarak elde edilebilirken (Kalyaanamoorthy ve Chen, 2011) LBDD'de esas olarak hedef hakkında mevcut yapısal bilgi yoktur, bu nedenle niceliksel yapı -aktivite ilişkileri (QSAR) dikkate alınır. Moleküler kenetlenme (docking) ve moleküler dinamik (MD) simülasyonları, SBDD'deki protein-ligand etkileşimleri için etkili hesaplama araçlarıdır (Batoool ve ark., 2019).

Hedef proteinin yapısı belirlendikten sonra, bir sonraki adım bağlanma bölgesini tanımlamaktır. Bu bölgeler, ligandların istenen etkiyi üretmek için hedefe bağlandığı oyuk ya da yüzeylerdir. Proteinin dinamik doğasına rağmen, potansiyel bağlanma rezidülerini tespit edebilen birkaç yöntem vardır. Bu yöntemler, bağlanma bölgesi haritalaması için etkileşim enerjisi ve van der Waals (vdW) kuvvetleri hakkındaki bilgileri dikkate alır. SBDD için özel olarak etkileşim enerjisi hesaplamaları ile yüzey haritalaması (sitemap) için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, hedef protein üzerindeki, ilaç benzeri moleküller üzerindeki önemli fonksiyonel gruplarla olumlu etkileşime giren belirli yerleri tanımlar (Laurie ve Jackson, 2005).

Moleküler kenetlenme teknikleri, ligand ile proteinin en yüksek bağlanma modunu tahmin etmeyi amaçlar. Bu bağlanma yapısı proteinin bağlanma bölgesi içindeki ligandın çeşitli konformasyonunun/ oryantasyonunun, yani pozlarının üretilmesinden oluşur (Salmaso ve Moro, 2018). Uygun ligand bağlanma konformasyonu iki faktöre

bağlıdır: (i) olası bağlanma pozlarını tanımlayan bağlanma cebi ve (ii) her konformasyonla ilişkili bağlanma enerjisinin tahmini (Kapetanovic, 2008). Ligand bağlanması çeşitli skorlama fonksiyonları ile değerlendirilmekte ve minimum enerji durumuna ulaşılan kadar çoklu iterasyonlar yapılmaktadır (Ferreira ve ark., 2015).

Moleküler yerleştirme, reseptörün bağlanma cebindeki biyoaktif moleküllerin konformasyonlarını belirlemek için kullanılan bir yaklaşımdır. Protein ve ligand molekülü arasındaki hidrojen bağı, hidrofobik, elektrostatik ve van der Waals etkileşimleri gibi bağlı olmayan etkileşimleri hesaplar ve tüm bu bağlı olmayanların toplamına karşılık gelen ΔG (Gibbs serbest enerjisi) 'nın serbest enerjisini tahmin eder. Pozitif yerleştirme skoru (yani yüksek/pozitif ΔG değerleri) olumsuz bağlanma pozuna karşılık gelir ve negatif ΔG skoru bağlanma cebindeki uygun bağlanma konformasyonuna karşılık gelmektedir. Çoğu yerleştirme programı, hesaplama maliyetleri nedeniyle, sadece protein esnekliğini ihmal ederken ligand esnekliğini dikkate almaktadır (Kitchen ve ark., 2004).

DOCK, AutoDock, AutoDock Vina, FlexX, GOLD, Glide vb. gibi çeşitli yerleştirme algoritmaları ve yazılımlar mevcuttur (Friesner, RA ve ark., 2004 ; Jones, G. ve ark., 1997). Bu programların her biri, bağlanma bölgesindeki ligandların farklı konformasyonlarını ve molekülleri bağlanma afinitelerine göre sıralamak için puanlama fonksiyonunu aramak için kendi algoritmasına sahiptir. Bu tezde, Glide algoritması kullanılmıştır. Maestro moleküler modelleme paketinde, kuantum-polarize ligand kenetleme (Quantum Polarized Ligand Docking, QPLD), uyarlanmış uyum kenetleme (Induced Fit Docking, IFD), ekstra hassasiyet (Extra Precision ,XP), standart hassasiyet (Standart Precision, SP), ve yüksek-çıkıtlı sanal tarama (High Throughput Virtual Screening, HTVS) Glide kenetleme algoritmaları mevcuttur.

Moleküler dinamik (MD), moleküler sistemlerin dinamik davranışını zamanın bir fonksiyonu olarak simüle eden, oluşturulan bir simülasyon kutusundaki (ligand, protein su molekülleri) tüm atomların hareketlerini Newton'un hareket yasasını kullanarak hesaplayan bir tekniktir (Salmaso, 2018; Hospital ve ark., 2015). Bu teknikle hedef yapıların (örneğin kenetlenme programlarından alınan ligand-protein komplekslerinin) istenilen sıcaklık ve pH'da optimize edilmesi ve dengeye getirilmesi sağlanır. Her bir

atom üzerine uygulanan kuvvetler, bağ uzunlukları, torsiyon açıları ve çevredeki atomlarla olan uzak mesafe etkileşimler ile belirlenir. 1957'de sert küreler arasındaki çarpışmaları inceleyen ilk uygulama basit sistemleri simüle etmek için geliştirilmiştir (Alder ve Wainwright, 1957). Bir biyomolekülün ilk MD simülasyonu 1977'de McCammon ve arkadaşlarının (McCammon ve diğerleri, 1977); ham moleküler mekanik potansiyeli ile vakumda gerçekleştirilen 58-rezidü ile Sığır Pankreas Tripsin İnhibitörü'nün (Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor, BPTI) 9.2 ps simülasyonu idi. Moleküler dinamik simülasyonları, Newton'un hareket denklemlerinin (klasik mekanik) entegrasyonu ile atomların hareketlerini zamanla hesaplar (Leach, 2001; Adcock ve McCammon, 2006).

1.5.1. Homoloji Modelleme

Protein Veri Bankası'nda (PDB) (<https://www.wwpdb.org/>) yaklaşık 144.000 adet proteinin deneysel olarak belirlenmiş 3B yapısı bulunmaktadır (Muhammed ve Aki-Yalcin, 2019). 2006 yılında, NCBI'da bulunan sekans miktarı, PDB'de ortaya konulan deneysel olarak çözülmüş 3B yapılardan yaklaşık 120 kat daha fazladır (Levitt, 2007). Bu, protein dizilerinin sayısının, deneysel olarak belirlenen proteinlerin 3B yapılarının sayısından altı kat daha fazla olduğu anlamına gelmektedir. Mevcut sekanslar ve belirlenen protein 3B yapıları arasındaki bu artan boşluk endişe verici bir durumdur. Dolayısıyla bu genişleyen boşluğu doldurmak için hesaplamalı yapısal belirleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Muhammed ve Aki-Yalcin, 2019).

Proteinlerin üç boyutlu yapıları, moleküler düzeydeki işlevleriyle ilgili değerli bilgiler sağlar. Çoğu zaman, protein kompleksleri birçok hücrel sürecin merkezinde yer alır. Genel kuaterner yapının ayrıntılı bir açıklaması, biyolojik sistemlerin kapsamlı bir şekilde anlaşılması, protein komplekslerinin ve ağlarının nasıl çalıştığı ve nasıl modüle edilebileceği bilgisi için gereklidir (Waterhouse ve ark., 2018).

Yöntemler genellikle şablon tabanlı (homoloji) modelleme ve *de novo* modelleme olarak kategorize edilir (Mullins 2012; Baker ve Sali, 2001) Geleneksel homoloji modellemenin (veya karşılaştırmalı modelleme), bu yöntemler içinde daha doğru olduğu

kabul edilir ve bu nedenle yaygın olarak ilaç keşif araştırmalarında kullanılır (Cavasotto ve Phatak, 2009).

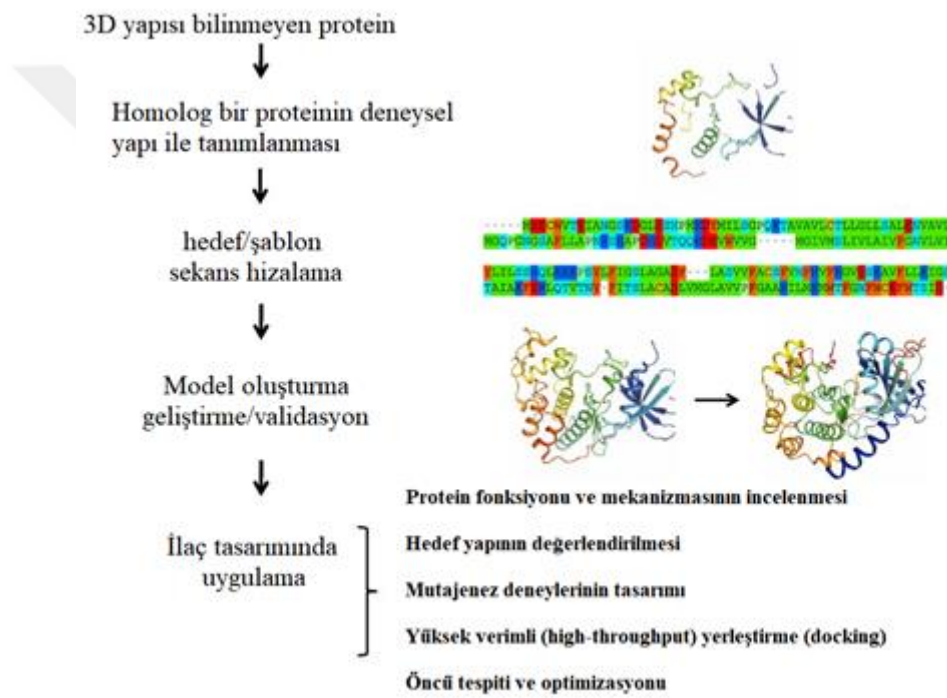
Homoloji modellemesi yapısal biyolojide önemli bir teknik haline gelmekte ve bilinen protein dizileri ile deneysel olarak belirlenmiş yapılar arasındaki boşluğun kapanmasında önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu amaçla geliştirilen sunucular (**Tablo1.1**), homoloji modelleme sürecini kolaylaştırır, ayrıca belirli bir hesaplama uzmanlığı olmayan kullanıcıların da güvenilir protein modelleri üretmelerine ve modelleme sonuçlarına, görselleştirmelerine ve yorumlarına kolayca erişebilmelerine olanak sağlar (Waterhouse ve ark. 2018).

Tablo 1.1. Homoloji modelleme sunucuları

Protein Model Portal	(Arnold ve ark. 2009)
http://www.proteinmodelportal.org	
HHpred	(Hildebrand ve ark. 2009)
http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred	
ICM	(Abagyan ve ark., 1984)
http://www.molsoft.com	
IntFOLD	(McGuffin ve ark.,2011)
http://www.reading.ac.uk/bioinf/IntFOLD/	
Modeller, ModWeb	(Eswar ve ark. 2007)
http://salilab.org/modeller/	
Phyre2	(Kelley ve ark. 2009)
http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/	
Rosetta	(Raman ve ark. 2009)
http://rosetta.bakerlab.org/	
SWISS-MODEL	(Waterhouse ve ark. 2018)
http://swissmodel.expasy.org/	
Modbase	(Pieper ve ark. 2006)
http://modbase.compbio.ucsf.edu	

Homoloji modelleri, bir protein yapısının hesaplamalı olarak türetilmiş yaklaşımlardır ve hatalar/yanlışıklar içerebilir. Bir model için gereken kalitenin büyük ölçüde kullanım amacına bağlı olduğuna dikkat edilmelidir (Schmidt ve ark. 2014).

Homoloji modelleme genellikle uygun bir model elde edilinceye kadar tekrarlanabilen adımları içerir: (i) deneysel olarak en uygun yapıların belirlenmesi için şablon seçimi; (ii) hedef şablon dizisi hizalaması; (iii) 3B model yapı oluşturma; (iv) model iyileştirme; ve (v) model kalite tahmini (**Şekil 1.1.**) (Cavasotto ve Phatak, 2009).



Şekil 1.1 Homoloji modelleme aşamaları (Cavasotto ve Phatak, 2009).

1.5.2. SWISS MODEL

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) ilk tam otomatik protein homoloji modelleme sunucusudur. Modelleme işlevselliği, amino asit sekansları göz önüne alındığında, homo ve heteromerik komplekslerin modellenmesini içerecek şekilde genişletilmiştir (Waterhouse ve ark. 2018). SWISS-MODEL günümüzde 1 günde ~3000 model üretmektedir (dakikada 2 model), 2014 yılında günde ortalama 1500'e yakın model üreterek dünya çapında en yaygın kullanılan yapı modelleme sunucularından biri haline gelmiştir (Biasini ve ark., 2014).

Karşılaştırmalı modellemede, bir hedef sekansın 3B protein modeli, şablon olarak kullanılan bir protein yapısından deneysel bilgilerin çıkarılmasıyla üretilmektedir. SWISS MODEL'de, varsayılan modelleme iş akışı aşağıdaki ana adımlardan oluşmaktadır (Waterhouse ve ark., 2018):

1. Girdi verileri (input data): Hedef proteine ait FASTA, Clustal formatında veya düz bir metin olarak amino asit sekansı temin edilmelidir. Alternatif olarak, bir UniProtKB erişim kodu belirtilebilir.
2. Şablon (template) arama: 1. adımda sağlanan veriler, SWISS-MODEL şablon kütüphanesinde ilgili protein yapılarını aramak için kullanılmaktadır (Biasini ve ark., 2014). SWISS-MODEL bu görevi iki veritabanı arama yöntemi kullanarak gerçekleştirir: benzerliği yüksek şablonlar için hızlı ve doğruluğu yüksek olan BLAST (Altschul ve ark., 1995) ve düşük homoloji durumunda hassasiyeti artıran HHblits (Remmert ve ark., 2011).
3. Şablon seçimi: Şablon araması tamamlandığında, şablonlar Global Model Kalite Tahmini (GMQE) (Biasini ve ark., 2014) ve Kuaterner Yapı Kalite Tahmini (QSQE) (Bertoni ve ark., 2017) tarafından tahmin edilmekte ve ortaya çıkan modellerin kalitesine göre sıralanmaktadır.

Model oluşturma: Seçilen her şablon için, ilk olarak hedef şablon hizalaması tarafından tanımlanan korunmuş atom koordinatlarının aktarılmasıyla bir 3B protein modeli otomatik olarak oluşturulur. Hizalamadaki eklemelere / delesyonlara karşılık gelen rezidü koordinatları, döngü modellemesi ile üretilir ve korunmayan amino asit yan zincirleri tamamlanarak protein modeli elde edilmektedir.

4. Model kalitesi tahmini: SWISSMODEL, modelleme hatalarını ölçmek ve beklenen model doğruluğu hakkında tahminler vermek için, QMEAN puanlama değerini kullanır (Benkert ve ark., 2011).

Homoloji modellemesinde, şablon olarak 2.2Å'dan daha yüksek bir çözünürlüğe sahip X-ışını kristalografisi ile belirlenen yapıların kullanılması genellikle tercih edilmektedir.

QMEAN puanlarının doğruluğu QMEANDisCo tarafından artırılmaktadır. QMEANDisCo, modelde gözlemlenen atomlar arası mesafelerin tutarlılığını, hedef diziye homolog olan deneysel olarak belirlenmiş protein yapılarından ekstrakte edilmiş bilgiler ile değerlendirir. Yukarıdaki şekilde yer alan "Yerel Kalite" grafiği (4), modelin her rezidüsü için (x ekseninde rapor edilmiştir), y ekseninde beklenen benzerliği gösterir. Tipik olarak, 0.6'nın altında bir puan gösteren rezidülerin düşük kalitede olması beklenir. Farklı model zincirleri farklı renklerde gösterilmiştir.

Yukarıdaki şekilde "Karşılaştırma" grafiğinde (5), modellerin model kalite puanları, benzer büyüklükteki deney yapıları için elde edilen puanlarla ilişkilidir. X ekseninde protein uzunluğunu (rezidü sayısı) gösterir. Y ekseninde QMEAN skorudur. Her nokta bir deneysel protein yapısını temsil eder. Siyah noktalar, ortalamadan standart sapması ($|Z\text{-skoru}| < 1$) ile 1 arasında QMEAN skoruna sahip deney yapıları, $|Z\text{-skoru}| > 1$ ile 2 arasında gri renklidir. Ortalamadan daha ileri olan deneysel yapılar kırmızıdır. Gerçek model kırmızı bir yıldız olarak temsil edilir. Yıldızın x-konumu etrafındaki deneysel yapıların ortalama ve standart sapması, yukarıdaki şekilde modelin (2) QMEAN Z-puanını hesaplamasının temelidir.

Yapılan homoloji modelinin kalitesini belirlemek amacıyla Ramachandran analizleri de yapılmaktadır. Protein zincirinin yaptığı rotasyonlar sonucunda, zinciri oluşturan amino asitlerin α -karbon ve nitrojenin bulunduğu noktada iki düzlemde bulunan açılar meydana gelir. α -karbon ve karbon (karboksil grubunda bulunan) atomları arasındaki bağ açılara dihedral açılar denir. ϕ (ϕ) açısı nitrojen atomu ve α -karbon atomu arasında, ψ (ψ) açısı karbon ve α -karbon arasında, ω (ω) ise nitrojen ve karbon atomları arasında oluşan açılar isimlendirmek için kullanılır. ω (ω) genellikle peptit bağı üzerinde oluşu için çoğunlukla 180 derecedir ve dihedral açı olarak değerlendirilmez, zira tek bir düzlemde. "y" ekseninde ψ (ψ), "x" ekseninde ise ϕ (ϕ) açılarını göstermektedir. G.N. Ramachandran ve ekibi tarafından 1963 yılında geliştirilen grafik dihedral açılarının protein yapısı içerisinde dağılımının anlaşılmasında ve sonuçların bir araya getirilerek dihedral açı değerlerinin izin verilen ve izin verilmeyen bölgelerinin görüntülenmesini sağlamaktadır (Ramachandran, 1963).

1.6.Chrysophanol’ün Farmakolojik Önemi

Chrysophanol, geniş spektrumlu farmakolojik öneme sahip olan bir antrakinondur. Organizmaya özgü olarak biyosentezlendiği bildirilen ilk poliketit olma özelliğini taşır (Yusuf ve ark., 2019). *Chrysophanol* 9,10-antrasendion halkanın 1,8-dihidroksi-3-metil türevidir. *Chrysophanol*’ün anti-oksidan, antibakteriyel, anti-ülser, anti-enflamatuar, anti-kanser, nöroprotektif, yaşlanma karşıtı, akciğer koruyucu, antiobezite, hipolipidemik, antidiyabetik ve hepatoprotektif özellikleri içeren farmakolojik özellikleri bildirilmiştir. Seo ve ark. (2012)’nın çalışmasında *Chrysophanol*’ün antikoagülant ve antiplatelet etkisinin olduğu bildirilmiştir. Zhang ve ark. (2017) *Chrysophanol*’ün fare modelinde alerjik astımı önleyebileceğini destekleyen bir çalışma yayınlamıştır. Bununla birlikte, *Chrysophanol* ile tedavi edilen insan karaciğer hücreleri adenosin trifosfat seviyelerindeki düşüşler ve laktat dehidrojenaz aktivitesindeki artışlar, *Chrysophanol*’ün nekrotik hücre ölümünü uyardığını göstermektedir (Lu ve ark., 2010). *Chrysophanol* molekülünün antivirülans etkisi bilinmemektedir (Su ve ark., 2020). *Chrysophanol* molekülünün ilk olarak Polygonaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitki olan *Rheum rhabarbarum*’da bulunduğu bildirilmiştir (Tutin ve Clewer, 1911). Bugüne kadar, *Polygonaceae*, *Rhamnaceae*, *Fabaceae*, *Liliaceae*, *Asphodelaceae*, *Buphorbiaceae*, *Meliaceae*, *Podocarpaceae*, *Picramniaceae* ve *Hemerocallidaceae* gibi çeşitli familyalarda bulunduğu bilinmektedir (Kuo ve ark. 2002; Panichayupakaranant ve ark., 2009). Mantarlarda, *Chrysophanol* ilk olarak *Penicillium islandicum* Sopp’ta (ATCC 28431) bulunmuştur (Gosh ve ark., 1978). *Parmeliaceae*’ye ait *Asahinea chrysantha* gibi likenler de çok çeşitli antrakinonlar etkin bir şekilde sentezlenmektedir (Malik ve ark., 2016). *Chrysophanol* mantarlardaki polimalonat yolu (PMA) ve bitkilerdeki shikimate ve PMA yolları ile üretilir (Leistner ve Zenk., 1969).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. *In siliko*

2.1.1.1. Kullanılan Donanımlar

Bu tez çalışmasında *in siliko* hesaplamaların gerçekleştirilebilmesi için yüksek işlem gücüne sahip bir bilgisayar kullanılmıştır (i7 4.4GHz, 16GB RAM, 128GB SSD).

2.1.1.2. Kullanılan Yazılımlar

1. Glide Module - Schrödinger Molecular Modeling Suite
2. Desmond Module - Schrödinger Molecular Modeling Suite
3. VMD (Visual Molecular Dynamics)
4. Prime Module – MM/GBSA (Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area) - Schrödinger Molecular Modeling Suite

2.1.1.3. Kullanılan Veribankaları

1. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
2. RCSB Protein Data Bank – RCSB PDB
3. PDBsum
4. PubChem Database
5. Uniprot (Universal Protein Resource)

2.1.2. *In vitro*

2.1.2.1. Bakteri suşları

1. *P. aeruginosa* PAO1 Yabancıl tip (Wild type ATCC15692)
2. *P. aeruginosa lasB-gfp*

3. *P. aeruginosa rhlA-gfp*

4. *P. aeruginosa pqsA-gfp*

2.1.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

LB Broth Besiyeri (Sigma-Almanya)

M9 Minimal Besiyeri (Amresco-ABD)

Bacto agar (Sigma-Almanya)

Nitril Eldiven (Pudrasız) (Broche-Türkiye)

Alüminyum Folyo

Cam Deney Tüpleri

Portüp

Polistiren 96 Kuyucuklu Siyah Optik Mikroplaka (Thermo NUNC-ABD)

Plastik Petri Kapları (Fıratmed-Türkiye)

Bek Alevi

Platin Öze

Cam baget

Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen-ABD)

Quartz Spektrofotometre Küveti (1400 µl) (Hellma-Almanya)

Ultra Saf Su (ddH₂O)

0.45 µm'lik Filtre (Whatman-İngiltere)

Dimetil sülfoksit (Sigma-Almanya)

Gliserol (Merck-ABD)

Gentamisin (Duchefa-Hollanda)

Chrysophanol (Cayman-ABD)

Tiyamin (Duchefa-Hollanda)

Kazamino asitler (BD-ABD)

Glukoz (Merck-ABD)

Kloroform (Merck-ABD)

Etil Alkol (Merck-ABD)

Elastin-Kongo Kırmızısı (Sigma-Almanya)

Hidroklorik Asit (Merck-ABD)

Kristal Viyole (Sigma- Almanya)

Skimmed Milk (Sigma- Almanya)

Tris-HCl

CaCl₂

2.1.2.3. Kullanılan Cihazlar

Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek-ABD): Bakterilerin floresans ve absorbans ölçümleri için kullanılmıştır.

Ultra Derin Dondurucu (Esco-Singapur): Suşların -86 °C’de uzun süreli saklanması (3-6 ay) kullanılmıştır.

Derin Dondurucu (Vestel-Türkiye): Suşların -20 °C’de saklanması için kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı (WiseStir-Almanya): Besiyerleri otoklava atılmadan önce karışımın homojenize edilmesi için kullanılmıştır.

UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD): Sıvı bakteri kültürlerinin optik yoğunluklarının ölçümünde kullanılmıştır.

Dijital Hassas Terazı (Ohaus-ABD): Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.

İnkübatör (Memmert-Almanya): Besiyerlerine ekilen suşların inkübasyonu için kullanılmıştır.

Vorteks (Heidolph-Almanya): Sıvı bakteri kültürlerinin ve kimyasalların çalkalanmasında kullanılmıştır.

Buzdolabı (Siemens-Almanya): Kimyasal ve hazırlanan katı-sıvı besiyerlerinin +4 °C’de saklanması için kullanılmıştır.

Otoklav (Nüve-Türkiye): Besiyerlerinin sterilizasyon işlemleri sırasında kullanılmıştır.

Mikropipetler (1000 µl, 100 µl, 10 µl) (Thermo/ Finnpipette-ABD): Besiyerleri, sıvı bakteri kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.

Mikrodalga Fırın (Phillips-ABD): Besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.

Class II Ayaklı Steril Güvenlik Kabini (Esco ve Faster-Singapur ve İtalya): *In vitro* süreçte yapılan bütün deneylerin gerçekleştirilmesi, kimyasalların hazırlanması işlemlerinde kullanılmıştır.

Ultra Distile Saf Su Cihazı (Millipore-ABD): Besiyeri ve kimyasallarda kullanılacak solüsyonların hazırlanması sırasında kullanılmıştır.

2.1.2.4. Besiyerlerinin Hazırlanması

Sıvı besiyeri - Lysogeny Broth (LB)

- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü
- 5 g NaCl

10 g LB broth tartılarak bir miktar distile suda çözülmüştür. Hacmi 500 ml’ye tamamlanarak ardından otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Sıvı minimal besiyeri - M9 Minimal Medium

- 10,5 g M9 Broth
- 5 g Glukoz
- 5 g Kazamino Asitler

- 2 mM MgSO₄
- 0,1 mM CaCl₂

LB besiyerinin oto-floresansı nedeniyle biyomonitör suşlarla yapılan QS deneyinin ölçümlerini etkilemektedir. Bu sebeple deneylerde M9 minimal besiyeri kullanılmıştır. Toz halindeki M9 brothdan 10,5 g tartılmış ve bir miktar distile su ile çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Besiyeri oda sıcaklığına ulaştıktan sonra glukoz, kazamino asitler, tiyamin, MgSO₄ ve CaCl₂ eklenmiş, daha sonra son hacim distile su ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Biyosensör suşlar için 30µg/ml son konsantrasyon olacak şekilde gentamisin antibiyotiği eklenmiştir (Jakobsen ve ark., 2011; Hentzer ve ark., 2002).

Katı besiyeri - Lysogeny Broth Agar (LB Agar)

- 10 g Tripton
- 5 g Maya özütü
- 5 g NaCl
- 12 g Bacto agar

20 g LB broth besiyerinden tartılarak üzerine 12 g Bacto agar eklenmiş ve bir miktar distile suda çözdürülmüştür. Ardından hacmi 1000 ml’ye tamamlanmış ve otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. Dokunulabilir bir sıcaklığa gelene kadar bekletilen besiyeri steril koşullarda Petri kaplarına eşit hacimlerde dağıtılmıştır. Kullanılana kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

2.1.2.5. Kimyasalların Hazırlanması

***Chrysophanol* QSI Çözeltisinin Hazırlanması**

Toz halinde temin edilen saf *Chrysophanol* (Cayman – ABD), dimetil silfoksit (DMSO) içerisinde, stok konsantrasyonu 2.3 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür. Hazırlanan stok çözelti fizyolojik tuzlu su (FTS) ile %6’ya seyreltilmiştir.

Skimmed Milk çözeltisinin hazırlanması

Skimmed milk (yağsız süt) tozundan 1.5 gr tartılmış ve üzerine 100 mL distile su ilave edilerek 1.5%'luk çözelti virülans deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 5 dakika steril edilmiştir.

Elastin Kongo Kırmızısı (ECR) tamponunun hazırlanması

100mM Tris-HCl için Tris-HCl'den 1.57 gram ve 1mM CaCl₂ için CaCl₂'den 11.1 mg tartılmış, az bir miktarda steril distile suda çözölmüş ve 100 ml'ye tamamlanarak p:7.2'ye ayarlanmıştır. 0.45 µm'lık steril filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Elastaz deneyinde kullanılmak üzere 15mg/ml oranında olacak şekilde elastin Kongo kırmızısından tartılıp, tampon eklenerek homojen hale gelene kadar vorteks ile karıştırılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. In siliko

2.2.1.1. MetaCore- MetaDrug Analizi

Clarivate Analytics'ten MetaCore / MetaDrug, moleküllerin farmakodinamik ve farmakokinetik profillerini analiz etmek için kullanılan kapsamlı bir platformdur. Moleküllerin yapısında bulunan benzer kısımlara dayanan QSAR modellerinde analiz edilen bileşikler ve bileşik setleri arasındaki benzerliği bulmak için Tanimoto Önceliklendirme (TP) özelliğini kullanır. MetaCore / MetaDrug'ta türetilen modellerin kalitesi, özgüllük, hassasiyet, doğruluk Matthews Korelasyon Katsayısı (MCC) ile değerlendirilir. 25 adet terapötik aktivitenin tahminini (Alerji, Alzheimer, Anjin, Artrit, Astım, Bakteriyel, Kanser, Depresyon, Diyabet, HIV, Kalp Yetmezliği, Hiperlipidemi, Hipertansiyon, İnflamasyon, Migren, Mantar Hastalığı, Obezite, Osteoporoz, Ağrı, Parkinson, Sedef Hastalığı, Şizofreni, Deri Hastalığı, Tromboz, Viral Hastalıklar) ve 26 adet toksik etkinin (AMES, Anemi, Karsinojenite, Dişi ve Erkek Farede Karsinojenite, Dişi ve Erkek Sıçanlarda Karsinojenite, Kardiyotoksiste, Sitotoksiste modeli, -log GI50

(M), Epididim toksisitesi, Genotoksisite, Hepatoksisite, Böbrek Nekrozu, Böbrek Büyümesi, Karaciğer Kolestazı, Karaciğer Lipid Birikimi, Karaciğer Nekrozu, Karaciğer Büyümesi, Önerilen Maksimum Terapötik Doz (MRTD), Nazal patoloji, Nefron Hasarı, Nefrotoksisite, Nörotoksisite, Akciğer Toksisitesi, Cilt Hassasiyesi, Testis Toksisitesi) tahminini QSAR modelleri ile yapmaktadır. Terapötik aktivite değerinin ≥ 0.50 , toksik etki tahmin değerlerinin ise ≤ 0.50 aralığında olması gereklidir (Durdağı ve ark., 2018)

Chrysophanol'ün Metacore/MetaDrug terapötik ve toksisite tahminleri de belirtilen modellerde yapılmıştır.

2.2.1.2. *Chrysophanol* Molekülünün Üç Boyutlu Yapısının Hazırlanması

PubChem veritabanından *Chrysophanol* molekülünün ve LasI/R, RhIR, PqsR reseptör proteinlerine ait sinyal moleküllerinin üç boyutlu yapıları, sırası ile; 3-oxo-C12-HSL, C4-HSL ve 2-nonylquinolin-4(1H)-one (*NNQ*) sdf formatında indirilmiştir. Ayrıca kontrol olarak kullanılacak olan antagonist moleküller olan *penicillic acid* ve 3-amino-7-chloro-2-nonylquinazolin-4(3H)-one (*QZN*) moleküllerinin de üç boyutlu yapıları sdf formatında indirilmiştir. (Moleküllerin PubChem kodları: 10208, 3246941, 10130163, 9856730, 1268111, 71627415'dir)

Ligandların hazırlanmasındaki tüm süreçlerde Schrödinger moleküler modelleme paketinin modülleri (Ligprep, MacroModel) kullanılmıştır. İndirilen tüm moleküller, LigPrep modülü (Schrödinger LigPrep) kullanılarak OPLS2005 kuvvet alanına göre hazırlanmıştır. Ligandların protonasyon durumlarını ayarlamak için PROPKA ve fizyolojik pH'da (pH=7.4) iyonlaşmasını ve totomerik durumlarını tahmin etmek için Epik (Shelley ve ark., 2007) kullanılmıştır. Elde edilen ligandların enerjilerini minimize etmek için MacroModel modülü kullanılmıştır. Tüm ligandlar OPLS2005 kuvvet alanında, 2500 yinleme ve 0.005kcal/mol yakınsama parametreleri ile minimize edilmiştir.

2.2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Sistemi ve Biyofilm Oluşumu Mekanizmasında Rol Oynayan Proteinlerin Üç Boyutlu Yapılarının Hazırlanması

KEGG PATHWAY veritabanı kullanılarak *P. aeruginosa* bakterisinin QS sinyal sistemi ve biyofilm oluşumu ile doğrudan ilgili reseptör proteinler araştırılmış ve RCSB PDB programından alınan ilgili proteinlerin üç boyutlu yapıları, Protein Hazırlama Sihirbazı (PrepWizard) modülü (Sastry ve ark., 2013) ile moleküler kenetlenmeye hazırlanmıştır. LasI (PDB ID: 1RO5), LasR (PDB ID: 2UV0), PqsR (PDB ID: 4JVI) kristal yapıları protein veri bankasından elde edilmiştir. Elde edilen tüm proteinlerin içerisindeki eksik elementler (örneğin, hidrojen atomları ve eksik atomlar), Protein Hazırlama Sihirbazı modülü (Sastry ve ark., 2013) tarafından eklenmiştir. Ligandların 5 Å civarındaki su molekülleri tutulmuş ve diğer su molekülleri hesaba katılmamışlardır. Ligandların pKa tahmini ve protonasyon durumu, pH 7.4'te hesaplanmıştır. Protein rezidülerinin protonasyon durumlarını pH 7.4'te belirlemek için PROPKA kullanılmıştır. Tüm reseptörler OPLS2005 kuvvet alanında hazırlanmıştır (Li ve ark., 2005; Bas ve ark., 2008).

2.2.1.4. RhIR ye ait Homoloji Model Oluşturulması

RhIR reseptörüne ait kristal yapı bulunmadığı için SWISS- MODEL ile homoloji modelleme yapılmıştır. Reseptöre ait sekans bilgisi FASTA formatında <https://www.uniprot.org/uniprot/P54292> 'dan alınmıştır. Sekans dizisi kullanılarak SWISS-MODEL'de 2q0o.1.A yapısı şablon alınarak model oluşturulmuştur.

Oluşturulan model PrepWizard modülü ile hazırlanmıştır. Hazırlanan modele uzun MD (500ns) simülasyonu yapılmıştır. Trajektöri verilerine, RMSD ve RMSF değerlerine bakılarak en düşük enerjili yapısı representatif olarak alınarak ileriki hesaplamalar (moleküler kenetlenme, moleküler dinamik simülasyonları, MM-GBSA metoduyla serbest enerji hesaplamaları) için şablon olarak kullanılmıştır.

2.2.1.5. Proteinlerin Aktif Bölgelerinin Belirlenmesi

1RO5 (LasI), 2UV0 (LasR) ve 4JVI (PqsR) proteinlerinin aktif bölgelerine ait bilgiler RCSB PDB veritabanında bulunan kristal yapıların elde edildiği referans makalelerden elde edilmiştir.

LasI Proteinin Aktif Bölgesinin Belirlenmesi

AHL Senraz proteini olan LasI (1RO5)'nın aktif bölgesinde bulunan aminoasit rezidü bilgisine kristal makalesi olan Gould ve ark. (2004)'den ulaşılmıştır. Açıl homoserin lakton sentaz (LasI), 3-oxo-C12-açıl taşıyıcı protein (acyl-ACP) ve S-adenozil-L-metiyoninin (SAM) ve 3-oxo-C12-AHL'yi üretir. 3-oxo-C12-HSL molekülünde özellikle 3-oxo-dodecanoyl kısmının uzunlamasına bir konformasyonla LasI'da mevcut olan hidrofobik tünele kolayca bağlandığını göstermişlerdir. Bu tüneli oluşturan rezidüler; TRP33, TRP69, MET79, LEU102, PHE105, THR121, LEU122, MET125, LEU140, THR142, THR144, VAL148, MET151, MET152, ALA155, LEU157, VAL188 ve LEU18'DİR. MET79, PHE105, THR142 ve THR144 rezidüleri AHL sentezi boyunca korunmuş ve açıl zincirini kataliz için uygun bölgede tutmaktadır. V şeklindeki tünelin bitişiğinde bir elektrostatik rezidü olduğu belirtilmektedir. Bu rezidüler; ARG23, ASP42, ASP44, ASP47, ARG70, GLU101, SER103 ve ARG104'tür ve yapılan mutagenез çalışmalar bu rezidülerin AHL sentezi için gerekli olduğunu göstermektedir. LasI'de GLU101'e bağlanan su molekülü, AHL sentezlerinde yaygın olarak korunan bir su molekülüdür ve AHL sentezlerinin katalitik mekanizmasında rol oynamaktadır. SAM bağlanma bölgesini içeren rezidüler PHE27, ARG30, TRP33'dür.

Yukarıdaki bilgiler göz önüne alındığında çalışmada kullanılacak olan LasI (1RO5) proteini için belirlenen aktif bölge içinde bulunan rezidüler; ARG30, TRP33, TRP69, MET79, LEU102, PHE105, THR121, LEU122, MET125, LEU140, THR142, THR144, VAL148, MET151, MET152, ALA155, LEU157, VAL188, LEU18, ARG23, ASP42, ASP44, ASP47, ARG70, GLU101, SER103 ve ARG104'tür.

LasR' nin Aktif Bölgesinin Belirlenmesi

LasR reseptörü için 2UV0 kodlu (PDB) kristali kullanılmıştır. Protein, endojen ligand ile (3-oxo-C12-HSL) kristallendirildiği için aktif bölgenin yeri ve bulundurduğu rezidüler bellidir. Bu kristal yapıya ait makalede (Bottomley ve ark., 2009), LasR dimerizasyonunun meydana gelmesi ile birlikte, promoter DNA'nın bağlanmasını ve quorum sensing kontrollü genlerin transkripsiyonel aktivasyonun gerçekleşmesine sebep olduğu belirtilmiştir.

LasR kristal yapısının ligand bağlanma bölgesinde kendisinin endojen ligandı olan 3-oxo-C12-AHL bulunmaktadır. LasR'de altı adet moleküller arası hidrojen bağı görülmektedir. Bunlar TYR56, TRP60, ARG61, ASP73, THR75 ve SER129'dur. Özellikle TYR56, TRP60, ASP73 ve SER129, aynı HSL ana gruplarına sahip AHL'ler tarafından paylaşılan aktivasyon mekanizmasını yansıtan LuxR homologlarında güçlü bir şekilde korunmaktadır. LasR kompleksinde, HSL'nin 1-okso grubu, hem TYR56 hem de SER129'a doğrudan H bağları oluştururken, 3-oxo grubu H, bir su molekülü yoluyla ARG61 yan zincirine bağlanır.

12-karbon uzunluğundaki AHL, LEU36, GLY38, LEU39, LEU40, TYR47, GLU48, ALA50, ILE52, TYR56, TRP60, ARG61, TYR64, ASP65, GLY68, TYR69, ALA70, ASP73, PRO74, THR75, VAL76, CYS79, THR80, TRP88, TYR93, PHE101, PHE102, ALA105, LEU110, THR115, LEU125, GLY126, ALA127 ve SER129 rezidülerinden oluşan büyük bir hidrofobik cep içinde konumlanmıştır.

RhlR'nin Aktif Bölgesinin Belirlenmesi

RhlR, otoindüktör tarafından düzenlenmiş transkripsiyonel düzenleyici protein ailesine aittir. Kristali olmamasından dolayı sonraki hesaplamalarda kullanılmak üzere kullanılacak olan yapı SWISS-MODEL sunucusu kullanılarak elde edilmiştir. Annapoorani ve ark. (2012) RhlR'nin aktif bölgesinde bulunan rezidülerin PHE40, TYR42, GLU32, THR63, TYR77, GLU59, THR58, ASP168, SER16, GLY119 Ve TRP124 olduğunu bildirmiştir.

PqsR' nin Aktif Bölgesinin Belirlenmesi

PqsR reseptörüne ait bulunan kristalin üç adet formu bulunmaktadır (PDB). 4JVC apo formu olup ligand içermemektedir. 4JVD yapısı agonist etki gösteren NNQ ligandı ile kristallendirilmiştir. 4JVI yapısı ise antagonist etki gösteren QZN ligandı ile kristallendirilmiştir. Moleküler kenetlenme simülasyonlarında kullanılmak üzere 4JVI yapısı seçilmiştir. Ligand (QZN) ile kristallendirildiğinden dolayı proteinin aktif bölgesi bilinmektedir.

Referans makalesinin içerdiği bilgilere göre (Ilangonav ve ark., 2013) önemli hidrofobik etkileşim kuran rezidüler; ILE149, ALA168, VAL170, ILE186, LEU189, LEU207, LEU208, ILE236 ve TYR258 olarak bildirilmektedir.

2.2.1.6. Moleküler Kenetlenme Simülasyonları

Schrödinger Moleküler Modelleme yazılımına ait Maestro programında Glide/SP (Standard Precision) (Friesner ve ark., 2004, Halgren ve ark., 2004) protokolü varsayılan (default) değerlerde kullanılmıştır. Simülasyon kutusu kristalin ligand bağlanma bölgesini içeren aminoasit rezidüleri ile tanımlanmış ve her bir ligand için maksimum 15 poz istenmiştir.

2.2.1.7. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları

MD simülasyonlarında kullanılmak üzere her bir protein- ligand kompleks yapısından (LasI, LasR, RhIR ve PqsR) en iyi kenetlenme skorunu veren yapılar alınmıştır. Hedef yapıların apo (ligandsız) ve halo (ligandlı) formu için simülasyonlar Desmond (Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2017) ile yapılmıştır. Her bir sistemde kullanılan sistem kutusunun büyüklüğü 10- 10-10 Å olarak ayarlanmış ve kutu şekli ortrombik olarak belirtilmiştir. Sistemin hazırlanmasında açık su molekülleri (SPC) (Berendsen ve ark., 1981) kullanılmış ve ayrıca sistemin nötralizasyonu için 0.15 M NaCl iyon konsantrasyonu eklenmiştir. MD simülasyonlarında, NPT 310 K'da (Evans ve Holian, 1985) ve Martyna-Tobias-Klein barostat (Martyna, 1994) aracılığıyla 1,01 bar'lık sabit basınç sağlanmıştır. Coulomb etkileşimlerinin hesaplanmasında Particle Mesh Ewald (PME) (Essmann ve ark., 1995)

protokolü kullanılmıştır. OPLS 2005 kuvvet alanına göre hazırlanan tüm sistemler için uzun simülasyon (250nanosaniye) yapılmıştır.

2.2.1.8. Moleküler Mekanik / Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı (MM / GBSA) Analizleri

MM/GBSA hesapları Schrödinger Desmond programının Prime modülü ile gerçekleştirilmiştir (Onurfriev, 2004). 250 nanosaniyelik simülasyonların yarısından itibaren (125 – 250ns) 100 adet frame seçilmiş ve komplekslerin serbest bağlanma enerjilerinin tahmini için OPLS2005 kuvvel alanı (Banks ve ark., 2005) ve VSGB 2.0 çözme modeli (Li ve ark., 2011) kullanılmıştır.

2.2.2. *In vitro*

2.2.2.1. Bakteri Suşlarının Temini, Saklanması ve Çoğaltılması

Floresan biyomonitör suşlar, QS ile regüle edilen *lasB* (elastaz) ve *rhIA* (ramnosiltransferaz 1 alt birim A) ve *pqsA* genleri ile GFP füzyonu ve marker olarak gentamisin direnç geni bulundurmaktadır. QS mekanizması aktif hale geldiğinde bu genlerin ekspresyonu gerçekleşmekte ve GFP sentezi ile floresan ışıma oluşmaktadır. QS sisteminin çalışmasını, bakteri yoğunluğu (OD) ve floresan miktarının normalize edilmesiyle incelemek mümkündür.

Kullanılan tüm bakteri suşları Kopenhag Üniversitesi, Tim Holm Jakobsen ve Michael Givskov'dan temin edilmiştir (**Tablo 2.1**). Bakteri stok kültürleri, -80 °C'de %50 gliserol içerisinde saklanmıştır. Tüm suşlar stoklardaki kültürden LB Broth besiyerine 2 gün ard arda pasaj geçildikten sonra deney sırasında kullanılmıştır. Sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin saflığı LB Agar besiyeri içeren Petrilere plağa çizim yöntemi ile kontrol edilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan suşlar

<i>P. aeruginosa</i>	Suş	Tanımı	Referans
	PAO1	Yabanıl tip (Wild type) (ATCC15692)	Holloway and Morgan, 1986
	<i>rhlA-gfp</i>	Gm ^{r-30γ} ; PAO1-ATCC, <i>PrhlA</i> - <i>gfp</i> (ASV)- <i>Plac-rhlR</i> - mini-Tn5	Yang et al., 2009
	<i>lasB-gfp</i>	türevi: pMHRA Gm ^{r-30γ} ; PAO1-ATCC, <i>PlasB</i> - <i>gfp</i> (ASV)- <i>Plac-lasR</i> - mini-Tn5	Hentzer et al., 2002
	<i>pqsA-gfp</i>	türevi pMHLAS Gm ^r ; PAO1-ATCC, <i>PpqsA-gfp</i> (ASV)- <i>Plac-lasR</i> - mini-Tn7 türevi-eGFP: pMHLAS	Yang et al., 2007

2.2.2.2. Bakteri Suşlarının Uygulanacak Yoğunluklarının Belirlenmesi

M9 besiyerinde 37 °C’de 24 saat inkübe edilen bakterilerin dansiteleri UV-Vis spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD) kullanılarak belirlenmiştir. 625 nm dalga boyunda optik dansiteleri (OD) McFarland 1 standardına (yaklaşık 3x10⁸ cfu/ml) ulaşacak şekilde ayarlanmıştır.

2.2.2.3. *Chrysophanol* QSI Etkilerinin Belirlenmesi

Chrysophanol’e ait QSI etkisinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu multimod mikrolaka okuyucu kullanılmıştır. 96 kuyucuklu optik siyah mikrolakaların tüm kuyucuklarına 100’er µl M9 minimal besiyeri çoklu pipet yardımıyla dağıtılmıştır. . Mikrolakalarda düşey sıralardaki ilk kuyucuklara 100’er µl stok *Chrysophanol* QSI çözeltisi eklendikten sonra pipetaj yapılmış ve 100 µl çekilerek bir sonraki kuyucuğa aktarılmıştır. Bu işlem istenen doz miktarına göre tekrarlanarak her kuyucukta ½ oranında azalan bir seri dilüsyon elde edilmiştir. McFarland 1 standardına ayarlanmış biyosensör suşlardan 100 µl blank (sadece besiyeri içeren kuyucuk hariç) tüm kuyucuklara eklenmiştir. Negatif kontrolü içeren ve uygulama yapılan tüm kuyucuklarda bakteri yoğunluğu 0,5 McFarland standardına ayarlanmıştır. Tüm kuyucukların son hacmi 200

μ l olmuştur. *Chrysophanol* uygulaması yapılan kuyucuklar 0,5 McFarland konsantrasyonunda bakteri ve 135,8 μ M, 67,9 μ M ve 33,9 μ M *chrysophanol* çözeltisi konsantrasyonlarına sahip olmuştur. Kör olarak M9 minimal besiyeri, negatif kontrol olarak M9 besiyeri ile bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. Kontrol olarak literatürde *P. aeruginosa*'da QSI etkisi bilinen *penicillic acid* ve kullanılmış ve *chrysophanol* ile QSI etkisi karşılaştırılmıştır. Biyomonitör suşların GFP ekspresyon miktarı Biotek multimod mikroparka okuyucu ile 37°C'de 16 saat boyunca 485 nm eksitasyon ve 535 nm emisyon dalga boylarındaki floresan ölçümleri ile büyüme miktarını gözlemlemek için OD450 ve OD600 nm absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.2.4. *Chrysophanol P. aeruginosa* Biyofilm Formu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Chrysophanol çözeltisinin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerindeki antibiyofilm testleri 96 kuyucuklu mikroparkalar kullanılarak yapılmıştır. M9 minimal besiyeri 50'şer μ l olacak şekilde bütün kuyucuklara eklenmiştir. *Chrysophanol* çözeltisi yatay düzlemde bulunan her sıranın ilk kuyucuklarına mikropipet yardımıyla 50'şer μ l eklenmiştir. Özüt eklenen her kuyucuğa eşit sayıda pipetaj yapılarak 50'şer μ l çekilmiş ve bir sonraki kuyucuğa eklenmiştir. Bu işlem tekrar sayısına göre tekrarlanmıştır. Son olarak üçüncü kuyucuklara pipetaj yapılmış ve 50'şer μ l çekilerek toplam da üç farklı konsantrasyon olacak şekilde $\frac{1}{2}$ oranında özüt konsantrasyonu elde edilmiştir. Bir gecelik *P.aeruginosa* PAO1 süspansiyonu OD 600nm: 0.02 olacak biçimde ayarlanmış ve 50'şer μ l kör olarak belirlenen kuyucuklar haricinde bütün kuyucuklara eklenmiştir. Negatif kontrol olarak M9 besiyeri ile bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. Mikroparkalar 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübe süresinin sonunda mikroparkalar planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla mikroparka dağıtıcı ile 3 kez steril FTS ile yıkanmıştır. Yıkanan mikroparkalar 60°C'de 15-20 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra üzerlerine 125 μ l %0.1'lik kristal viyole solüsyonu eklenmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme işlemi bittiğinde fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla mikroparkalar distile su ile 3'er kez yıkanmış ve 1 saat boyunca 60°C 'de kurutulmuştur. Mikroparkalar kuruduktan sonra 125'şer μ l %96'lık etanol eklenmiştir (Bu işlemdeki amaç boyanan biyofilm tabakasının homojen bir şekilde çözülerek ölçülmesini

sağlamaktır.). Cytation 3 (BioTek) cihazı kullanılarak 590 nm’de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm testler 3 kere tekrarlanmış ve inhibisyon oranlarının ortalamaları alınarak % standart hata hesaplanmıştır.

2.2.2.5. *P.aeruginosa*’ya ait Virülans Faktörlerin İnhibisyonu

Piyosiyanın

Piyosiyanın ekstraksiyonu ve ölçümleri Essar ve ark. 1990’nın (Essar ve ark., 1990) geliştirdiği metoda göre yapılmıştır.

135,8 µM *Chrysophanol* çözeltisi, *P. aeruginosa* PAO1 suşu ile LB besiyeri ortamında 24 saat boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir. Oluşan kültürler 10 dakika boyunca 12000g devrinde santrifüjlenmiş ve süpernatantlar, hücresiz filtratlar elde etmek için filtrelerden geçirilmiştir. Filtrasyon sonucu oluşan 5 ml süzüntü üzerine, 3 ml kloroform ile eklenmiştir. Kloroform fazı alınarak üzerine 1 ml 0.2 M HCl ile eklenmiştir. Pembe renkteki HCl fazı OD 520 nm’de ölçülmüştür. Piyosiyanın üretimi, uygulama yapılan ve yapılmayan kontrol grupları arasındaki OD/absorbans oranları ile değerlendirilmiştir.

Elastaz

Elastaz aktivitesi Ohman ve arkadaşlarının (Ohman ve ark., 1980) geliştirdiği Elastin Kongo Kırmızısı (ECR) deneyi ile belirlenmiştir. Hücresiz filtratları elde etme işlemi piyosiyanın deneyi ile ortak yürümüştür. Hücresiz süpernatanttan 500 µl alınarak üzerine ECR tamponundan (0.1 M Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.5) 500 µl (20mg/ml şeklinde hazırlanmıştır) eklenmiş ve 37 ° C’de 3 saat boyunca sürekli çalkalanarak inkübe edilmiştir. Çözünmeyen ECR santrifüj ile ayrılmıştır. OD 495 nm’de absorbans değerleri ölçülerek elastaz üretimi, muamele edilen ve muamele edilmeyen kontrol grupları arasındaki OD oranları ile değerlendirilmiştir.

Proteaz

Hücresiz filtratların proteaz aktivite deneyi El-Mowafy ve ark. (2014)’a göre yapılmıştır. 500 µl filtrat üzerine % 1.25’lik yağsız süt (skimmed milk) ile eklendikten sonra çözelti 30 dakika boyunca 37 ° C’da bekletilmiştir. Çözeltiler için OD 600 nm ‘de

ölçülerek proteaz aktivitesi, muamele edilen ve muamele edilmeyen kontrol grupları arasındaki OD oranları ile değerlendirilmiştir.



3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Bulgular

3.1.1. Metacore/MetaDrug Analizleri

637 adet liken sekonder metaboliti içeren molekül kütüphanesinde MetaCore™/MetaDrug™ terapötik aktivite ve QSAR modellerinden başarılı olan moleküller ön çalışma olarak belirlenmiştir. Tablo 3 ve 4'te bu tez çalışmasında kullanılan *Chrysophanol* ve literatürce bilinen QSI molekül olan *penicillic acid*'in toksik etki tahminleri ve terapötik aktivite tahminleri verilmiştir.

Tablo 3.1 *Chrysophanol* ve *penicillic acid* moleküllerinin toksik etkilerinin tahminine ilişkin veriler.

Toksik etkilerin tahmini	<i>Chrysophanol</i> Değer/TP	<i>Penicillic acid</i>
AMES (TP)	0.99 (89.32)	0.19 (31.76)
Sitotoksik model, -log GI50 (M) (TP)	5.20 (81.75)	4.76 (38.68)
MRTD,Önerilen Maksimum Terapötik Doz(TP)	0.28 (49.04)	1.42 (37.04)
Anemi (TP)	0.56 (43.80)	0.57 (36.65)
Karsinojenite (TP)	0.49 (89.32)	0.45 (37.72)
Dişi farede karsinojenite (TP)	0.29 (59.22)	0.49 (30.51)
Erkek farede karsinojenite (TP)	0.33 (89.32)	0.53 (30.00)
Dişi sıçanda karsinojenite (TP)	0.42 (59.22)	0.44 (37.72)
Erkek sıçanda karsinojenite(TP)	0.46 (89.32)	0.56 (37.72)
Kardiyotoksisite (TP)	0.88 (60.13)	0.65 (26.45)
Genotoksisite (TP)	0.36 (43.67)	0.46 (30.51)
Hepatoksisite (TP)	0.62 (85.44)	0.81 (100.00)
Nefrotoksisite (TP)	0.55 (60.50)	0.60 (37.04)
Nörotoksisite (TP)	0.50 (42.03)	0.73 (28.37)
Karaciğer kolestazı (TP)	0.66 (41.78)	0.65 (27.73)

Karaciğer lipid birikimi (TP)	0.35 (50.40)	0.61 (30.82)
Karaciğer nekrozu (TP)	0.54 (60.13)	0.20 (28.92)
Karaciğer büyümesi (TP)	0.40 (60.50)	0.61 (28.75)
Böbrek nekrozu (TP)	0.40 (60.13)	0.65 (27.71)
Böbrek büyümesi (TP)	0.73 (60.50)	0.87 (28.75)
Nefron hasarı (TP)	0.38 (60.13)	0.73 (37.04)
Cilt hassasiyeti, EC3 (TP)	15.26 (42.48)	20.47 (28.57)
Nazal patoloji (TP)	0.11 (40.54)	0.65 (27.45)
Testis toksisitesi (TP)	0.37 (65.61)	0.28 (37.04)
Akciğer toksisitesi (TP)	0.53 (94.50)	0.43 (32.94)
Epididim toksisitesi (TP)	0.73 (50.40)	0.49 (37.04)

Tablo 3.1'de *Chrysophanol* ve *penicillic acid* moleküllerine ait 26 adet QSAR modelinde toksisite tahminleri verilmiştir. Toksikite değeri ≥ 50 den büyük olan değerler molekülün belirtilen QSAR modelinde toksik olduğu anlamına gelmekte ve kırmızı ile işaretlenen satırlar ile ifade edilmektedir. Yeşil ile işaretlenen satırlar ise belirtilen QSAR modelinde molekülün toksik olmadığını belirtmektedir. Bu tahminlere göre dişi/erkek fare ve/veya sıçan karsinogenitesine bakıldığında *Chrysophanol* *penicillic acid*'e göre daha az toksik etki göstermektedir. *Chrysophanol*'ün nörotoksik özelliği *penicillic acid* den daha azdır. Her iki molekül de deri hassasiyeti, testis toksisitesi, genotoksisite de yapılan modellere göre toksik etkiye sebep olmamaktadır.

Tablo 3.2. *Chrysophanol* ve *penicillic acid* moleküllerinin terapötik etkilerinin tahminine ilişkin verileri.

Terapötik aktivite tahmini	<i>Chrysophanol</i> Değer/ TP	<i>Penicillic acid</i> Değer/TP
Depresyon (TP)	0.11 (53.45)	0.09 (30.00)
Bakteriyel (TP)	0.19 (51.89)	0.47 (32.94)
Kanser (TP)	0.61 (65.61)	0.26 (34.78)
HIV (TP)	0.45 (63.06)	0.46 (31.15)
Kalp yetmezliği (TP)	0.09 (43.75)	0.15 (31.15)
Hiperlipidemi (TP)	0.40 (42.42)	0.47 (32.94)

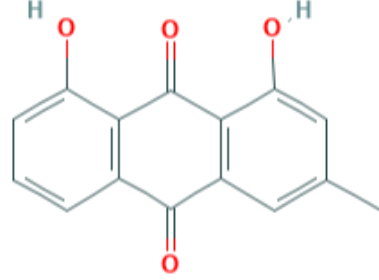
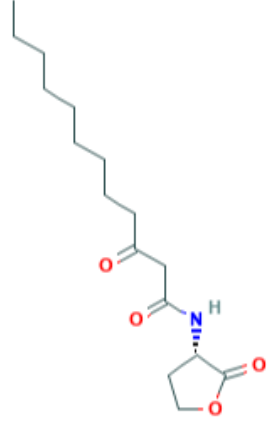
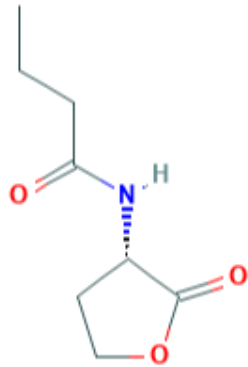
Obezite (TP)	0.74 (42.74)	0.32 (29.22)
Alerji (TP)	0.51 (85.44)	0.49 (29.91)
Alzheimer (TP)	0.18 (40.91)	0.40 (29.85)
Parkinson (TP)	0.09 (40.94)	0.51 (36.65)
Tromboz (TP)	0.48 (85.44)	0.20 (37.04)
Diyabet (TP)	0.20 (36.70)	0.62 (28.57)
Sedef hastalığı (TP)	0.31 (85.44)	0.24 (51.75)
Viral (TP)	0.07 (45.63)	0.12 (29.85)
Migren (TP)	0.43 (63.06)	0.58 (31.15)
Hipertansiyon (TP)	0.16 (42.59)	0.29 (52.21)
Astım (TP)	0.53 (46.32)	0.64 (31.15)
Ağrı (TP)	0.80 (54.19)	0.81 (29.91)
Deri hastalığı (TP)	0.80 (65.69)	0.79 (29.85)
Osteoporoz(TP)	0.50 (42.74)	0.45 (32.94)
İltihap (TP)	0.46 (65.61)	0.26 (37.04)
Anjin (TP)	0.19 (89.32)	0.20 (34.78)
Artrit(TP)	0.34 (42.74)	0.49 (37.04)
Mantar hastalığı (TP)	0.57 (43.75)	0.36 (27.50)
Şizofreni (TP)	0.53 (85.44)	0.36 (29.79)

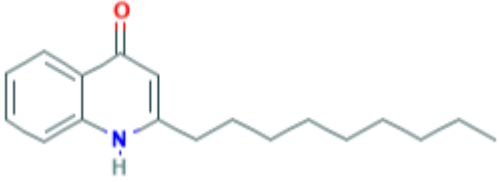
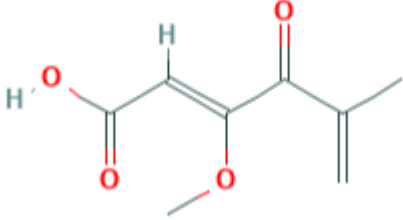
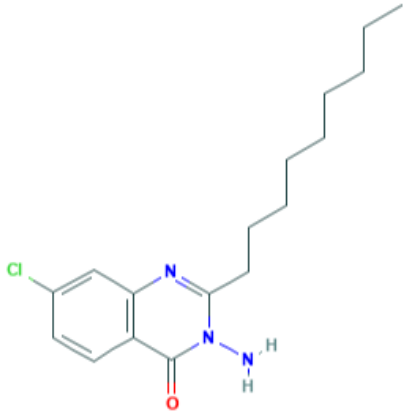
Tablo. 3.2'de yapılan MetaCore™/MetaDrug™ terapötik aktivite analizlerinde 25 adet hastalığa ait QSAR modeli verilmiştir. Yeşil ile boyanan satırlar terapötik aktivitesinin olduğunu, kırmızı olan satırlar molekülün terapötik aktivite göstermediğini belirtmektedir. Bu modeller incelendiğinde ≥ 50 olan değerler terapötik olarak aktif anlamına gelir. Yani hastalığın seyrinde pozitif yönde etkisi olabilir anlamına gelebilmektedir.

3.1.2. Ligandların Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan tüm ligandlar Schrödinger moleküler modelleme paketinin LigPrep modülünde hazırlanmıştır (**Yöntem 2.2.1.2**).

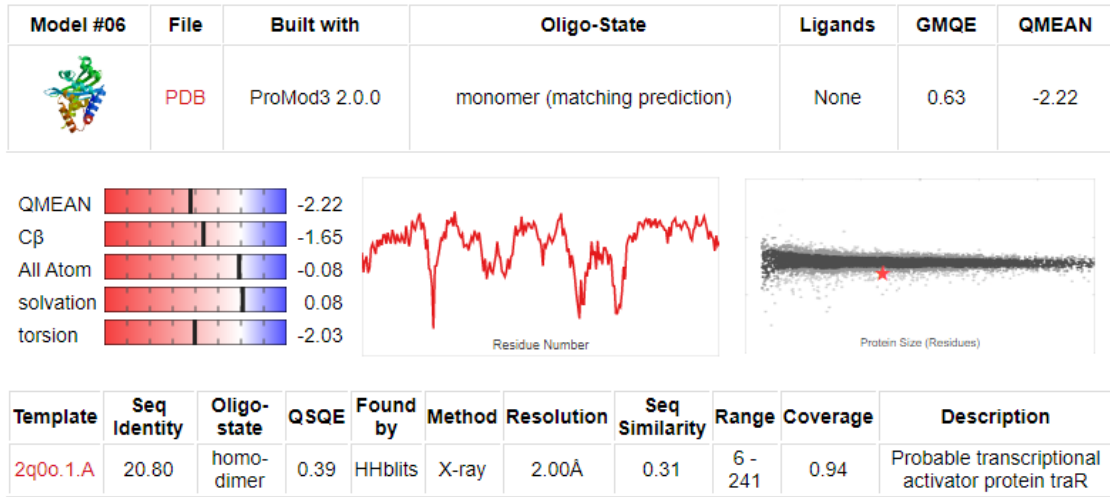
Tablo 3.3. *Chrysophanol*, agonist ve antagonist moleküllerin 2 boyutlu yapıları (PubChem).

Molekül ismi	PubChem No.	2B yapı
<i>Chrysophanol</i>	10208	
3-oxo-C12-HSL	3246941	
c4-hsl	10130163	

2-nonylquinolin-4(1H)-one (NNQ)	9856730	
penicillic acid	1268111	
3-amino-7-chloro-2-nonylquinazolin-4(3H)-one	71627415	

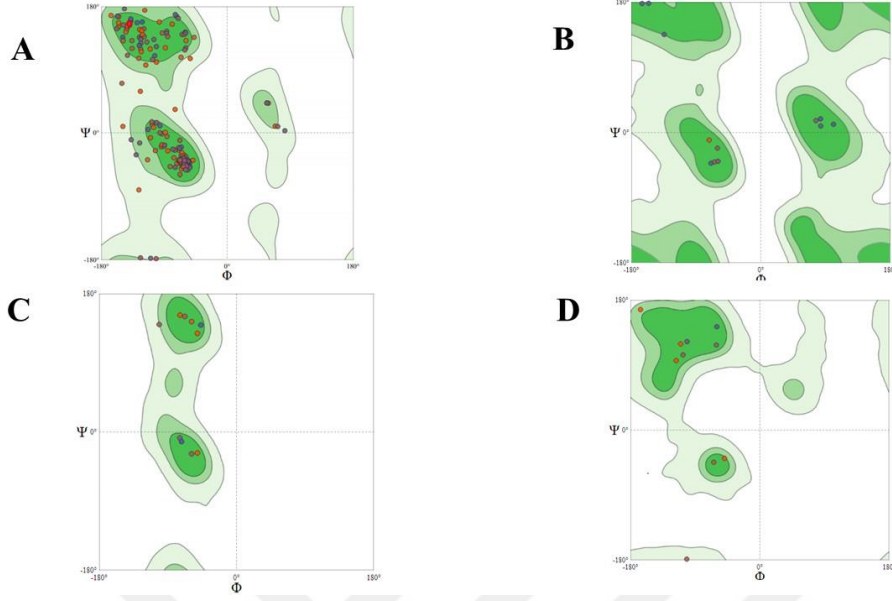
3.1.3. RhlR ye Ait Homoloji Model Oluşturulması

SWISS-MODEL ile yapılan homoloji modeline ait sonuçlar aşağıda belirtildiği gibidir. **Şekil 3.1.**'de sunucunun model sonunda verdiği rapor dosyasında bulunan modelin kalitesine ait veriler bulunmaktadır.



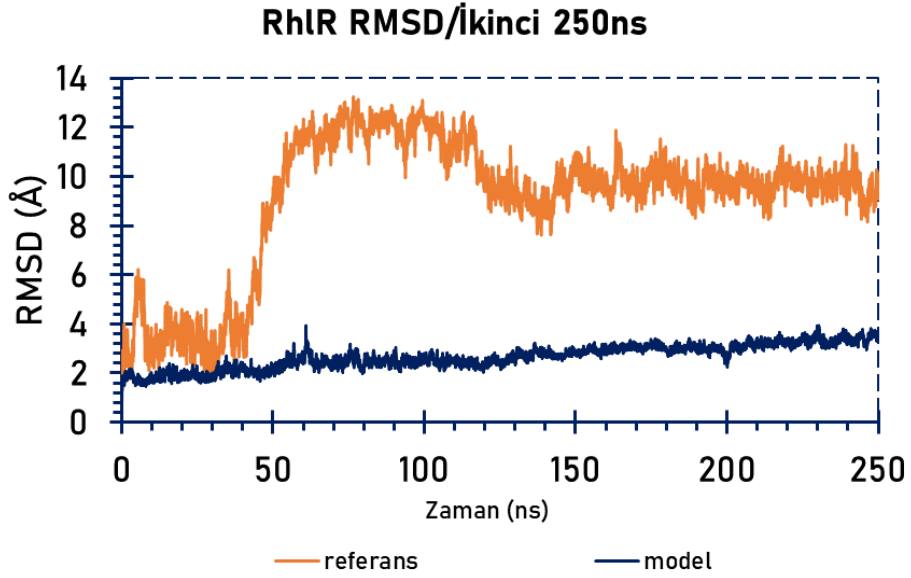
Şekil 3.1. SWISS-MODEL'de modellenen RhlR'ye reseptörüne ait kalite verileri

Ramachandran grafiği, protein yapısındaki amino asit rezidülerine karşı backbone(omurga) dihedral açıları için enerjisel olarak tercih edilen izin verilen ve izin verilmeyen bölgeleri görselleştirmektedir (**Şekil 3.2.**). Ramachandran grafiğinin değerlendirilmesinde bazı skorlar söz konusudur. RhlR modelinde istenmeyen bölgelerde (Ramachandran outliers) aminoasit bulunmadığı (%0), rezidülerin %94,87si izin verilen bölgelerde (Ramachandran favoured) olduğu belirlenmiştir.

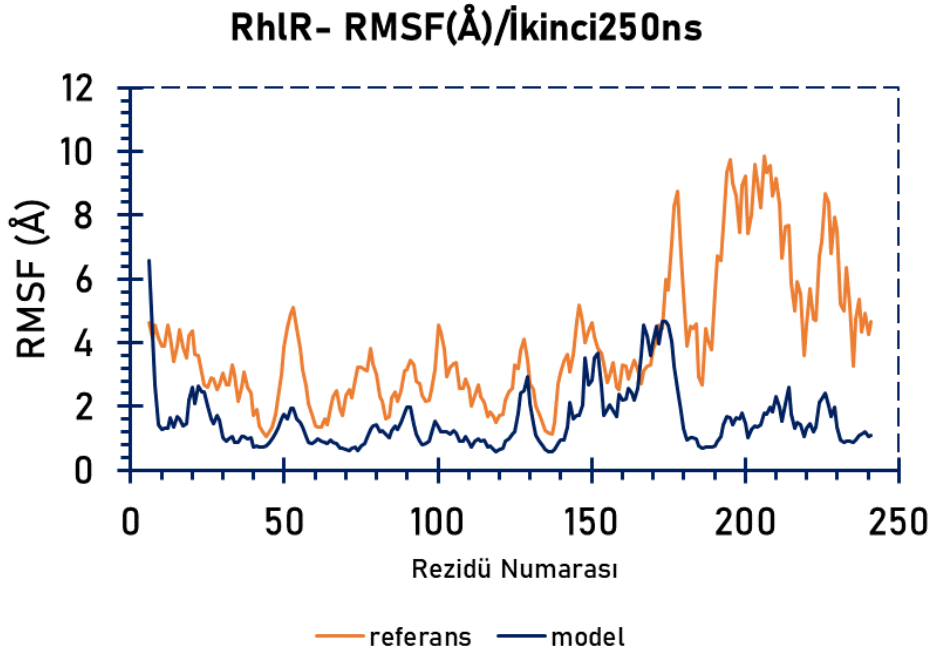


Şekil 3.2 Homoloji modellemesinden türetilen RhlR protein yapısının ramachandran grafiği **A.** Genel **B.** Glisin **C.** Prolin **D.** Pre-Prolin

RhlR reseptörü için ideal modelin değerlendirilmesi ve validasyonu aşamasında Annaporouni ve ark. (2012) nın kullandığı model <http://www.proteinmodelportal.org/query/uniprot/P54292> ile tez çalışmasında hazırlanan modelin uzun MD simülasyonları sonucunda, elde ettiğimiz modelin daha stabil olduğu sonucuna RMSD (**Şekil. 3.3.**) ve RMSF (**Şekil. 3.4.**) analizleri incelenerek karar verilmiştir. Çalışmamızda elde edilen modelin 500 ns MD simülasyonun son 250 nanosaniyelik trajektörisi içinden en düşük RMSD değerini veren yapı representatif olarak alınarak bağlanma paketi belirlenmiştir (**Şekil 3.35**).



Şekil 3.3 RhIR'ye ait referans yapı ve homoloji model için yapılan son 250 ns uzun MD RMSD/Zaman(ns) grafiği

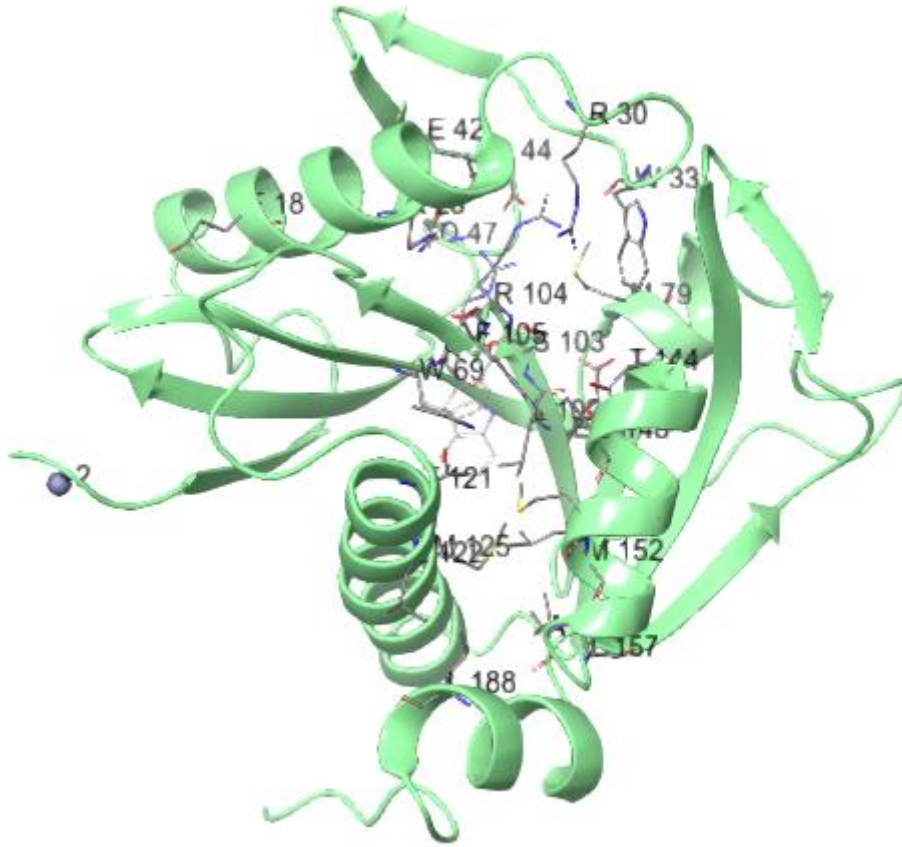


Şekil 3.4 RhIR'ye ait referans yapı ve homoloji model için yapılan son 250 ns uzun simülasyonun RMSF/Zaman(ns) grafiği

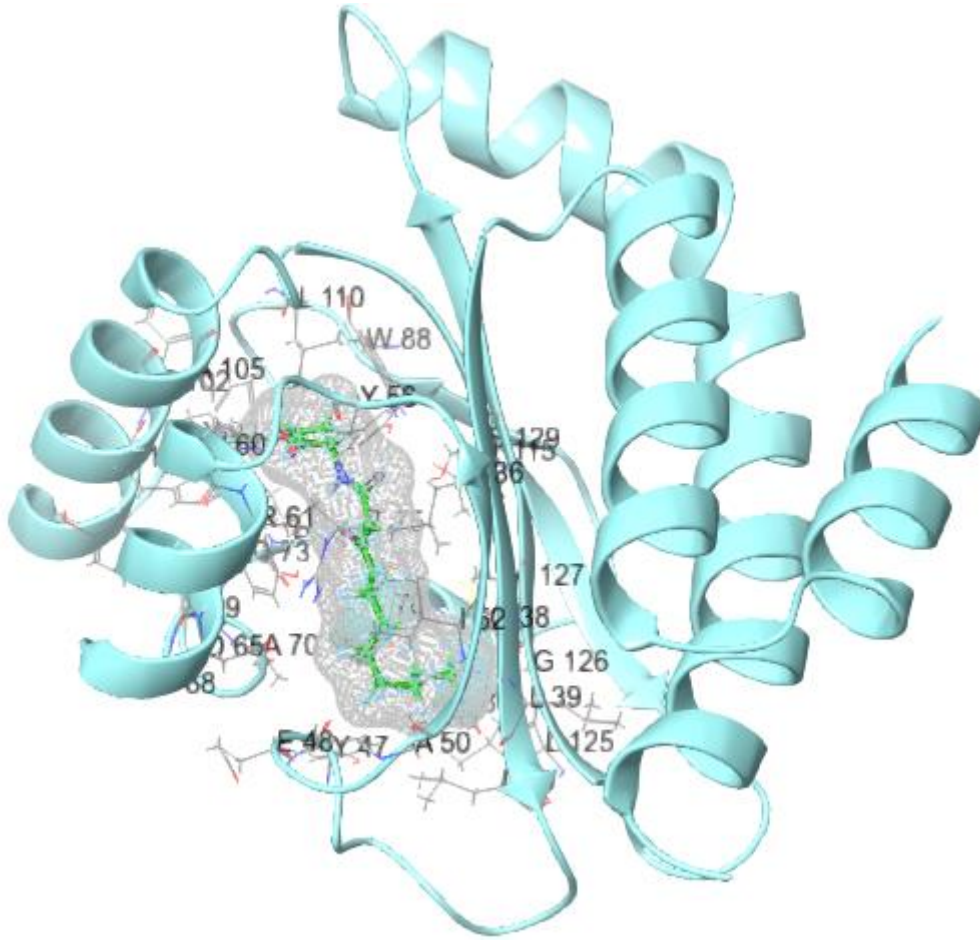
3.1.4. *Chrysophanol*ün las Sistemi Üzerine *in siliko* ve *in vitro* Analizi

3.1.4.1. Moleküler Kenetlenme

Las sistemi için önemli proteinler olan LasI ve LasR proteinleri **Yöntem. 2.2.1.3'deki** protokole göre Protein Preparation Wizard modülü ile moleküler kenetlenme için hazırlanmıştır. LasI (**Yöntem 2.2.1.5.1**) ve LasR (**Yöntem 2.2.1.5.2**) proteinlerin aktif bölgeleri (grid generation) belirlenmiştir. 1RO5 (LasI) ve 2UV0 (LasR) için oluşturulan gridlerin 3B yapısı **Şekil 3.5** ve **Şekil 3.6**'da gösterilmiştir. Oluşturulan gridler ile hazırlanan ligandların moleküler kenetlenme simülasyonlarında **Yöntem 2.2.1.6'de** belirtilen Glide modülünün SP (Standard Precision) protokolü kullanılmıştır.



Şekil 3.5. 1RO5 reseptörünün aktif bölgesi ve ilgili aminoasitler.



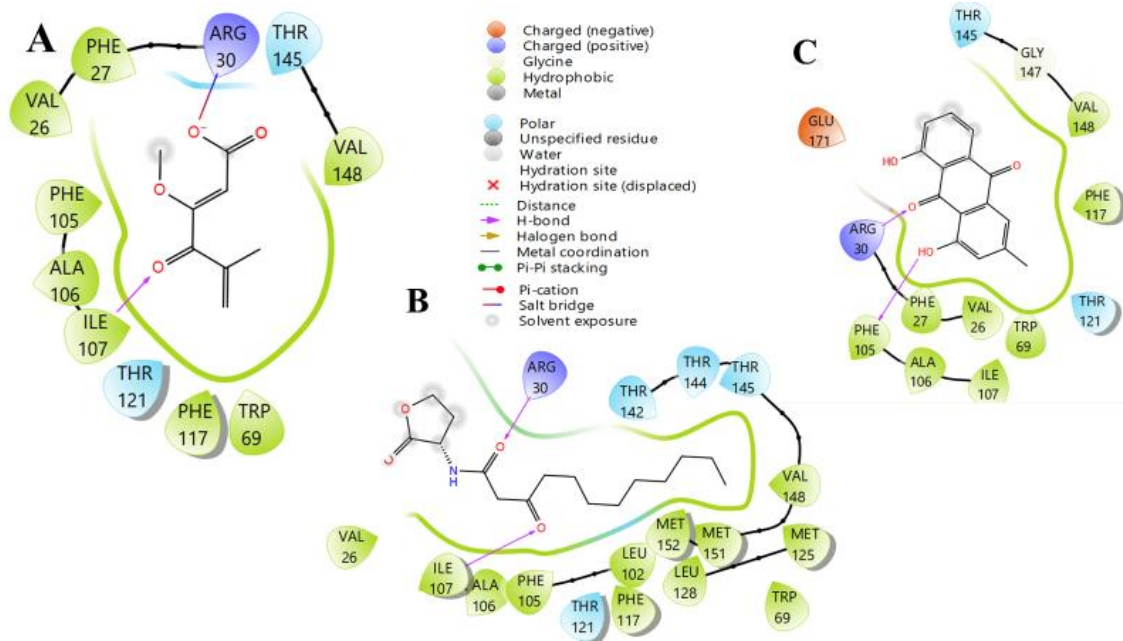
Şekil 3.6. 2UV0 reseptörü ve endojen ligandın bulunduğu hidrofobik cep

LasI ve LasR proteinleri için moleküler kenetlenme simülasyonlarında en güçlü bağlanma enerjisini ve etkileşimi veren pozlara ait skorlar **Tablo 3.4**'te verilmiştir.

Tablo 3.4. LasI ve LasR proteinlerine ait moleküler kenetlenme skorları

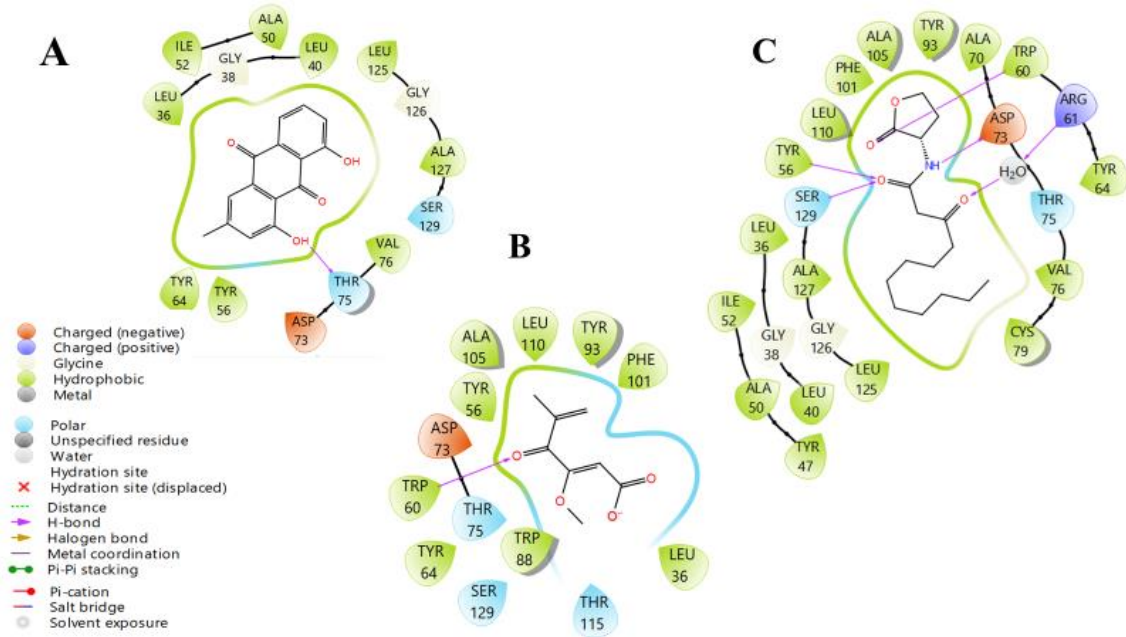
	Glide/SP moleküler kenetlenme skoru (kcal/mol)		
	<i>chrysophanol</i>	<i>penicillic acid</i>	3-oxo-C12-HSL
1RO5(LasI)	-5.85	-3.51	-2.39
2UV0(LasR)	-6.83	-2.86	-8.39

Her bir protein-ligand kompleksine ait moleküler kenetlenme simülasyonlarından alınan en yüksek skorlu komplekslerin 2B ligand bağlantı diyagramları **Şekil 3.7** ve **Şekil 3.8**'de verilmiştir.



Şekil 3.7. 1RO5 proteini ile **A.** penicillic acid, **B.** 3-oxo-C12-HSL, **C.** *Chrysophanol* komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı

1RO5- *penicillic acid* kompleksinde (**A**), *penicillic acid* ARG30 ile tuz köprüsü, ILE107 ile hidrojen bağı kurmuştur. 1RO5-*chrysophanol* kompleksinde (**B**), *chrysophanol* ARG30 ve PHE105 ile hidrojen bağı kurmuştur. 1RO5- 3-oxo-C12-HSL kompleksinde ise (**C**), 3-oxo-C12-HSL ARG30 ve ILE107 aminoasit rezüleri ile hidrojen bağı kurmuştur.



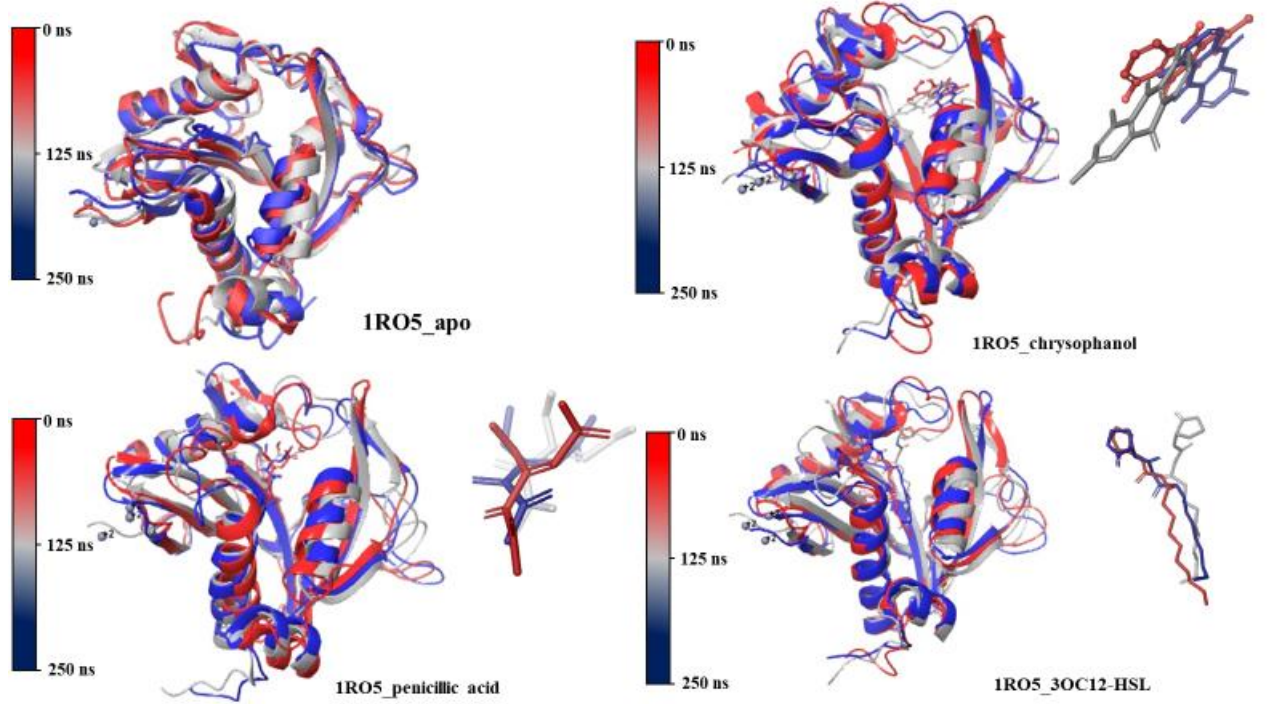
Şekil 3.8. 2UV0 proteini ile **A.** *Chrysophanol*, **B.** *penicillic acid*, **C.** 3-oxo-C12-HSL komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı

2UV0-*chrysophanol* kompleksinde **(A)**, *Chrysophanol* THR75 ile hidrojen bağı kurarken; *penicillic acid* kompleksine **(B)** bakıldığında, TRP60 ile H bağı kurmuştur. 3-oxo-C12-HSL kompleksinde **(C)** ise TYR56, TRP60, ASP73 ve SER129 aminoasitleri ile H bağı kurmuştur.

3.1.4.2. Moleküler Dinamik (MD) Simülasyonları

MD simülasyonları, ligand / protein etkileşimlerinin yapısal ve dinamik profilini atomistik ayrıntıda nitel ve nicel olarak incelemek için gereklidir (Durdağı ve ark, 2018). Bu sebeple *chrysophanol*'ün las sistemi üzerindeki etki dinamiğini incelemek üzere bu tez çalışmasında MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Moleküler kenetlenme simülasyonlarında hit olarak belirlenen her bir protein-ligand kompleksi **Yöntem 2.2.1.7'deki** protokole göre Desmond modülünde 250 ns boyunca simüle edilmiştir.

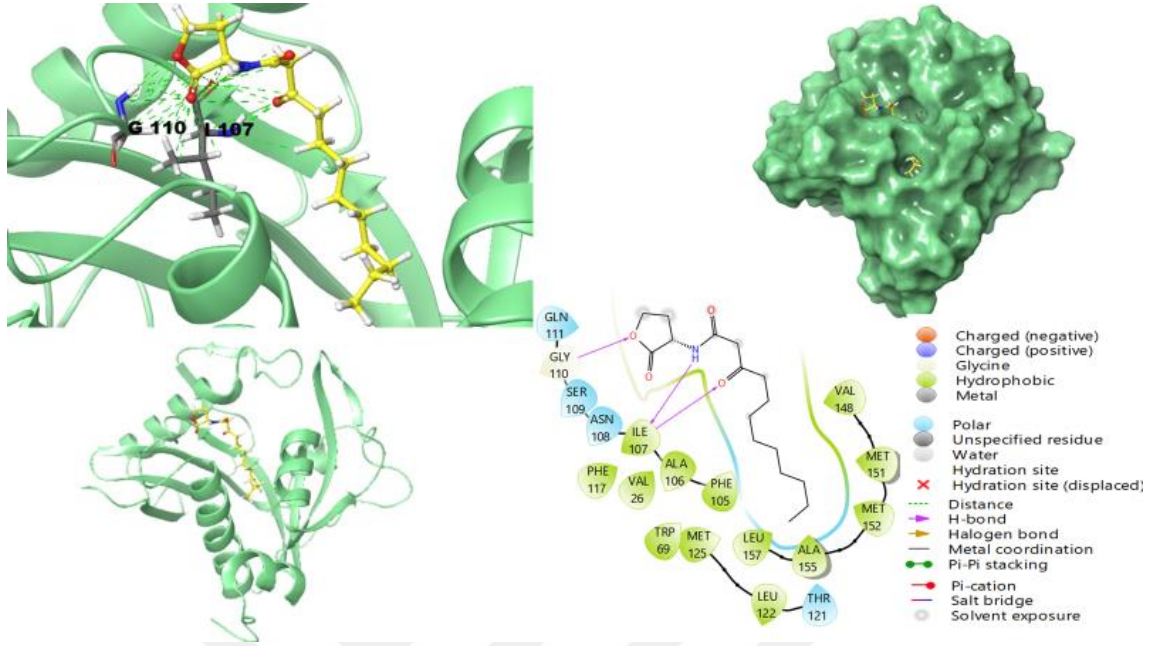
Apo (ligandsız protein), 1RO5-3OC12-HSL (endojen ligand), 1RO5-*chrysophanol* ve 1RO5-*penicillic acid* (referans molekül) komplekslerinin 250 nanosaniyelik simülasyonu boyunca konformasyonel değişiklikleri **Şekil 3.9**'da verilmiştir.



Şekil 3.9. 1RO5- ligand komplekslerinin 250 ns simülasyon boyunca konformasyonel değişiklikleri

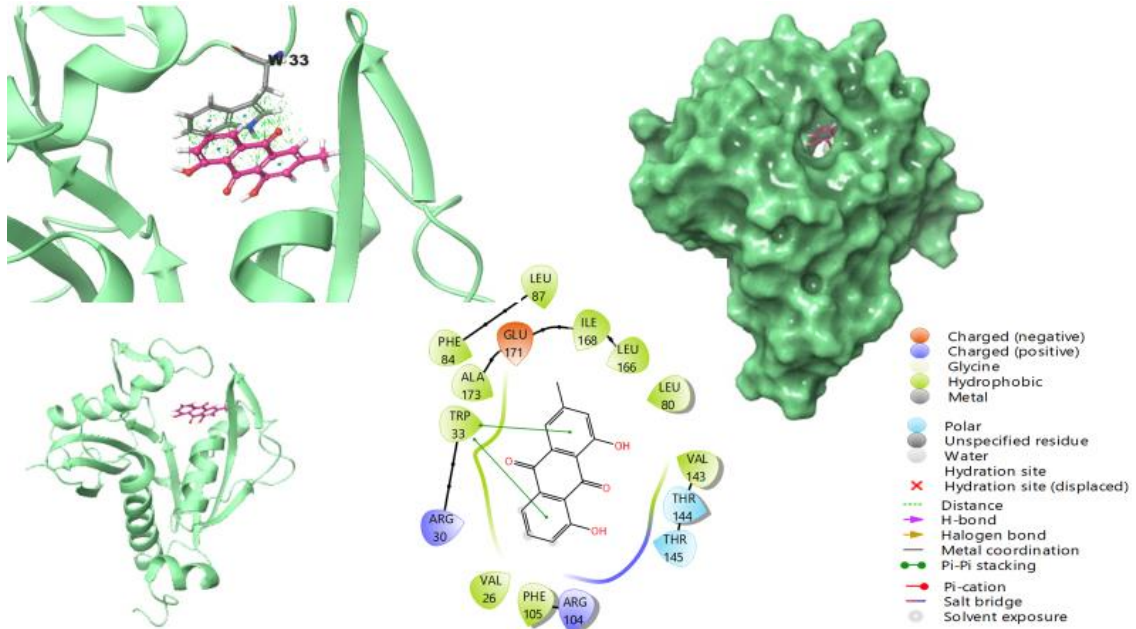
Şekilde apo ve ligand bağlı komplekslerde simülasyonun başından (kırmızı), ortasından (beyaz) ve sonundan alınan yapılar (lacivert) hizalandığında protein ve ligandın zamana bağlı konformasyonel değişiklikleri görselleştirilmiştir. Buna göre *chrysophanol* molekülünün bağlanma bölgesi içinde konformasyonu değişiklik göstermektedir. 3OC12-HSL kompleksinde simülasyonun ortasında farklılaşan konformasyon, sonundan alınan yapıda görüldüğü gibi başlangıçtaki haline benzer hale gelmiştir. *Penicillic acid* molekülünde ise yapısındaki döner bağların mümkün kıldığı konformasyonlarda bulunduğu söylenebilir.

1RO5-3OC12-HSL, 1RO5-*chrysophanol* ve 1RO5-*penicillic acid* komplekslerinin 2B, 3B ve yüzey görüntülerinin detaylı yapısı **Şekil 3.10- 3.12** arasında verilmiştir.



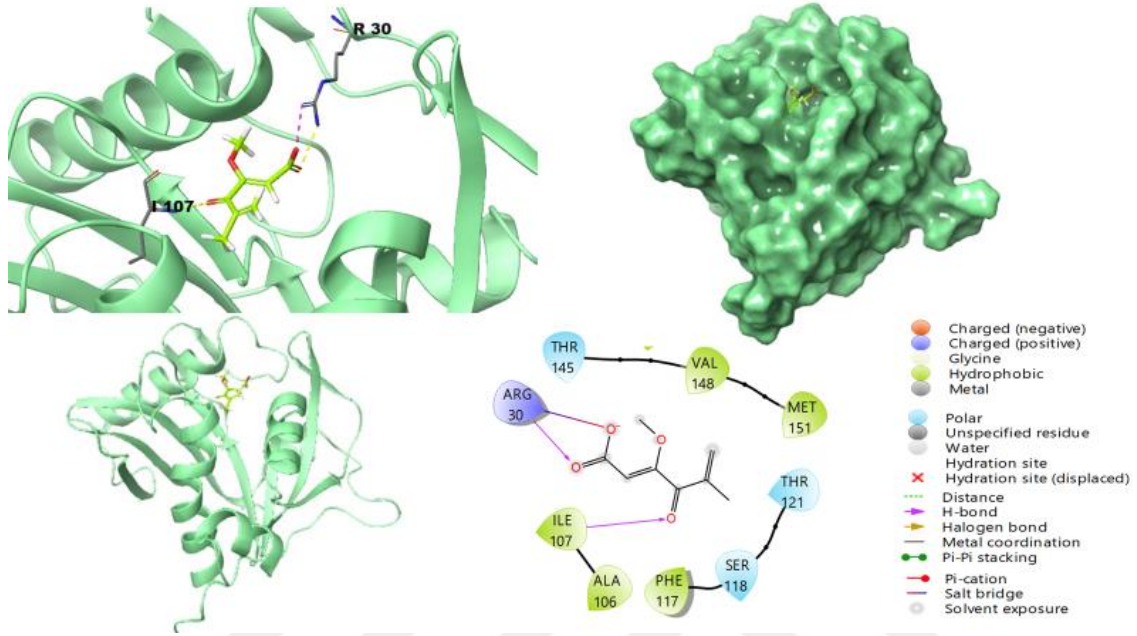
Şekil 3.10. 1RO5- 3-oxo-C12-HSL kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

Şekil 3.10’da 2B ve 3B görüntülerinde 3OC12-HSL ILE107 ve GLY110 ile H bağı kurmuştur.



Şekil 3.11. 1RO5-*Chrysophanol* kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

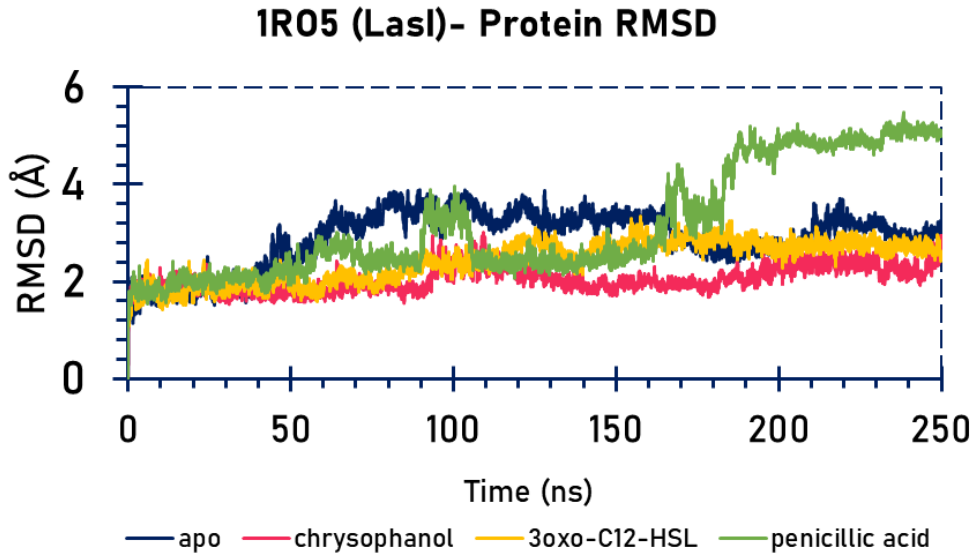
Şekil 3.11'deki 2B ve 3B görüntülerde *Chrysophanol* TRP33 ile pi-pi etkileşimi kurmuştur.



Şekil 3.12. 1RO5- *penicillic acid* kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

Şekil 3.12'de verilen 2B ve 3B görüntülerinde *penicillic acid* ARG30 ile tuz köprüsü ile H bağı ve ILE107 le H bağı kurmuştur.

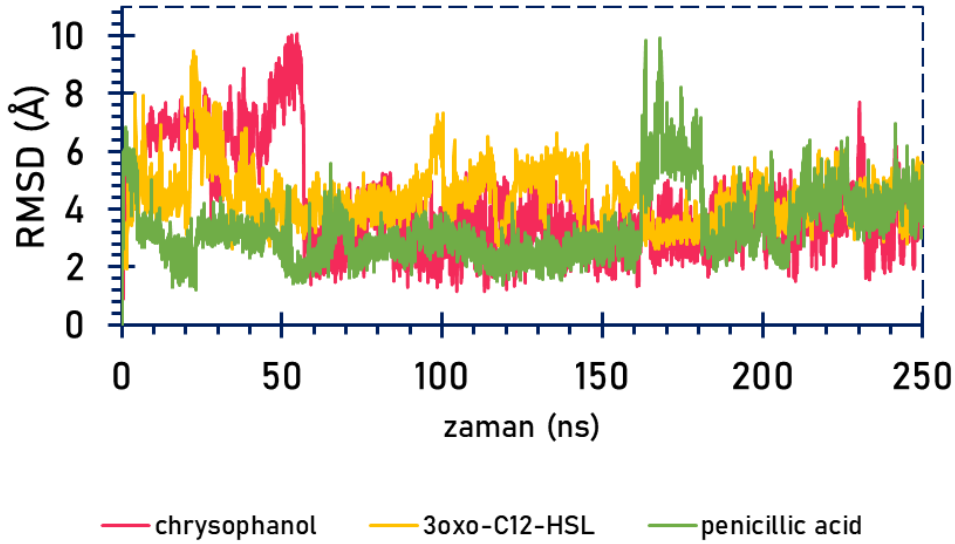
MD simülasyonları, proteinin apo formu ile protein-ligand komplekslerinin (Prot-RMSD); ligandın protein içindeki konumunun (LigFitProt); ligandın kendi konformasyonel ve rotasyonel değişiminin (LigFitLig) ve her bir protein rezidüsüne ait konumsal değişimi (RMSF) ifade eden bir dizi kavram ile analiz edilmektedir (Şekil 3.13-Şekil 3.16).



Şekil 3.13. 1R05 (LasI) Protein RMSD/zaman (ns) grafiği

250 nanosaniyelik zaman diliminde **Şekil 3.13**'de simüle edilen tüm sistemler RMSD bazında dengeye gelmiştir. Antagonist molekül olan *penicillic acid*'de 100 nanosaniye civarında sapmalar görülse de yaklaşık 160. nanosaniyeden sonra sapma miktarının başlangıç yapısına göre arttığı görülmüştür (yaklaşık 6Å). 180 ns civarından sonra da 5,5 Å dolaylarında stabil kalmıştır. *Chrysophanol* ve endojen ligand olan 3-oxo-C12-HSL'nin benzer RMSD değerlerine sahip olduğu görülmüştür (yaklaşık 2.5Å). Apo (ligand bağlı olmayan) yapıda 40. Nanosaniyeden itibaren sapma görülse de 200 nanosaniye dolaylarında stabil hale gelerek *chrysophanol* ve endojen ligand ile benzer RMSD seviyesinde bulunmuştur.

1R05 (LasI)- Lig Fit Prot

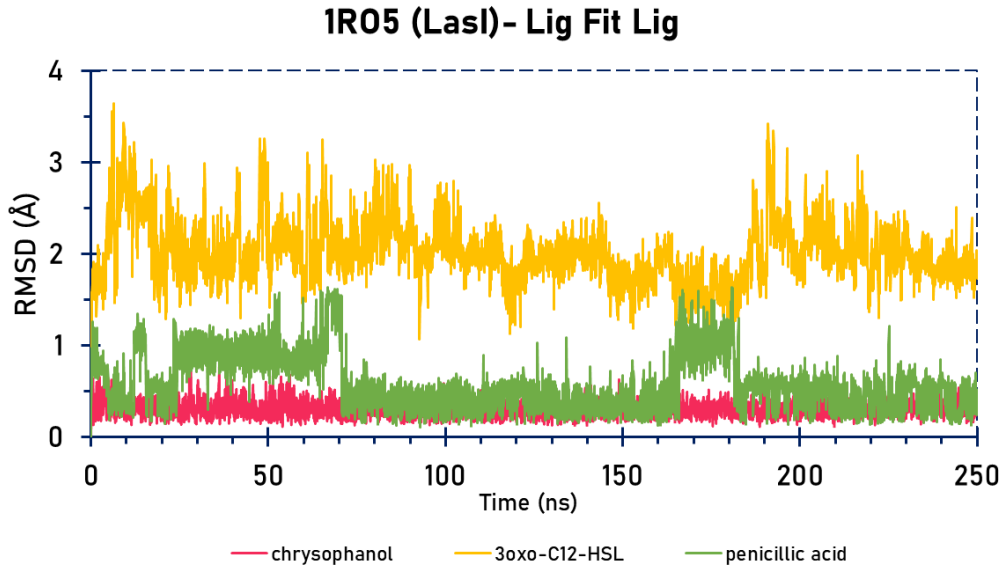


Şekil 3.14. 1R05 (LasI) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği

Moleküler dinamik simülasyonlarından elde edilen bilgilerle proteinin ligand bağlı ya da değilken yahut bağlanan liganda göre yapısal olarak genel davranışının nasıl değiştiği izlenebildiği gibi, proteine bağlanan küçük molekülün de gerek protein içerisindeki gerek kendi içerisindeki yapısal davranışları izlenebilmektedir. Lig-fit-prot ile hesaplanan RMSD değeri, ligand molekülünün protein içerisindeki translasyonel değişimlerini ifade etmektedir (**Şekil 3.14**). İnhibitör olan *penicillic acid*'in protein içerisinde stabil kaldığı söylenebilir.

Chrysophanol molekülünün ise 10. nanosaniyeden sonra proteinden uzaklaşma eğiliminde olduğu (10Å'a kadar artış gözükmemekte) ve çok geçmeden sapmasının 3 Å dolaylarına kadar düştüğü ve simülasyonun devam eden evrelerinde stabil kaldığı görülmüştür.

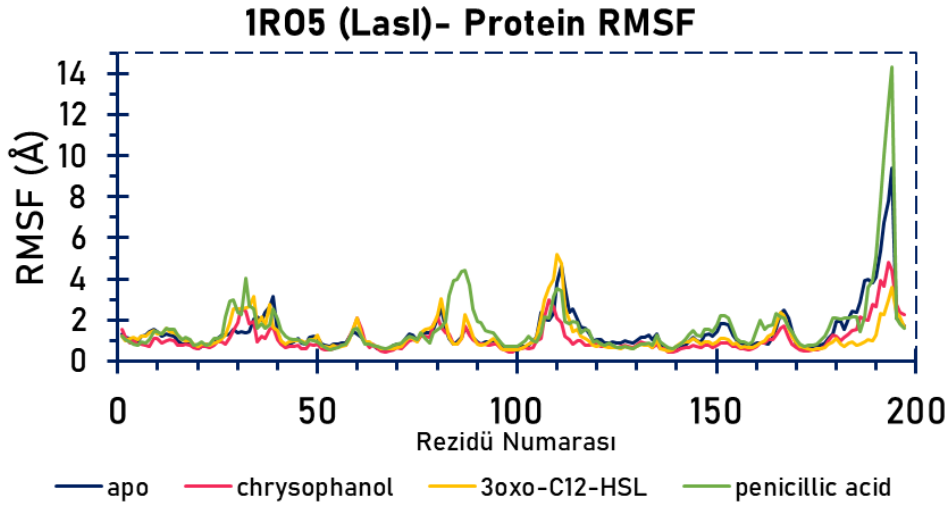
Bunun yanı sıra, 3-oxo-C12-HSL endojen molekül ve *penicillic acid* simülasyonlarının başından sonuna kadar sapmasında bir değişiklik olmadan protein içinde sabit kaldığı söylenebilir.



Şekil 3.15. 1R05 adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/Time (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği

Ligandın protein içerisindeki translasyonel değişimi lig-fit-prot RMSD değerleri ile izlenebilirken, simülasyon süresince molekülün proteinden bağımsız olarak kendi içerisindeki konformasyonel değişikliği ve rotasyonlar ise lig-fit-lig RMSD değerleri ile ifade edilebilmektedir (**Şekil 3.15**).

Sinyal molekülü olan 3-oxo-C12-HSL simülasyon boyunca konformasyon değişikliğine uğrarken (1.5- 3.5 Å) *chrysophanol* stabil kalmıştır. Bu grafikte görüldüğü üzere, *chrysophanol* molekülü kendi içerisinde çok fazla konformasyonel değişikliğe uğramamıştır (RMSD yaklaşık 0.5 Å civarındadır). Bu durumu **Şekil 3.13** ve **Şekil 3.14** 'deki verilerin ışığında değerlendirdiğimizde ise, endojen molekülün yapısal olarak çok fazla torsiyona uğrayabilme özelliğinde olması, lig-fit-lig grafiğindeki yüksek dalgalanmalara sebep olduğu şeklinde yorumlanabilir.



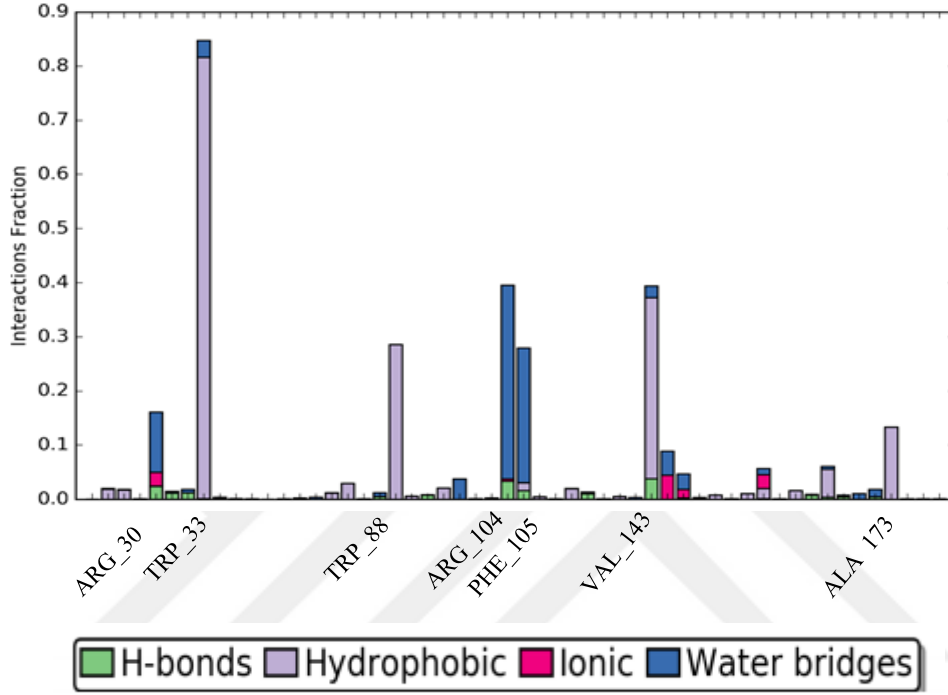
Şekil 3.16. 1R05 adlı proteine ait RMSF/Rezidü Numarası grafiği

Proteindeki tüm backbone atomlarının zamana bağlı konumsal değişimi RMSD-zaman grafiği ile açıklanabilirken, bu değişimin aminoasit rezidülerindeki (alfa karbon atomu veya yine backbone atomları baz alınarak) dağılımı ise RMSF grafiği ile ifade edilmektedir (Şekil 3.16).

Bu grafiğe göre, ilk ve genel olarak, gerçekleştirilen tüm simülasyonlarda proteinin yapısal olarak herhangi bir bozulmaya uğramadığı gözlenebilir. RMSF değerlerinin yüksek olduğu aminoasitlerin, düşük olanlara göre daha esnek/hareketli sekonder yapı bölgelerde (loop gibi) yer aldığı, ya da bu aminoasitler eğer bağlanma bölgesinde ise, ligand molekülüyle etkileşim kurmadığı şeklinde yorumlanabilir.

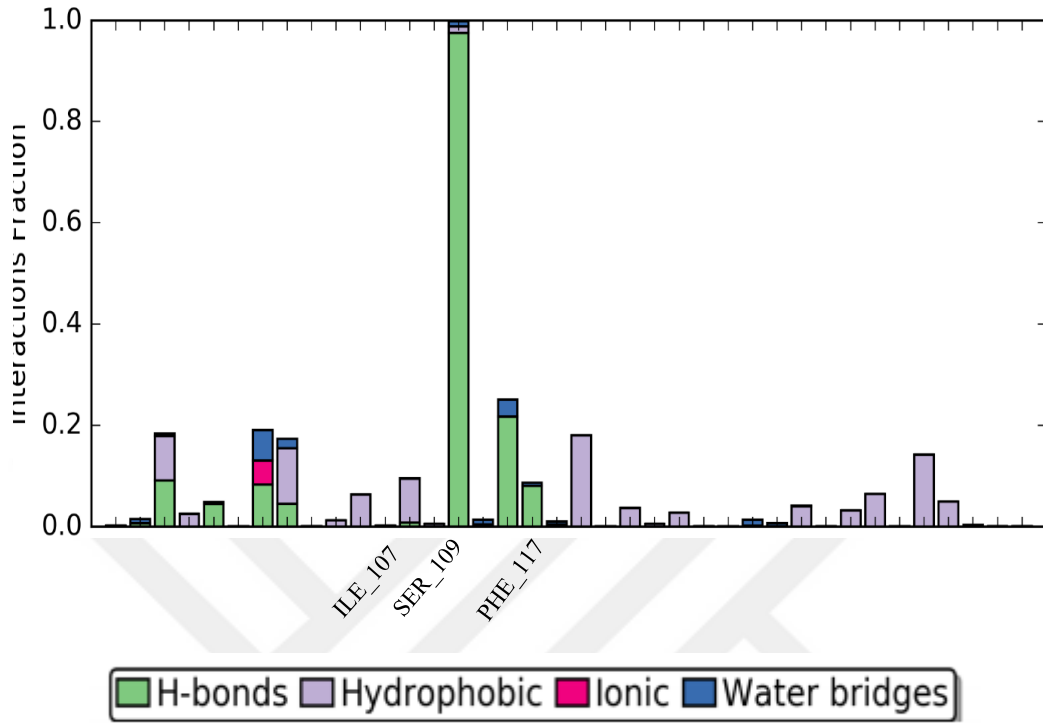
Simülasyonun geneline bakıldığında yüksek dalgalanma 30-50 (alfa heliks ve loop), 80-100 (loop), 100-120(loop ve beta tabaka) , numaralı aminoasitler arasında görülmüştür. Simülasyonu yapılan tüm moleküllerin kompleks ve apo yapı için yüksek RMSF değerine sahip rezidüler sırasıyla ASP39, THR83, SER114, ARG197 (apo), GLY32, TYR78, ARG197 (*chrysophanol*), ASP34, THR83, SER114 (3-okso-C12-HSL), GLY32, LYS91, ARG197 (*penicillic acid*) dir. Bu sıralanan aminoasitlerin hiçbiri bağlanma bölgesinde bulunmamaktadır.

250 nanosaniye boyunca LasI sistemi için simüle edile protein-ligand komplekslerine ait histogramlar Şekil20 (1RO5-*chrysophanol*), Şekil 21 (1RO5-3OC12-HSL) ve Şekil 22’de (1RO5-*penicillic acid*) verilmektedir.



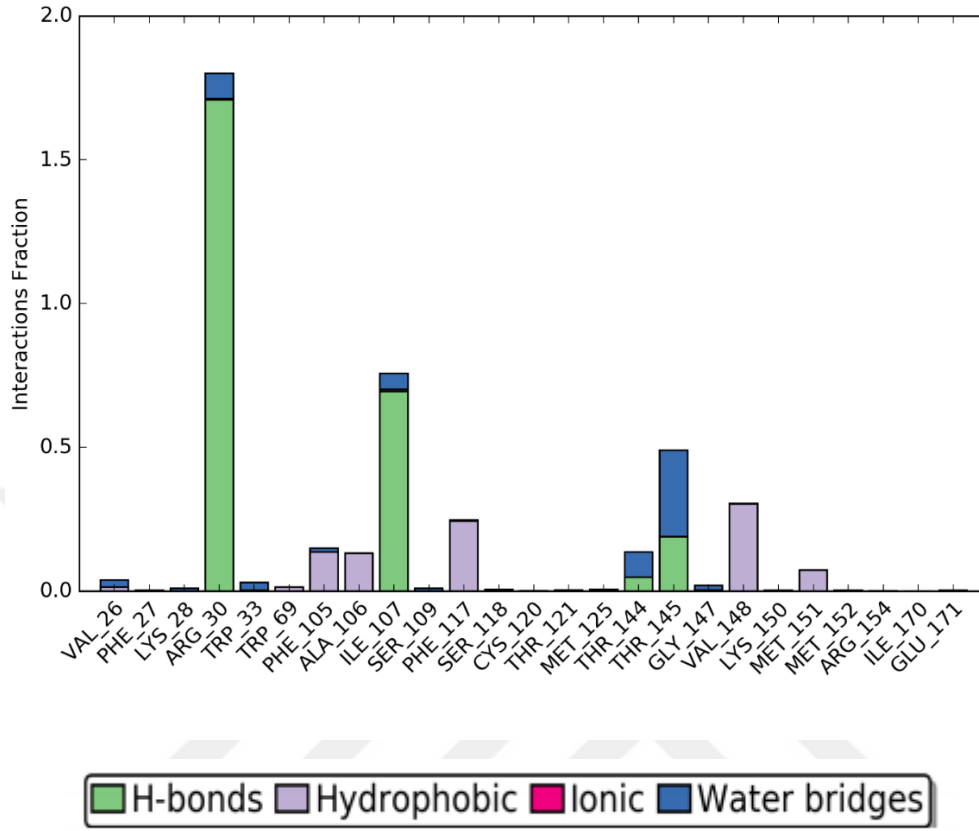
Şekil 3.17. 1RO5- *chrysophanol* kompleksine ait protein ligand histogramı

Simülasyonun geneli boyunca hidrofobik etkileşim kuran aminoasitler TRP33, PHE84, ALA173 sırası ile loop, alfa heliks ve beta tabaka yapıda bulunmaktadır. VAL143 çoğunlukla hidrofobik etkileşimler kurmakta ve simülasyonun az bir kısmı boyunca hidrojen bağı ve su köprüsü kurmakta olup, alfa heliks yapıda bulunmaktadır. ARG30, ARG104 ve PHE105 genelde su köprüsü kurmakta olup sırası ile alfa heliks ve beta tabaka yapıdadır. TRP33, simülasyonun %80’i boyunca hidrofobik etkileşim kurmuştur.



Şekil 3.18. 1RO5-3-oxo-C12-HSL kompleksine ait protein ligand histogramı

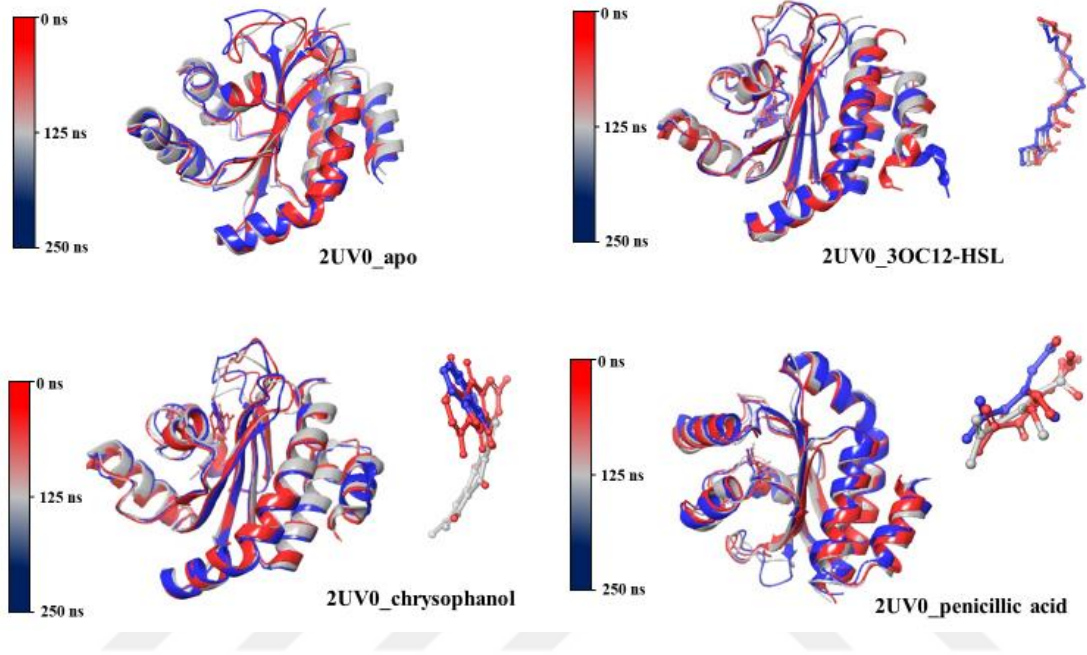
ILE107 beta tabaka yapıda olup simülasyonun tamamında hidrojen bağı kurmuştur. SER109 beta tabaka yapıda olup H bağı ve simülasyonun bir kısmında ise su köprüsü kurmuştur. PHE117 alfa heliks yapıda olup simülasyonun %20 si boyunca hidrofobik etkileşim kurmuştur.



Şekil 3.19. 1RO5- *penicillic acid* kompleksine ait protein ligand histogramı

ARG30 alfa heliks yapıda olup simülasyonun büyük bir kısmında hidrojen bağı ve bir kısmında su köprüsü kurmuştur. ILE107 beta tabaka yapıda olup simülasyonun yaklaşık %70 inde hidrojen bağı ve bir kısmında su köprüsü kurmuştur. PHE105 beta tabaka, PHE117 alfa heliks, VAL148 alfa heliks yapıda olup simülasyonun az bir kısmında hidrofobik etkileşimler kurmuştur.

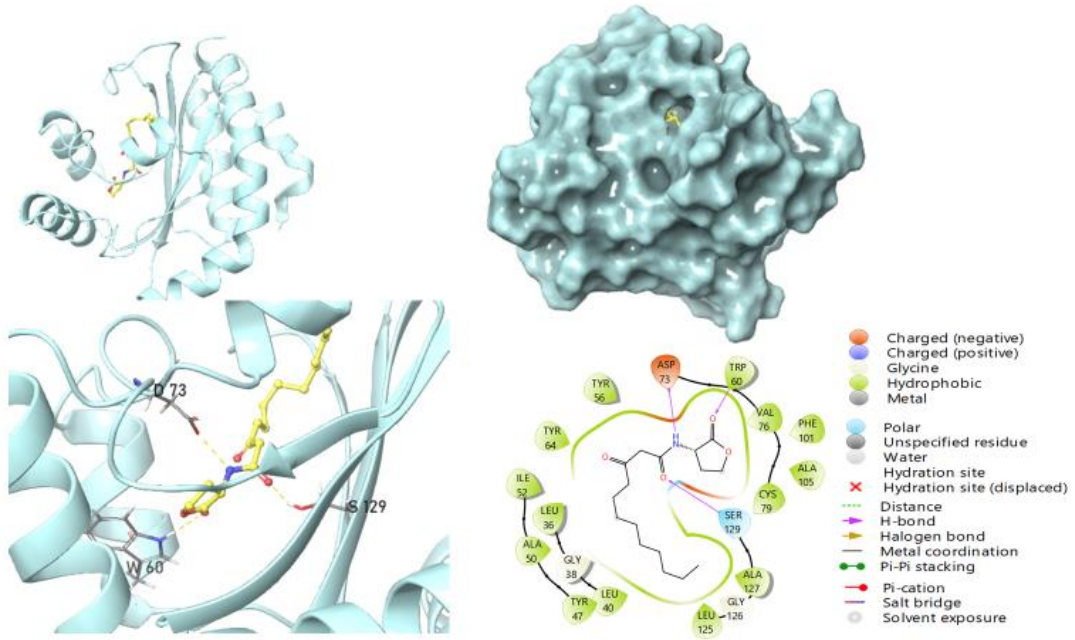
Apo (ligandsız), 2UV0-3OC12-HSL (endojen ligand), 2UV0-*Chrysophanol* ve 2UV0-*penicillic acid* (referans molekül) komplekslerinin 250 nanosaniyelik simülasyonu boyunca konformasyonel değişiklikleri **Şekil 3.20**'de verilmiştir.



Şekil 3.20. LasR-ligand komplekslerine ait 0-125-250 nanosaniye görüntüleri

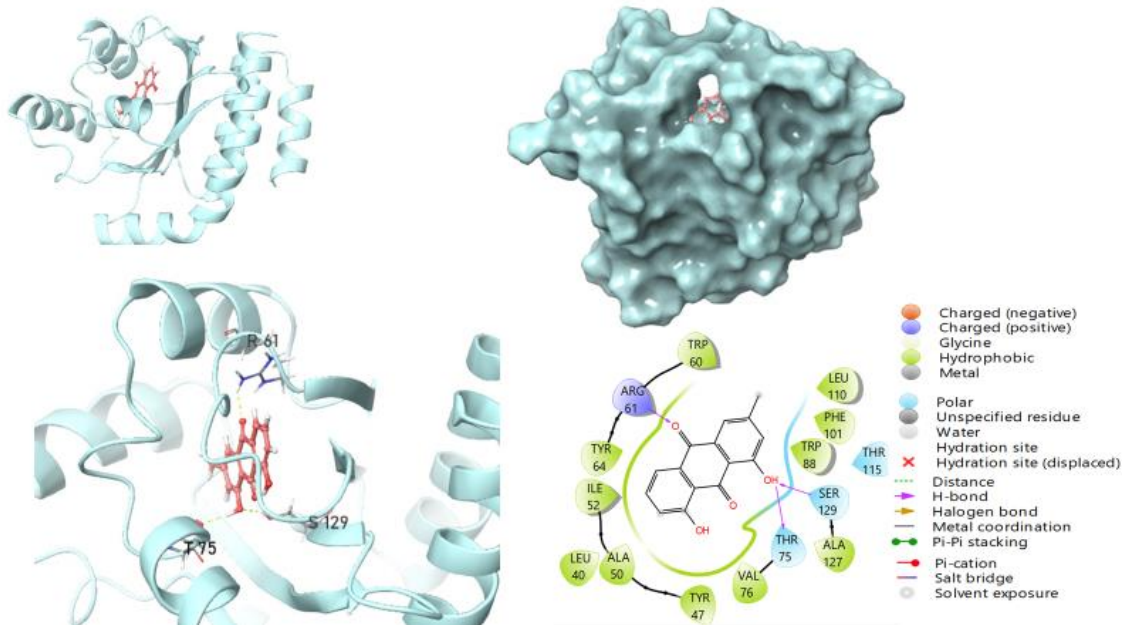
Şekil 3.20'de *Chrysophanol* kompleksindeki yapıya bakıldığında apo forma göre loop bölgelerinde bir açılma söz konusudur. Ligand konformasyonunda ise simülasyonun ortasından alınan yapıda değişiklik olduğu fakat sonundan alınan yapıya bakıldığında baştaki konformasyona geri geldiği görülmüştür.

2UV0-3OC12-HSL, 2UV0-*chrysophanol* ve 2UV0-*penicillic acid* komplekslerinin 2B, 3B ve yüzey görüntülerinin detaylı yapısı **Şekil 3.20- Şekil 3.23** arasında verilmiştir.



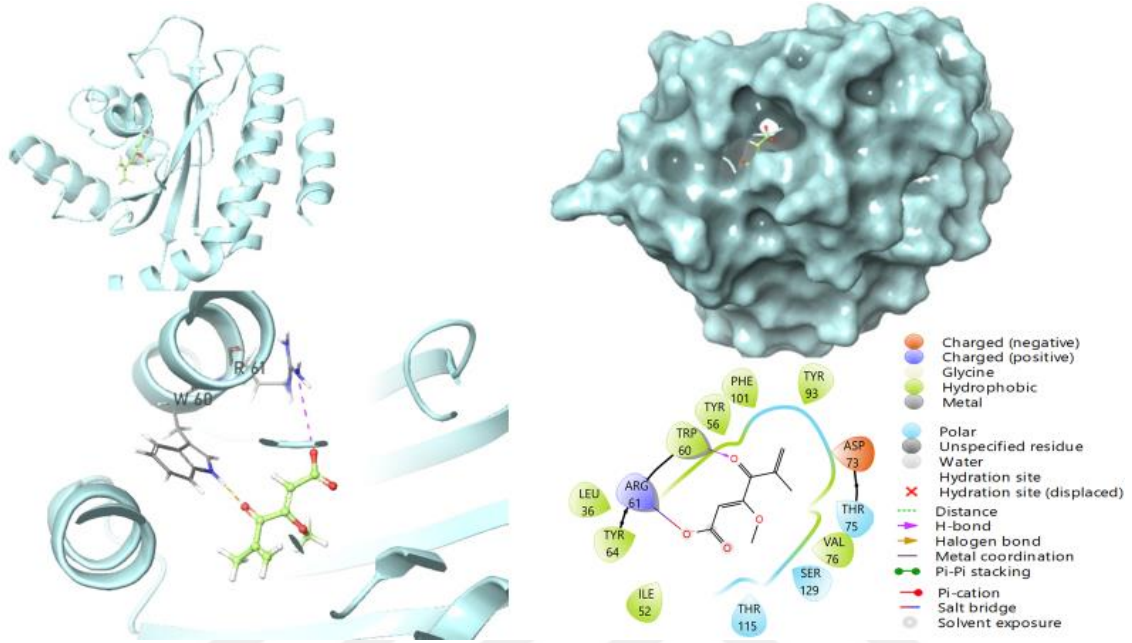
Şekil 3.21. 2UUV0-3oxo-C12-HSL kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

Yukarıda LasR-3OC12-HSL kompleksinin MD simülasyonundan alınan yapıları verilmiştir. 3OC12-HSL TRP60, ASP73 ve SER129 ile H bağı kurmuştur.



Şekil 3.22. 2UUV0-chrysophanol kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

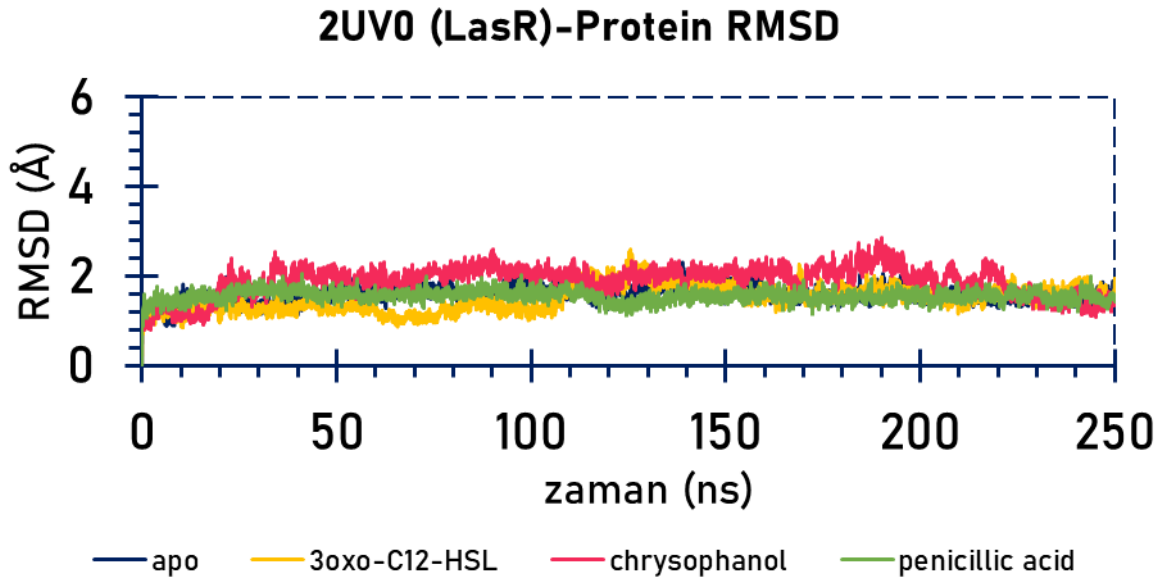
Chrysophanol, MD simülasyonundan alınan yukarıdaki görsellerde ARG61, THR75 ve SER129 ile H bağı kurmuştur.



Şekil 3.23. 2UV0-*penicillic acid* kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

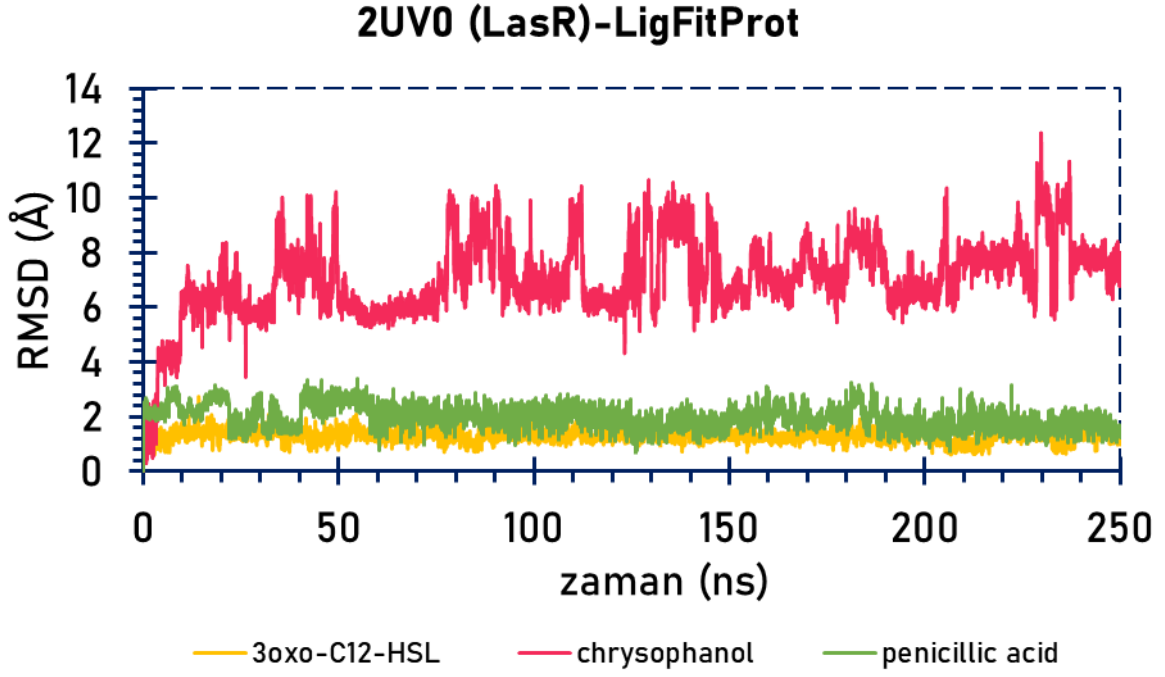
Yukarıdaki görselde *penicillic acid*'in MD simülasyonunda LasR kompleksi ile kurduğu etkileşimler gösterilmektedir. Buna göre ARG61 ile tuz köprüsü ve TRP60 ile H bağı kurulmuştur.

2UV0 ile 3OC12-HSL, *chrysophanol* ve *penicillic acid* kompleksleri ile simüle edilen sistemlerin Prot-RMSD, LigFitProt, LigFitLig ve Protein-RMSF analizleri **Şekil 3.24 -Şekil 3.27** arasında verilmiştir.



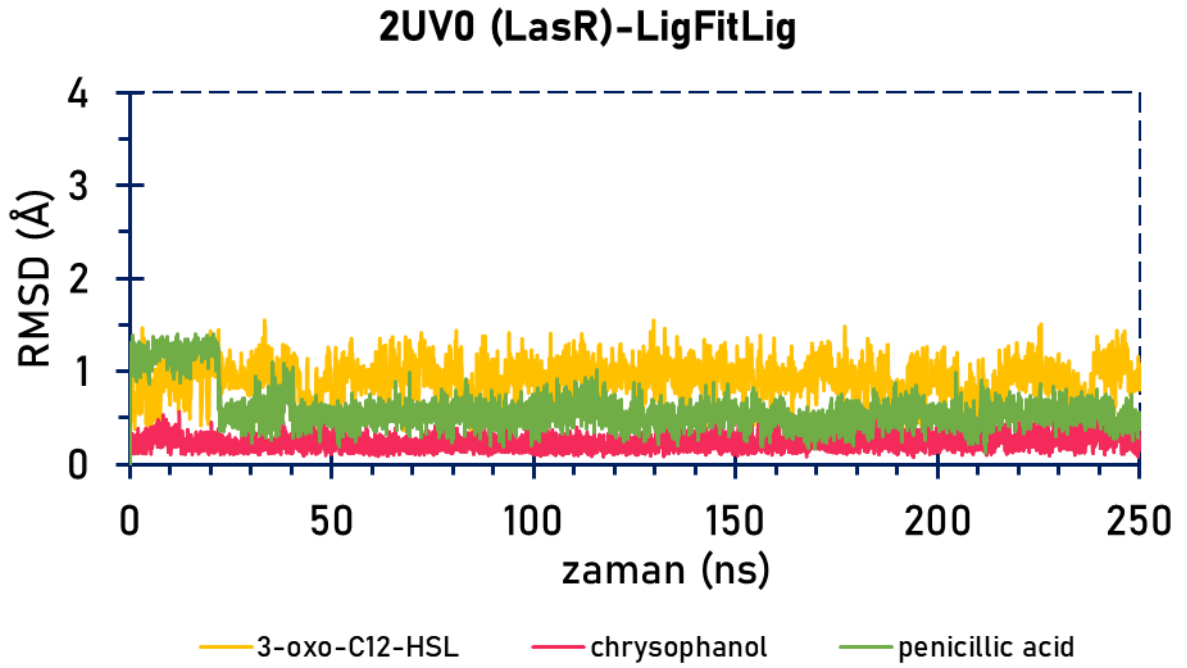
Şekil 3.24. 2UV0 (LasR) Protein RMSD/zaman (ns) grafiği

LasR monomeri için apo (ligandsız yapı), 3OC12-HSL (sinyal molekülü), *penicillic acid* (bilinen antagonist molekül) ve *chrysophanol* 250 ns boyunca simüle edilmiştir. Şekil 3.24’de simüle edilen tüm sistemler RMSD bazında dengeye gelmiştir.



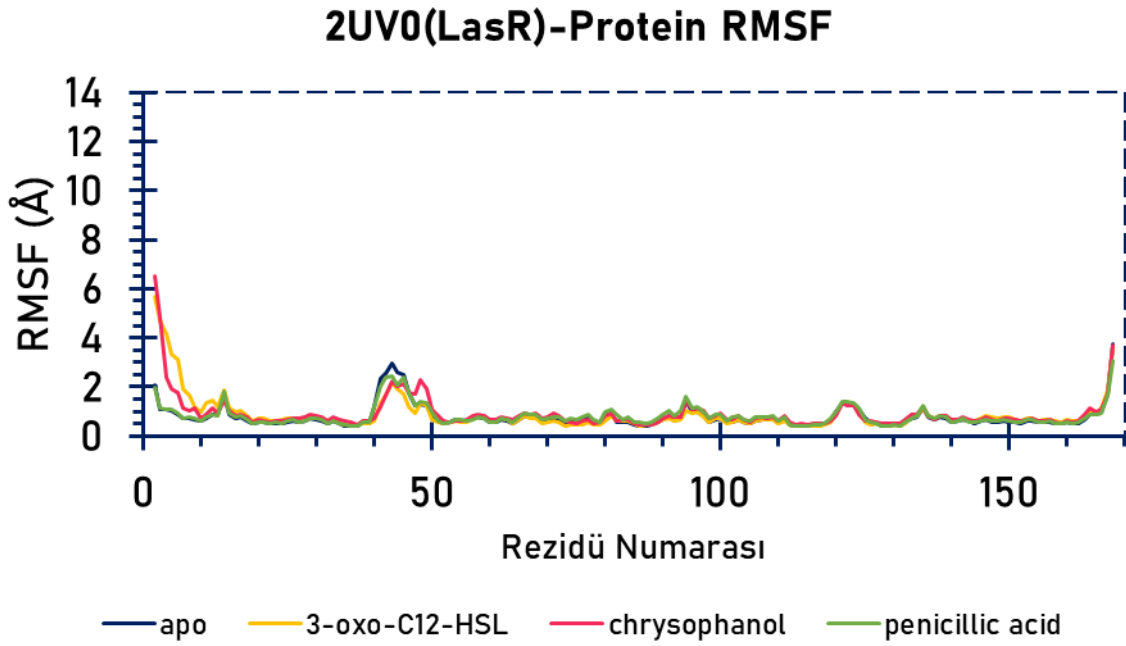
Şekil 3.25. 2UV0 (LasR) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği

Grafik incelendiğinde, sinyal molekülü (yaklaşık 2 Å) ve *penicillic acid*'in (yaklaşık 1.5-2 Å) RMSD bazında stabil hale geldiği görülmüştür. *Chrysophanol* de ise simülasyonun başından itibaren sapma görülmüştür.



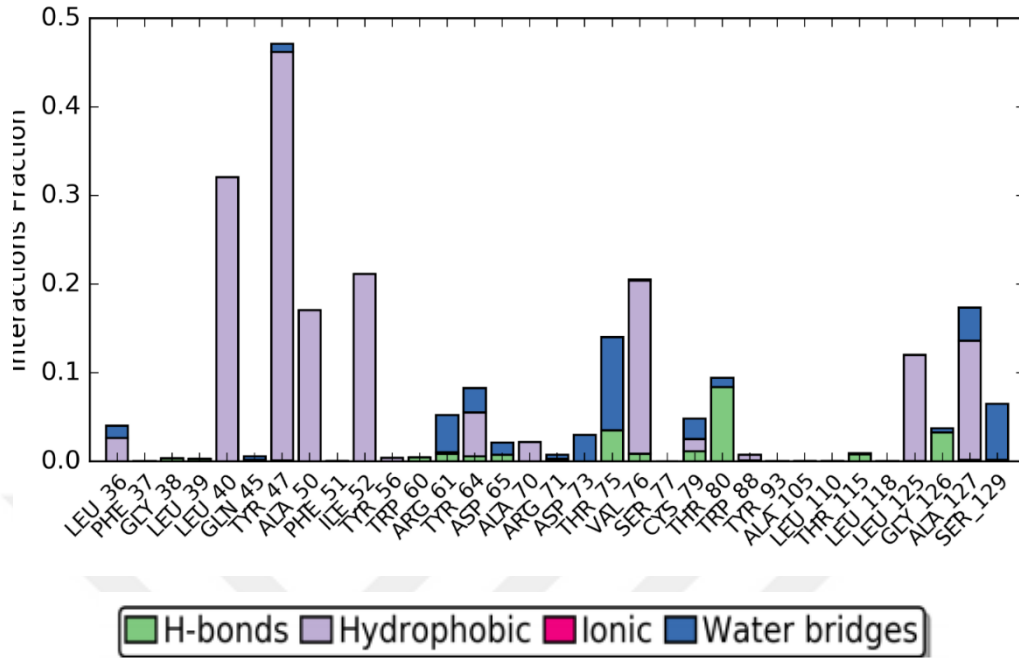
Şekil 3.26. 2UV0 (LasR) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ Time (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği

3OC12-HSL (yaklaşık 1Å) ve *chrysophanol* (yaklaşık 0.5 Å) simülasyonun başlangıcına göre konformasyonları açısından stabil oldukları RMSD değerlerinden anlaşılmıştır. *Penicillic acid*'in ise 20. nanosaniyeye kadar 1 Å, 20. nanosaniyeden itibaren ise yaklaşık 0.5 Å düzeyinde sabit kalarak stabil olduğu görülmüştür.



Şekil 3.27. 2UV0 (LasR) adlı protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSF(Å)/Rezidü Numarası değerlerine bağlı olan Protein-RMSF grafiği

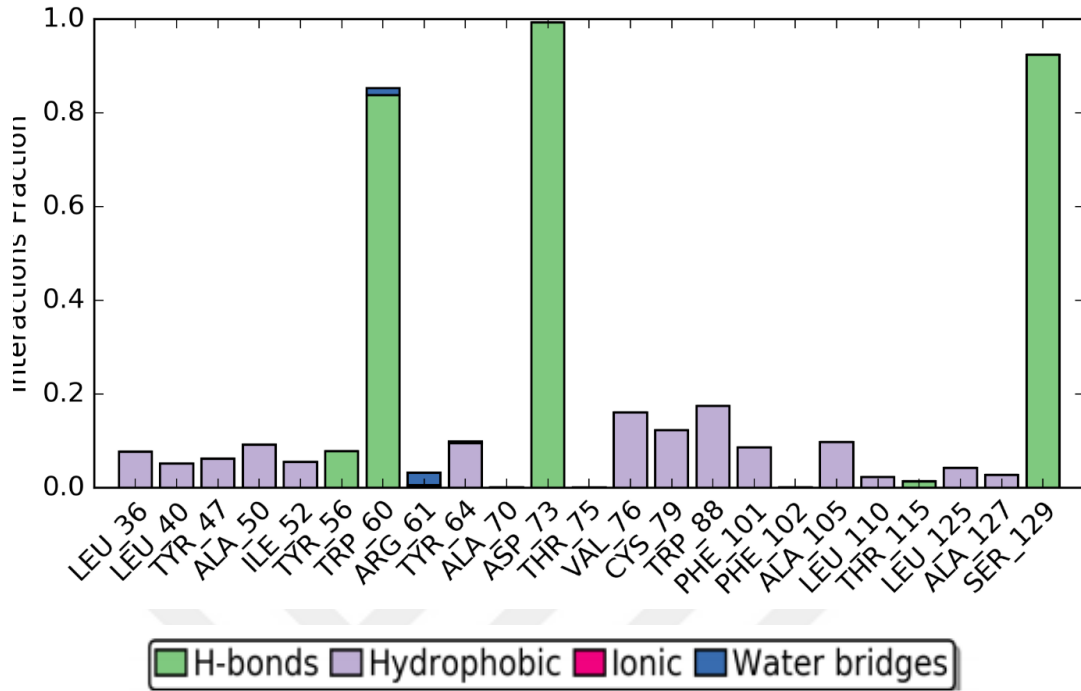
LasR proteininde bulunan backbone atomlarının aminoasit rezidülerindeki dağılımını ifade eden RMSF grafikleri **Şekil 3.27**'de verilmiştir. RMSF grafiğine bakıldığında, 40-50 nanosaniyeler arasında yüksek pik veren aminoasitlerin olduğu görülmüştür. Bunlar ASP43 (apo), GLN45 (apo ve *penicillic acid*) 44, SER44 (*penicillic acid*, 3OC12-HSL ve *chrysophanol*), LYS42 (3OC12-HSL) ASN49 (*chrysophanol*)'dur. Söz edilen rezidüler loop üzerinde bulunup hiç biri aktif bölgede bulunmamaktadır.



Şekil 3.28. 2UV0- *chrysophanol* kompleksine ait protein ligand histogramı

TYR47 beta tabaka yapıda olup, simülasyonun yaklaşık %50sinde hidrofobik etkileşimler kurmakta olup, az bir kısmında su köprüsü kurmuşlardır. LEU40 (loop), ALA50 ve ILE52 beta tabaka yapıda olup hidrofobik etkileşimler kurmuşlardır.

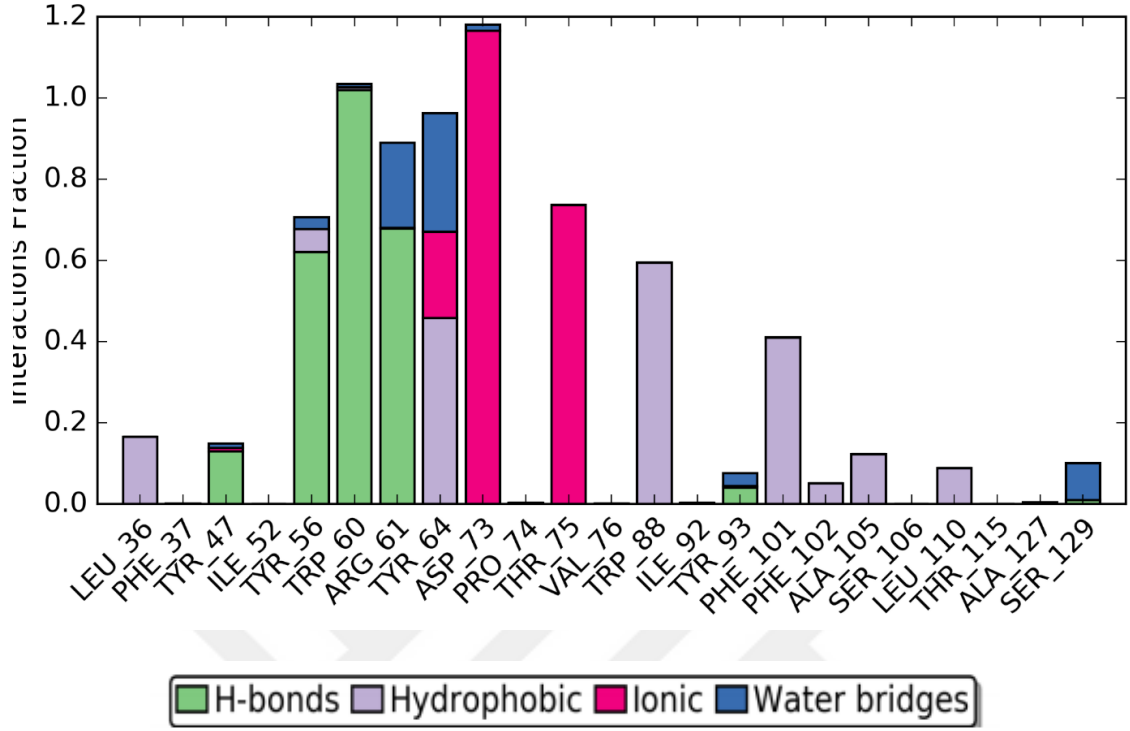
THR75 alfa heliks ve SER129 beta-strand yapıda olup simülasyonun bir kısmında su köprüsü kurmuşlardır. VAL76 (alfa heliks) hidrofobik etkileşim; LEU125 ve ALA127 beta tabaka yapıda bulunup hidrofobik etkileşimler kurmuşlardır.



Şekil 3.29. 2UV0- 3-oxo-C12-HSL kompleksine ait protein ligand histogramı

3OC12-HSL- 2UV0 kompleksinde TRP60 (alfa heliks), ASP73 (alfa heliks) ve SER129 (beta tabaka) aminoasitleri ile simülasyonun neredeyse tamamı boyunca H bağı kurulduğu ve bu etkileşimleri koruduğu görülmüştür.

TYR47 (loop), ARG61 (beta tabaka), TYR64 (beta tabaka), TRP88 (loop) aminoasitleri ile ise simülasyonun bir kısmında hidrofobik etkileşimler kurulduğu görülmüştür.



Şekil 3.30. 2UV0- *penicillic acid* kompleksine ait protein ligand histogramı

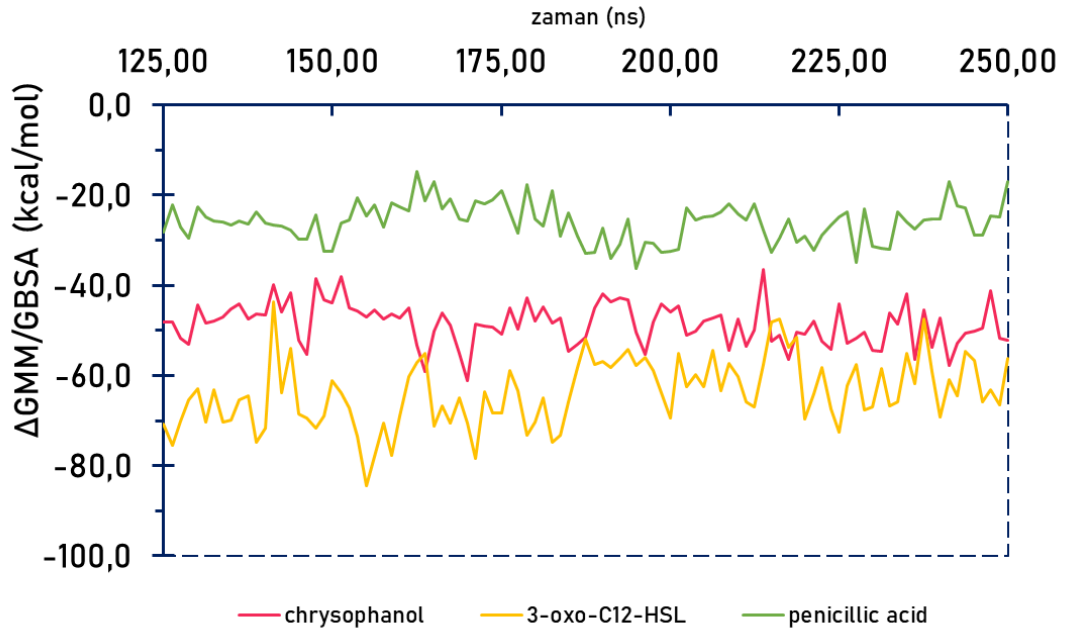
TRP60 (alfa heliks) ile simülasyonun tamamında H bağı kurmuştur. TYR56 (beta tabaka) ve ARG61 alfa heliks yapıda olup simülasyonun yaklaşık %60'ında hidrojen bağı kurmakta ve ARG61 simülasyonun yaklaşık %20'si boyunca su köprüsü kurmuştur.

ASP73 (alfa heliks) simülasyonun tamamında ve THR75 (alfa heliks) simülasyonun yaklaşık %80'inde iyonik etkileşimler kurmuşlardır. TYR64 (beta tabaka) 250 nanosaniyelik simülasyonun bir bölümünde hidrofobik etkileşim, bir bölümüne su köprüsü ve iyonik etkileşimler kurmuştur.

TRP88 (beta tabaka), PHE101 (alfa heliks) rezidüleri ile sırası ile yaklaşık %60 ve %40'ında hidrofobik etkileşimler kurmuşlardır.

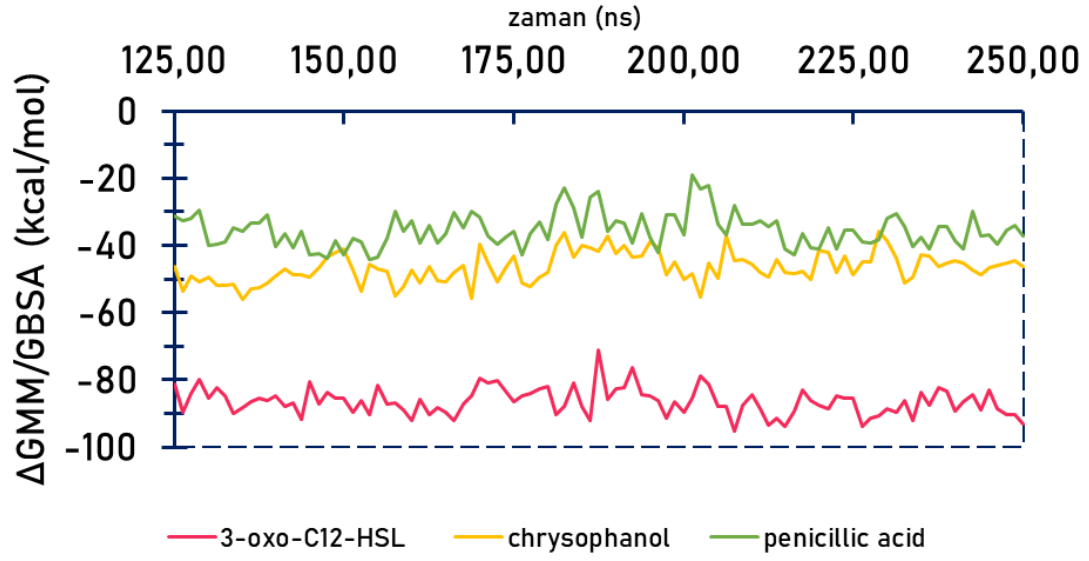
3.1.4.3. MM/GBSA analizleri

LasI ve LasR protein-ligand kompleksleri için MM/GBSA serbest enerji hesaplamaları **Yöntem 2.2.1.7**'de belirtilen Schrödinger/Prime modülü ile gerçekleştirilmiştir. **Şekil 3.31** ve **Şekil 3.32**'de sırasıyla LasI ve LasR komplekslerine ait grafikler verilmiştir.



Şekil 3.31. LasI protein ve ligand komplekslerine ait MMGBSA grafikleri

Şekil 3.31'deki verilen grafikte ortalama değerlere bakıldığında 3-oxo-C12-HSL, *chrysophanol* ve *penicillic acid*'e ait MM/GBSA değerleri sırası ile; -63.80 kcal/mol, -60.71 kcal/mol ve N/A dır. Bu skorlara göre *chrysophanol* endojen liganda göre enerjetik olarak yakın bir skor vermiştir.

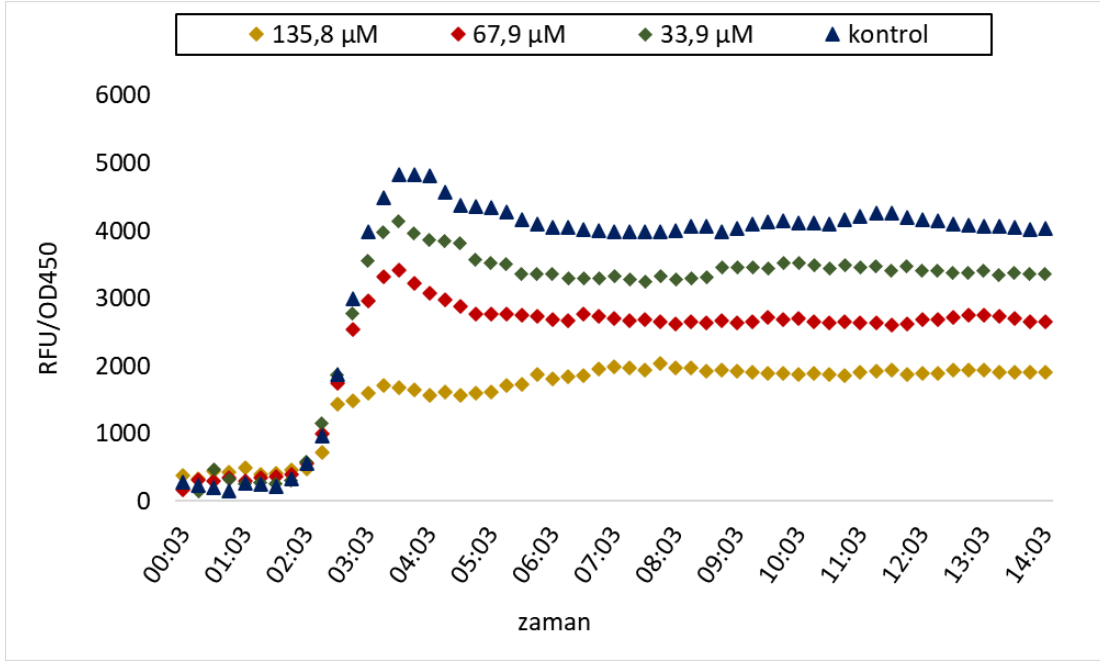


Şekil 3.32. LasR protein ve ligand komplekslerine ait MMGBSA grafikleri

Şekil 3.32’de verilen grafikte *chrysophanol* ve *penicillic acid* endojen liganddan daha düşük bir skor vermekte olup ortalama değerlere bakıldığında 3-oxo-C12-HSL, *chrysophanol* ve *penicillic acid*’e ait MM/GBSA değerleri sırası ile; -86.47 kcal/mol, -47.97 kcal/mol ve N/A’ dır.

3.1.4.4. *lasB-gfp* suşu üzerindeki anti-QS aktivitesi

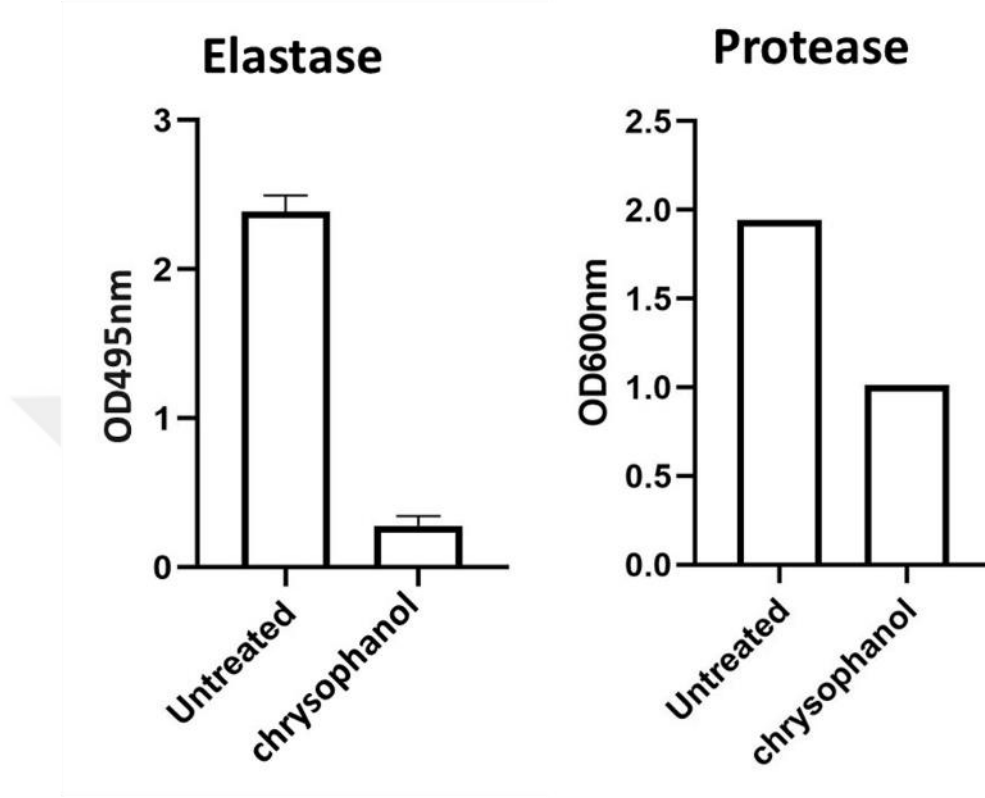
Tez çalışmamızdaki *Chrysophanol*ün *lasB-gfp* suşu üzerindeki anti-QS etkisinin belirlenmesi **Yöntem 2.2.2.3**'de belirtilen protokol ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.33. 135,8 µM, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlarındaki *Chrysophanol* çözeltisinin *P. aeruginosa lasB-gfp* suşu QS mekanizmasının inhibisyona ait RFU/OD grafiği. Kontrol grubuna *chrysophanol* çözeltisi eklenmemiştir.

Chrysophanol'ün 135,8 µM, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlarının *lasB-gfp* suşu üzerine QS inhibisyon oranları sırasıyla %52.60, %34.21 ve %16.51 olarak belirlenmiştir.

3.1.4.5. Elastaz ve Proteaz üretimine etkisi



Şekil 3.34. *Chrysophanol* çözeltisinin 135,8 μ M dozuna ait elastaz (OD495nm) ve proteaz (OD600nm) üretimine ait OD ölçümleri grafiği. Kontrol grubuna *chrysophanol* çözeltisi eklenmemiştir.

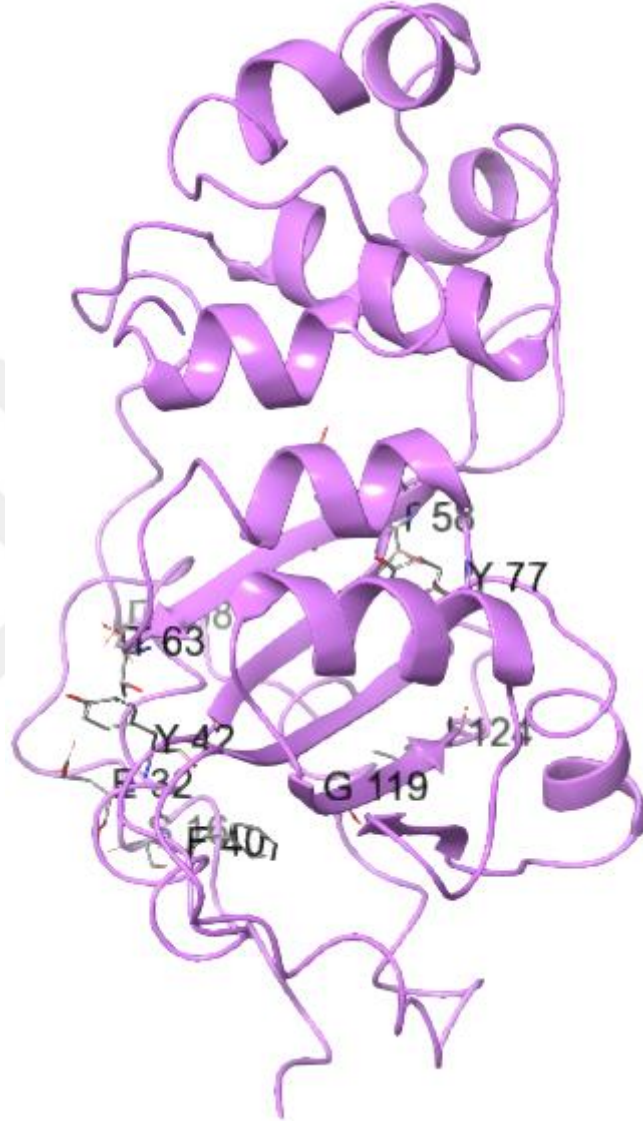
Chrysophanol elastaz üretimini %88.3 oranında ve proteaz üretimini ise %52.3 oranında inhibe etmiştir.

3.1.5. *Chrysophanol*ün rhl sistemi üzerine *in siliko* ve *in vitro* analizi

3.1.5.1. Moleküler Kenetlenme

Regülatör protein olan RhlR **Yöntem 2.2.1.3'deki** protokole göre Protein Preparation Wizard modülü ile moleküler kenetlenme için hazırlanmıştır. **2.2.1.5. numaralı** bölümdeki bilgilere göre aktif bölgesi (grid generation) belirlenmiştir. Oluşturulan gridin 3 boyutlu yapısı **Şekil 3.35'de** gösterilmiştir. Moleküler kenetlenme

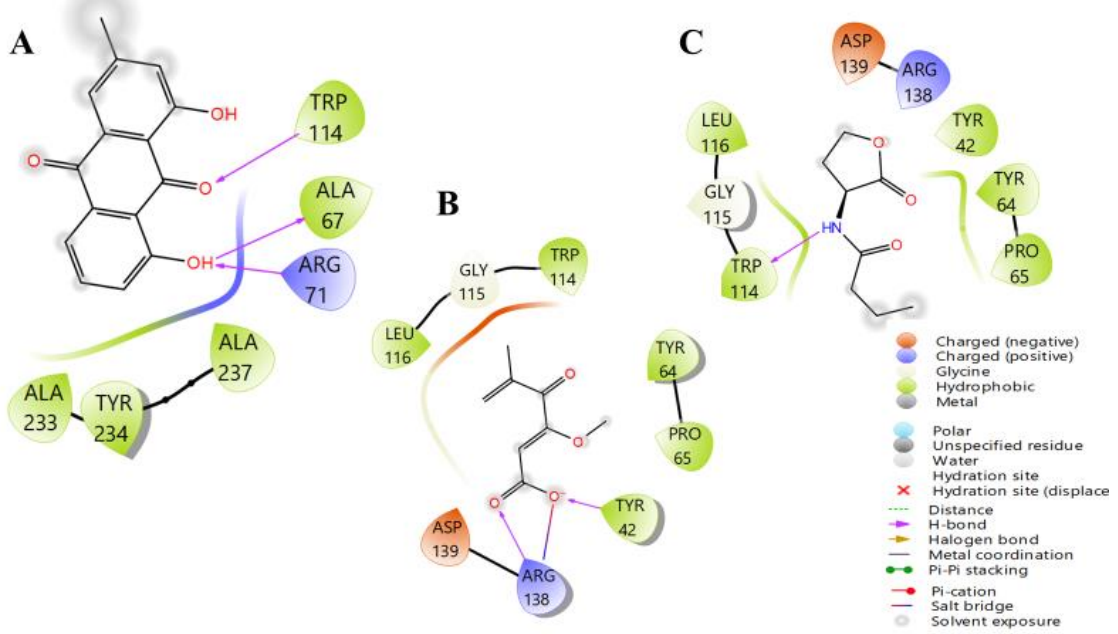
simülasyonları **Yöntem 2.2.1.6’de belirtilen** Glide protokolünün SP (Standard Precision) modülüne göre gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.35. RhlR reseptörünün aktif bölgesi ve ilgili rezidüer

RhlR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonu sonucunda C4-HSL (endojen ligand) -3.74 kcal/mol, *chrysophanol* -4.42 kcal/mol ve *penicillic acid* (antagonist) -2.41 kcal/mol bağlanma skoru vermişlerdir.

Her bir protein-ligand kompleksine ait moleküler kenetlenme simülasyonlarından alınan en yüksek skorlu komplekslerin 2B ligand bağlantı diyagramları **Şekil 3.36’da** verilmiştir



Şekil 3.36. RhlR proteini ile **A.** *chrysophanol*, **B.** *penicillic acid*, **C.** C4-HSL komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı

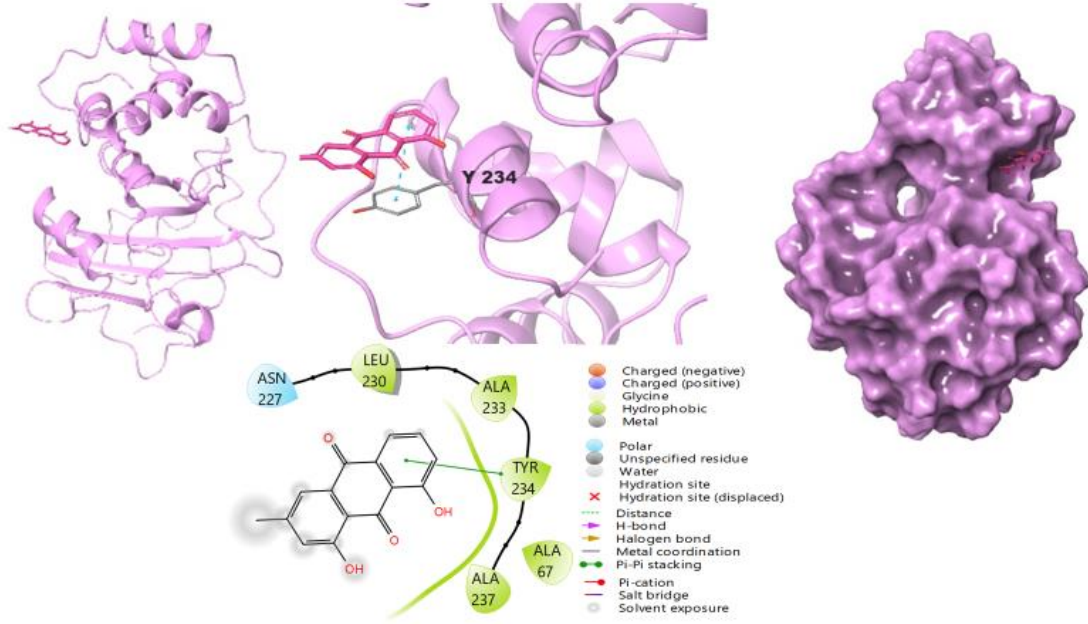
RhlR-ligand komplekslerine ait 2B diyagramlara bakıldığında (**Şekil 3.36**), RhlR-*chrysophanol* kompleksinde (**A**) ALA67, ARG71 ve TRP114 ile H bağı; RhlR-*penicillic acid* kompleksinde (**B**), ARG138 ile H bağı ve tuz köprüsü; RhlR- C4-HSL kompleksinde (**C**) ise TRP114 ile H bağı kurmuştur.

3.1.5.2. Moleküler Dinamik Simülasyonları

Moleküler kenetlenme simülasyonlarında hit olarak belirlenen her bir RhlR-ligand kompleksi **Yöntem 2.2.1.7'daki** protokole göre Desmond modülünde 250 ns boyunca simüle edilmiştir.

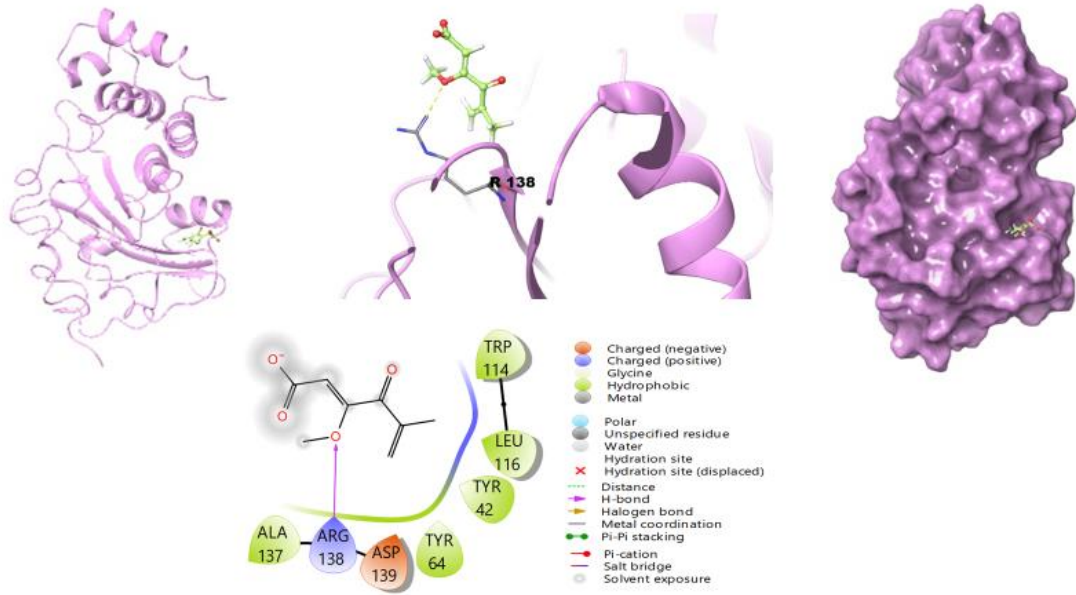
Apo (ligandsız protein), RhlR-C4-HSL (endojen ligand), RhlR-*chrysophanol* ve RhlR-*penicillic acid* (antagonist molekül) komplekslerinin 250 nanosaniyelik simülasyonu boyunca konformasyonel değişiklikleri **Şekil 3.37'**de verilmiştir.

Şekildeki 2B ve 3B yüzey görüntülerinde C4-HSL, LEU161 ile H bağı yapmıştır.



Şekil 3.39. RhlR-*chrysophanol* kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

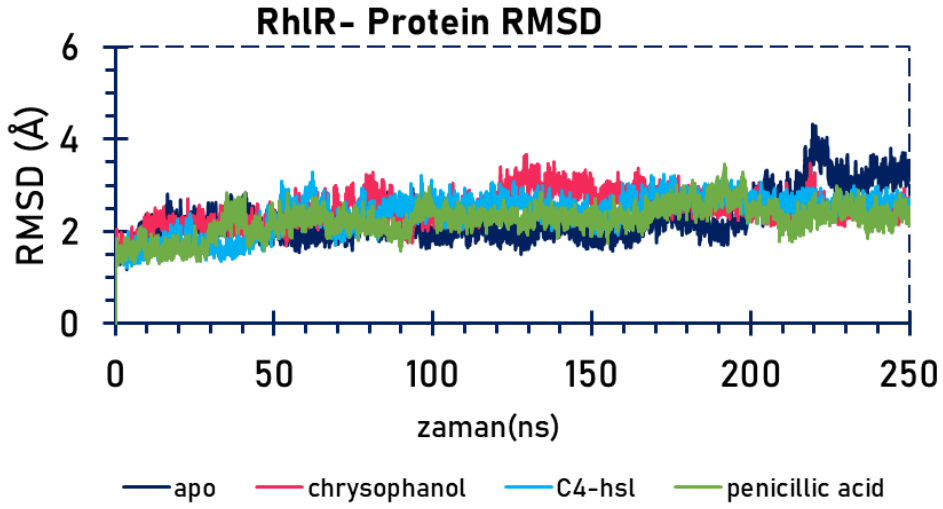
Şekildeki 2B ve 3B yüzey görüntülerinde *chrysophanol*, TYR234 nolu a.a ile pi-pi etkileşiminde bulunmuştur.



Şekil 3.40. RhlR-*penicillic acid* kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

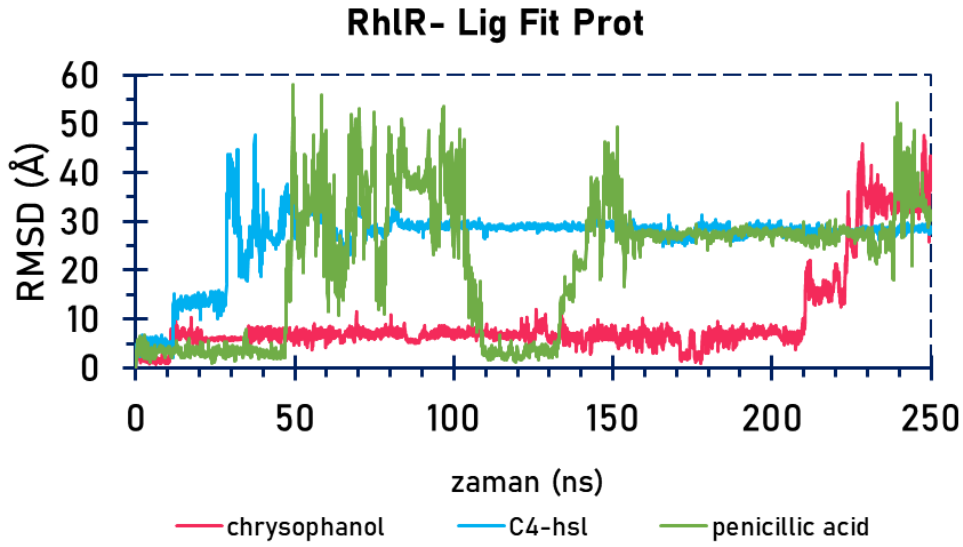
Şekildeki 2B ve 3B yüzey görüntülerinde *penicillic acid*, ARG138 ile H bağı yapmıştır.

RhlR ile C4-HSL, *chrysophanol* ve *penicillic acid* kompleksleri ile simüle edilen sistemlerin Prot-RMSD, LigFitProt, LigFitLig ve Protein-RMSF analizleri **Şekil 3.41-Şekil 3.43** arasında verilmiştir.



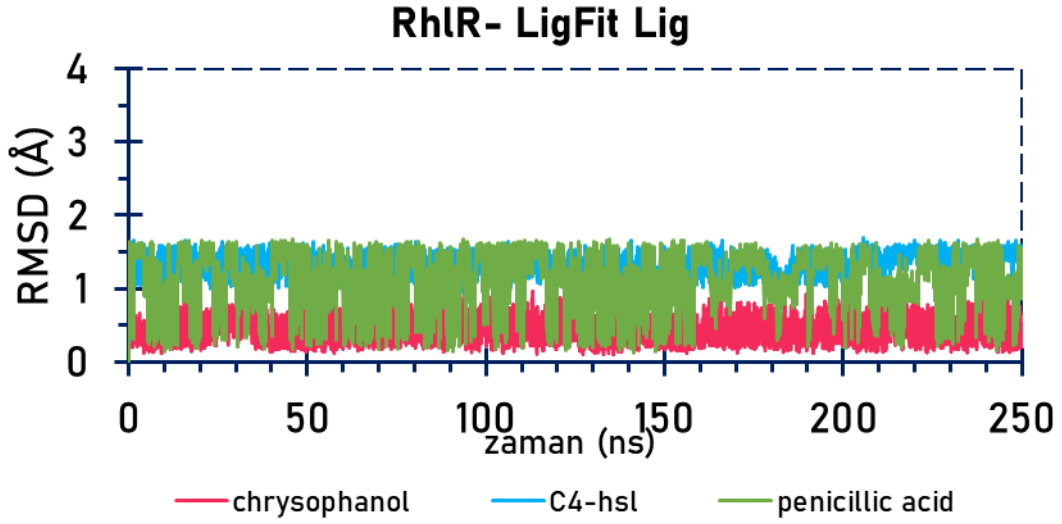
Şekil 3.41. RhIR yapısına ait homoloji modelin RMSD/ zaman (ns) grafiği

Şekil 3.41’de RhIR reseptörüne ait elde edilen homoloji model ile ligandların moleküler kenetlenme hesaplamalarından çıkan (en düşük enerjili bağlanma ve en iyi etkileşim kuran poz) en iyi pozlar ile 250 ns boyunca simüle edilen sistemlerin RMSD/zaman(ns) grafiği verilmiştir. Verilen grafiğe göre, simüle edilen tüm sistemler RMSD bazında dengeye ulaşmaktadır (yaklaşık 2-3 Å). Apo formuna bakıldığında, simülasyona 2Å düzeyinde başlayıp 4Å düzeyinde sonlandığı görülmektedir.



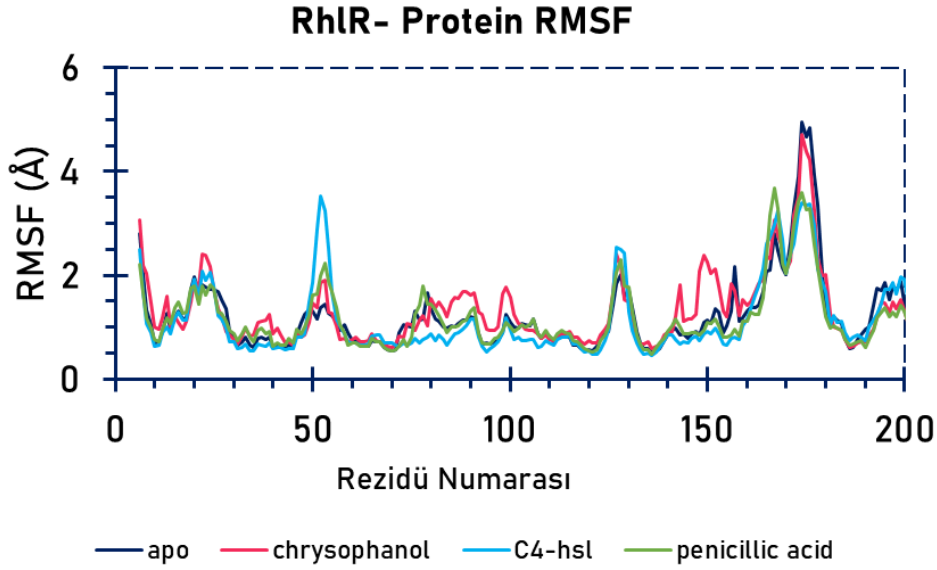
Şekil 3.42. RhlR'ye ait protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği

Şekil 3.42’de ligandların protein kompleksi içindeki durumları verilmiştir. Sinyal molekülü yani endojen ligand olan C4-HSL ise 30. Nanosaniyeden itibaren konumsal olarak sapma göstermiştir (yaklaşık 30 Å). *Penicillic acid* ise 50. Nanosaniyeden itibaren proteinden uzaklaşmakta 20 Å ile 60 Å kadar sapma göstermiştir. 110. Nanosaniyeden itibaren kısa bir süre dahilinde tekrar başlangıç konumuna dönmekte ve 130. Nanosaniyeden itibaren konumsal olarak tekrar sapma göstermiştir. *Chrysophanol* ise yaklaşık olarak 210. Nanosaniyeye kadar başlangıç konumunu korumakta ve 210. Nanosaniyeden itibaren proteinden uzaklaşmaktadır (yaklaşık 40 Å).



Şekil 3.43. RhIR'ye ait protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği

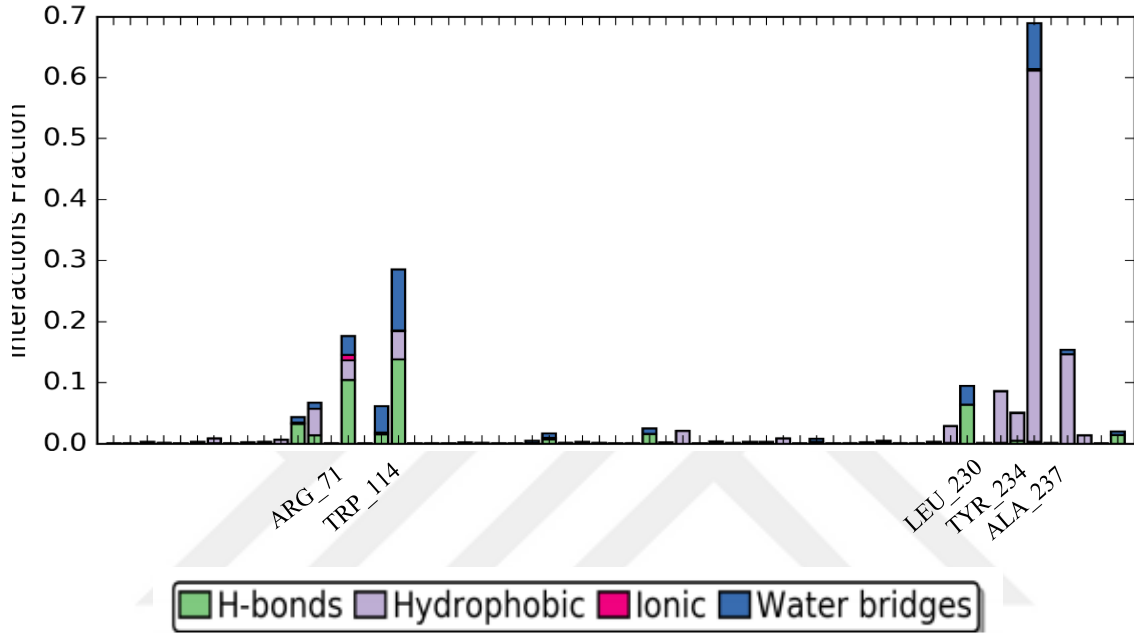
Şekil 3.43’de verilen lig fit grafiğinde ligandların proteinden bağımsız olarak kendi içlerindeki torsiyonel ve rotasyonel hareketlerine bağlı olarak RMSD/ zaman (ns) grafiği verilmiştir. Antagonist molekül olan *penicillic acid* ise, C4-HSL’ye göre dalgalı bir grafik vermekte olup RMSD değeri 0.3-1,5 Å arasında değişkenlik göstermiştir. *Chrysophanol* ise diğer ligandlara göre daha stabil olup, simülasyon boyunca konformasyonunu koruduğu söylenebilir.



Şekil 3.44. RhIR homoloji modeine ait RMSF/Rezidü Numarası grafiği

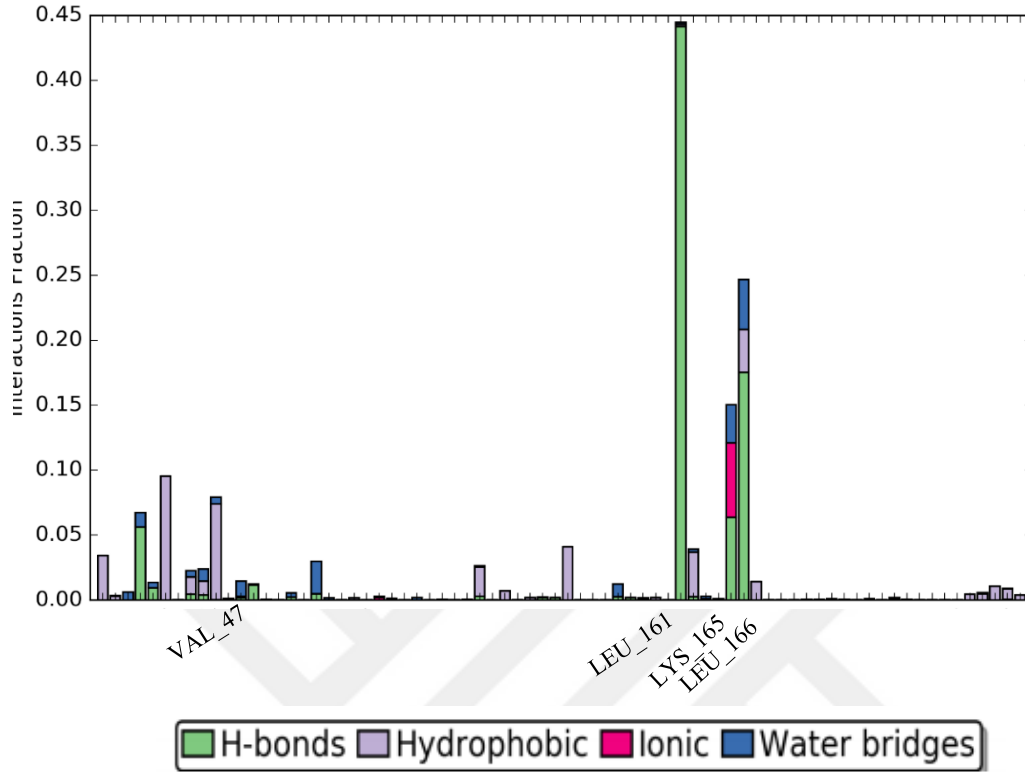
Şekil 3.44’de göre simüle edilen tüm sistemlere ait (apo ve kompleks yapılar) yüksek RMSF değerine sahip rezidüler sırası ile GLY6, HIE22, ASN128, THR167, MET175 (apo), GLY6, SER24, PRO52, PRO127, GLU150, THR167, LEU174 (*chrysophanol*), GLY6, PHE53, ASN128, THR167, LEU174 (*penicillic acid*) dir. Simülasyonun geneli boyunca yüksek pik veren aminoasitlerin 50-60 (beta tabaka), 80-100 (alfa heliks ve beta tabaka) ve 140-150 (alfa heliks) nanosaniyeler arasında bulunduğu görülmektedir.

RhlR sistemi için simüle edile protein-ligand komplekslerine ait histogramlar **Şekil 3.45** (2UV0-*chrysophanol*), **Şekil 3.46** (2UV0-C4-HSL) ve **Şekil 3.47**'de (2UV0-*penicillic acid*) verilmiştir.



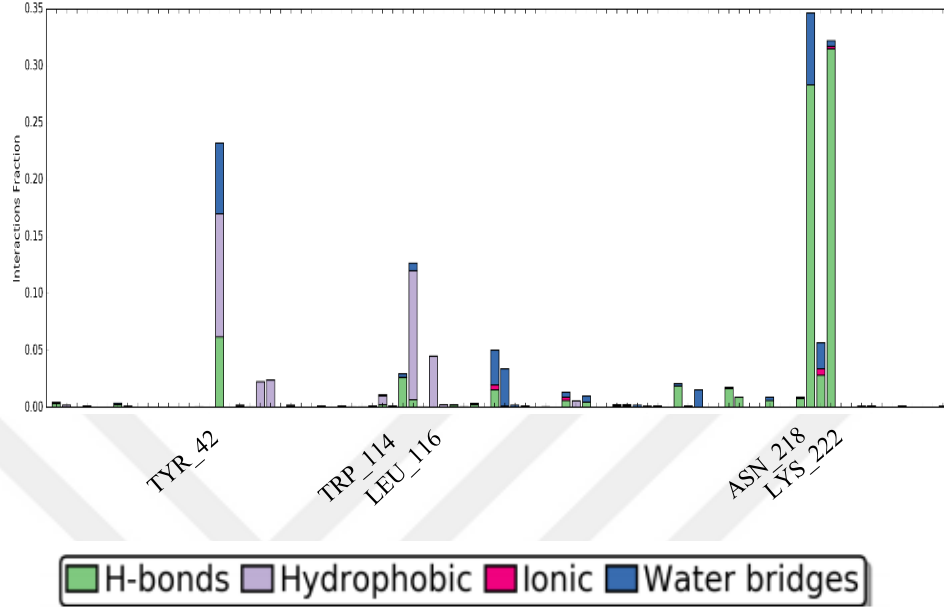
Şekil 3.45. RhlR homoloji model-*chrysophanol* kompleksine ait protein-ligand histogramı

Şekil 3.45'de RhlR- *chrysophanol* kompleksine ait verilen diyagrama göre TYR234 alfa heliks yapıda olup simülasyonun %60'ı oranında hidrofobik etkileşimler, %10 oranında ise su köprüsü kurmuştur. LEU23 ve ALA237 alfa heliks yapıda olup simülasyonun bir kısmında hidrofobik etkileşimler kurmuşlardır. TRP114 beta tabaka yapıda olup simülasyonun %15'i boyunca hidrojen bağı, %10'unda su köprüsü ve bir kısmında hidrofobik etkileşimler kurmuştur. ARG71 alfa heliks yapıda olup simülasyonun %10'u boyunca hidrojen bağı, bir kısmında ise hidrofobik etkileşimler, su köprüsü ve az bir kısmında da iyonik etkileşim kurmuştur.



Şekil 3.46. RhIR homoloji model- C4-HSL kompleksine ait protein-ligand histogramı

Şekil 3.46’da verilen komplekse ait histogramda LEU161 loop üzerinde olup %45i boyunca hidrojen bağı kurmuştur. LYS165 ve LEU166 loop üzerinde bulunup simülasyonun sırası ile %10’u ve %20si boyunca hidrojen bağı bir kısmında ise su köprüsü kurmaktadır. VAL47 loop üzerinde yapıda bulunup simülasyonun %10u boyunca hidrofobik etkileşimler kurmuşlardır.



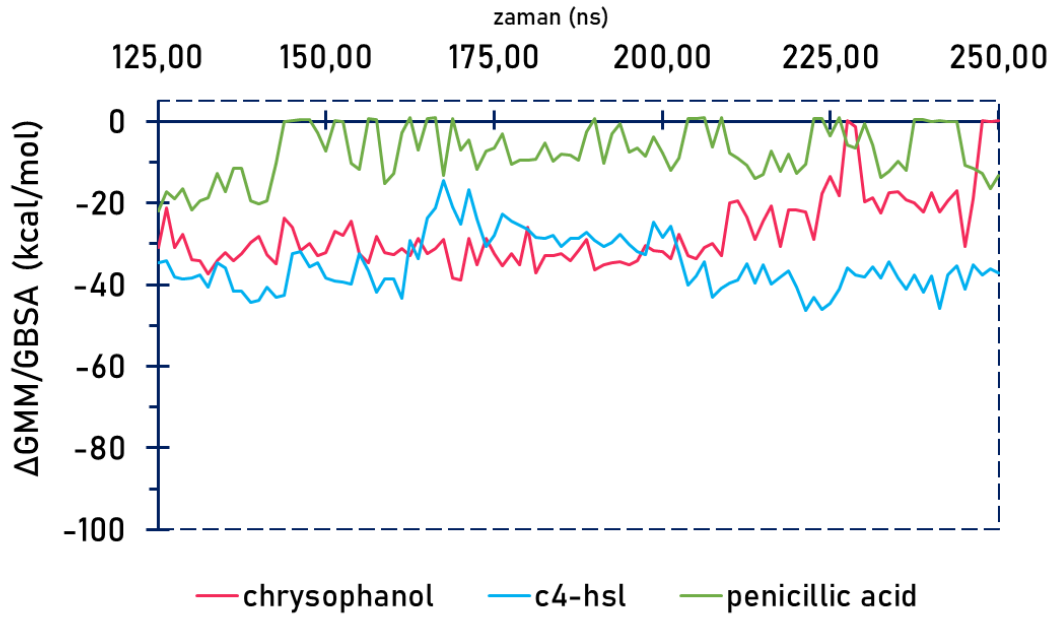
Şekil 3.47. RhlR homoloji model- *penicillic acid* kompleksine ait protein-ligand histogramı

ASN218 alfa heliks yapıda bulunup, simülasyonun yaklaşık %30'unda hidrojen bağı ve %5lik kısmında su köprüsü kurmuştur. LYS222 alfa heliks yapıda bulunup, simülasyonun yaklaşık %30'undan fazlasında hidrojen bağı ve çok az bir kısmında su köprüsü ve iyonik etkileşimler kurmuştur.

TYR42 loop üzerinde bulunup, 250ns lik simülasyonun %5'inde hidrojen bağı, %10'unda hidrofobik etkileşimler ve yaklaşık %5inde su köprüsü kurmuştur. TRP114 ve LEU116 beta tabaka yapıda bulunup sırasıyla simülasyonun %15'nde ve %5inde hidrofobik etkileşimler kurmuştur.

3.1.5.3. MM/GBSA analizleri

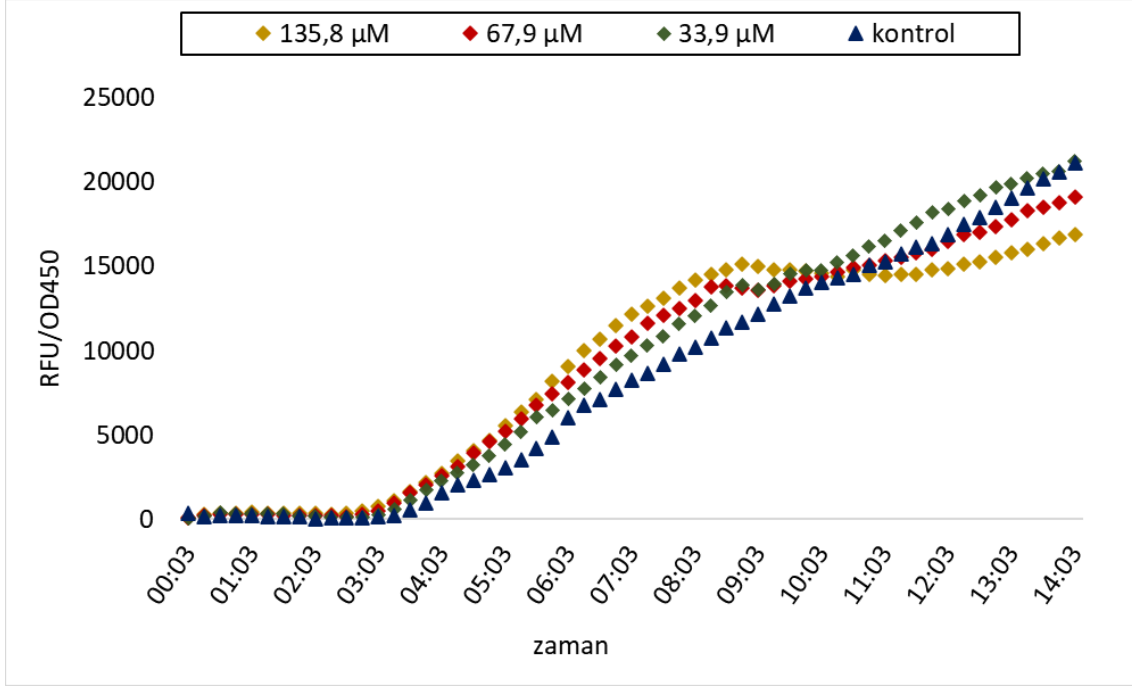
Simüle edilen RhlR-ligand kompleksleri için MM/GBSA serbest enerji hesaplamaları **Bölüm 2.2.1.8’de** belirtilen Schrödinger/Prime modülü ile gerçekleştirilmiştir. **Şekil 3.48’de** sırasıyla LasI ve LasR komplekslerine ait grafikler verilmiştir.



Şekil 3.48. RhlR protein ve ligand komplekslerine ait MMGBSA grafikleri

Şekilde verilen grafikte ortalama değerlere bakıldığında C4-HSL, *chrysophanol* ve *penicillic acide* ait MM/GBSA değerleri sırası ile; -34.89 kcal/mol, -27.28 kcal/mol, ve N/A dır.

3.1.5.4. *rhlA-gfp* suşu üzerindeki anti-QS aktivitesi



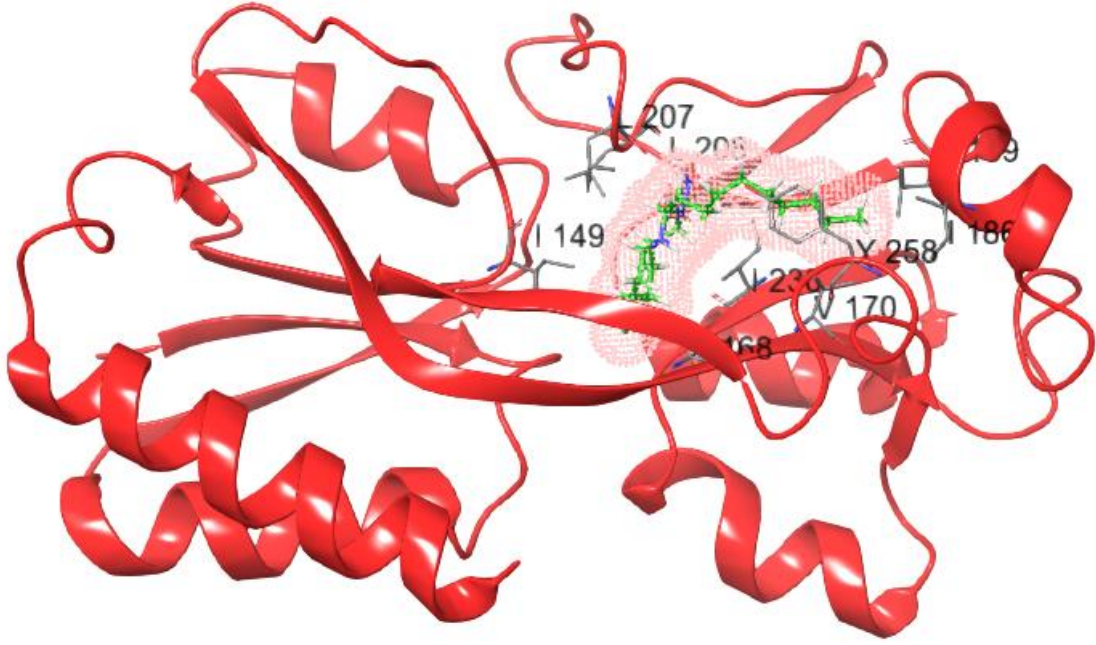
Şekil 3.49. 135,8 µM, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlarındaki *Chrysophanol* çözeltisinin *P. aeruginosa rhlA-gfp* suşu QS mekanizmasının inhibisyona ait RFU/OD grafiği. Kontrol grubuna *chrysophanol* çözeltisi eklenmemiştir.

Chrysophanol'ün 135,8 µM dozunda %20.15 oranında bir inhibisyon görülürken, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlarında belirgin bir inhibisyon görülmemiştir.

3.1.6. *Chrysophanol*ün pqs sistemi üzerine *in siliko* ve *in vitro* analizi

3.1.6.1. Moleküler Kenetlenme

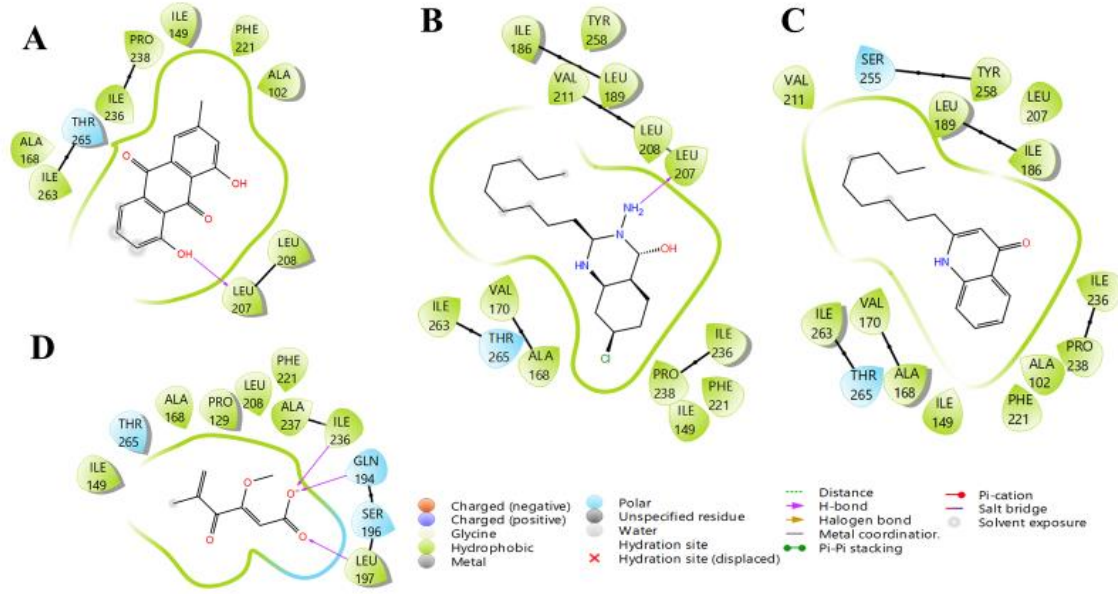
PqsR **Yöntem. 2.2.1.3'**deki protokole göre Protein Preparation Wizard modülü ile moleküler kenetlenme için hazırlanmıştır. PqsR'nın aktif bölgesi (grid generation) **Yöntem 2.2.1.5'** deki aktif bölge bilgisi ile belirlenmiştir. Oluşturulan gridin 3B yapısı **Şekil 3.50'**de gösterilmiştir. Moleküler kenetlenme simülasyonları **Yöntem 2.2.1.6'de** belirtilen Glide protokolünün SP (Standard Precision) modülüne göre gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.50. 4JVI reseptörünün aktif bölgesi ve ilgili rezidüleri

RhlR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonu sonucunda *NNQ* (agonist) -4.488 kcal/mol, *Chrysophanol* -6.63 kcal/mol ve *penicillic acid* (antagonist) -4.78 kcal/mol ve *QZN* (antagonist) -7.1 kcal/mol bağlanma skoru vermiştir.

Her bir protein-ligand kompleksine ait moleküler kenetlenme simülasyonlarından alınan en yüksek skorlu komplekslerin 2B ligand bağlantı diyagramları **Şekil 3.51**'de verilmiştir.



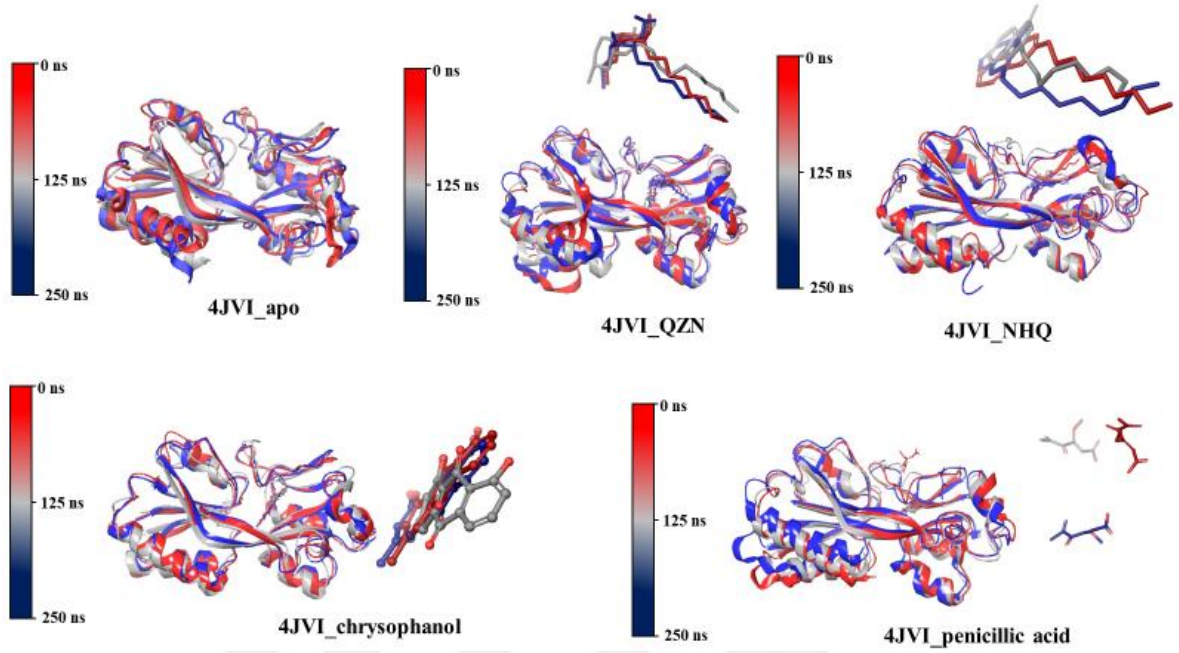
Şekil 3.51. 4JVI proteini ile **A. chrysophanol**, **B. QZN**, **C. NNQ** ve **D. penicillic acid** komplekslerine ait 2B protein-ligand bağlantı diyagramı

4JVI-ligand komplekslerine ait 2B diyagramlara bakıldığında, 4JVI-*chrysophanol* kompleksinde **(A)** LEU207 ile H bağı; 4JVI-QZN kompleksinde **(B)** ise LEU207 ile H bağı; ; 4JVI-NNQ kompleksinde **(C)** NNQ molekülünün herhangi bir polar veya yüklü aminoasit ile etkileşim kurmadığı ve 4JVI-*penicillic acid* kompleksinde **(D)** GLN194, LEU197 ve ILE236 numaraları aminoasit rezidüleri ile H bağı kurduğu gözükmemektedir.

3.1.6.2. Moleküler Dinamik Simülasyonları

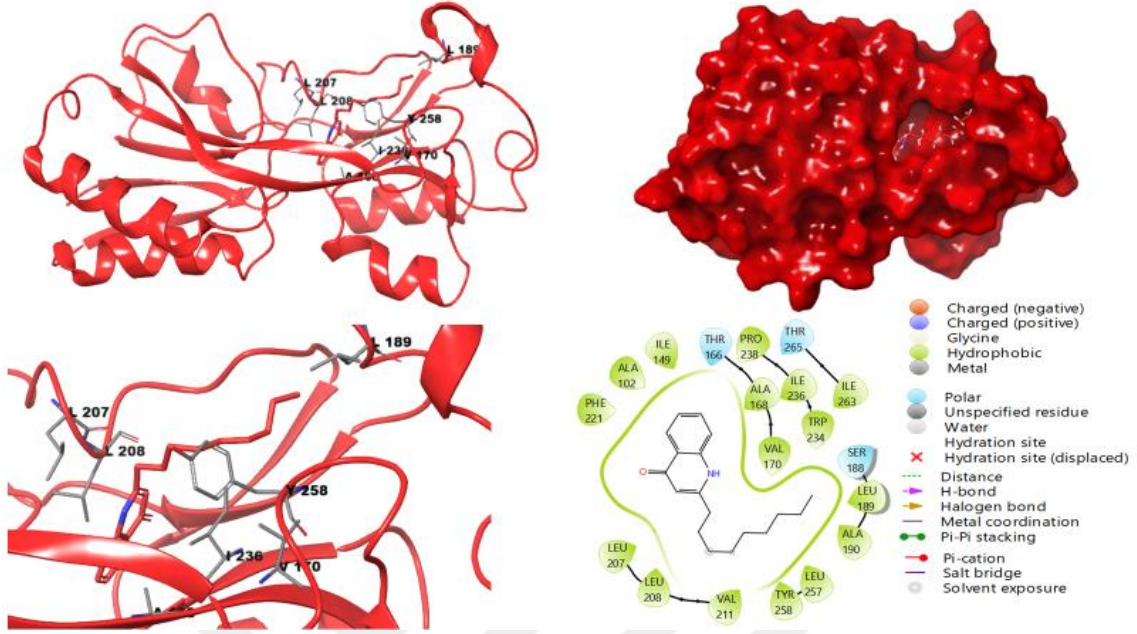
Moleküler kenetlenme simülasyonlarında hit olarak belirlenen her bir PqsR-ligand kompleksi **Bölüm 2.2.1.7'deki** protokole göre Desmond modülünde 250 ns boyunca simüle edilmiştir.

Apo (ligandsız protein), PqsR-NNQ (agonist), PqsR-*chrysophanol* ve PqsR-*penicillic acid*(antagonist), PqsR-QZN (antagonist) komplekslerinin 250 nanosaniyelik simülasyonu boyunca konformasyonel değişiklikleri **Şekil 3.52'de** verilmiştir.

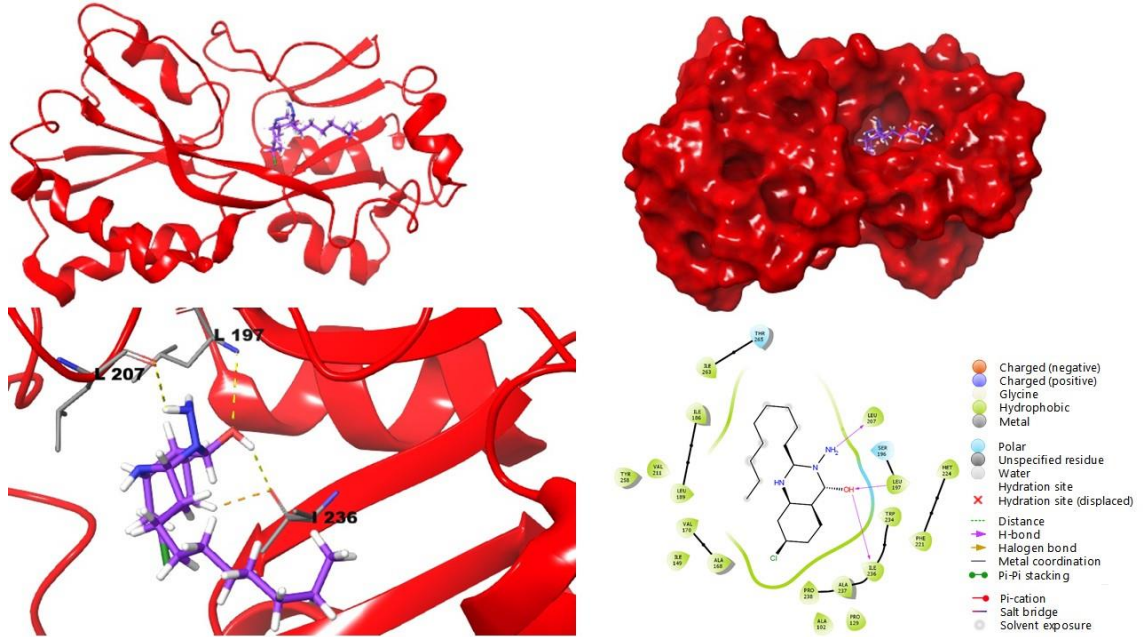


Şekil 3.52. PqsR-ligand komplekslerine ait 0-125-250 nanosaniye görüntüleri *Chrysophanol* molekülünün LasI, LasR ve RhIR reseptörlerindeki konformasyonundan farklı olarak PqsR reseptöründeki genel konformasyonun daha az değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca *penicillic acid* kompleksinde, ligandın simülasyon süresince konformasyonunun oldukça değiştiği de gözlemlenmiştir.

PqsR-NNQ (agonist), PqsR-*chrysophanol* ve PqsR-*penicillic acid* (antagonist), PqsR-QZN (antagonist) komplekslerinin 2B, 3B ve yüzey görüntülerinin detaylı yapısı **Şekil 3.53- Şekil 3.56** arasında verilmektedir.

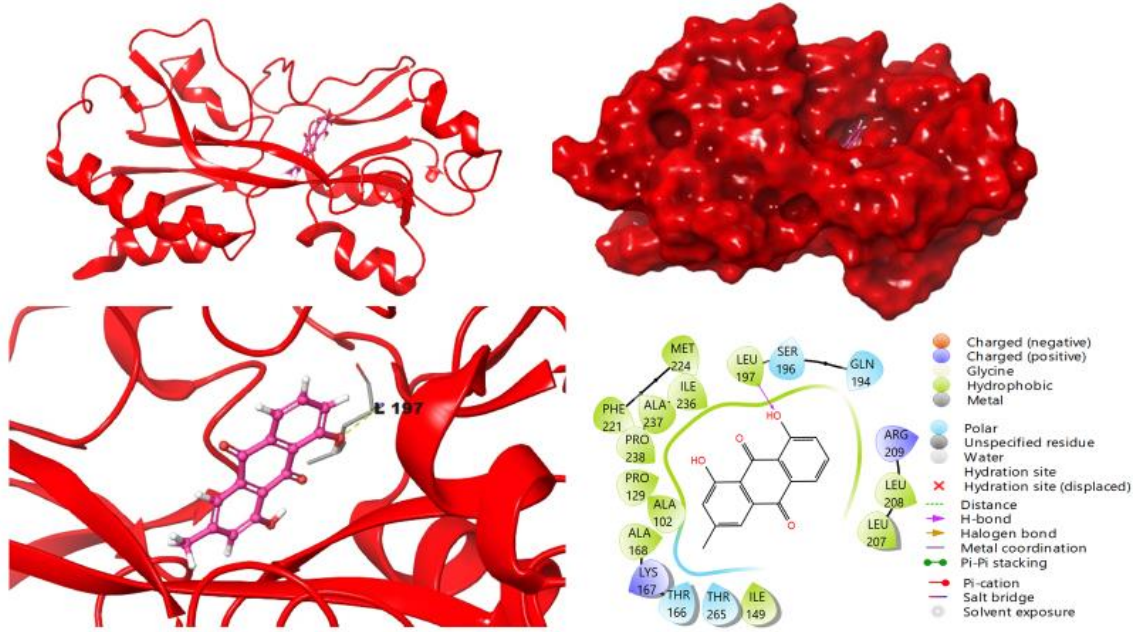


Şekil 3.53. 4JVI-agonist (NNQ) kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri



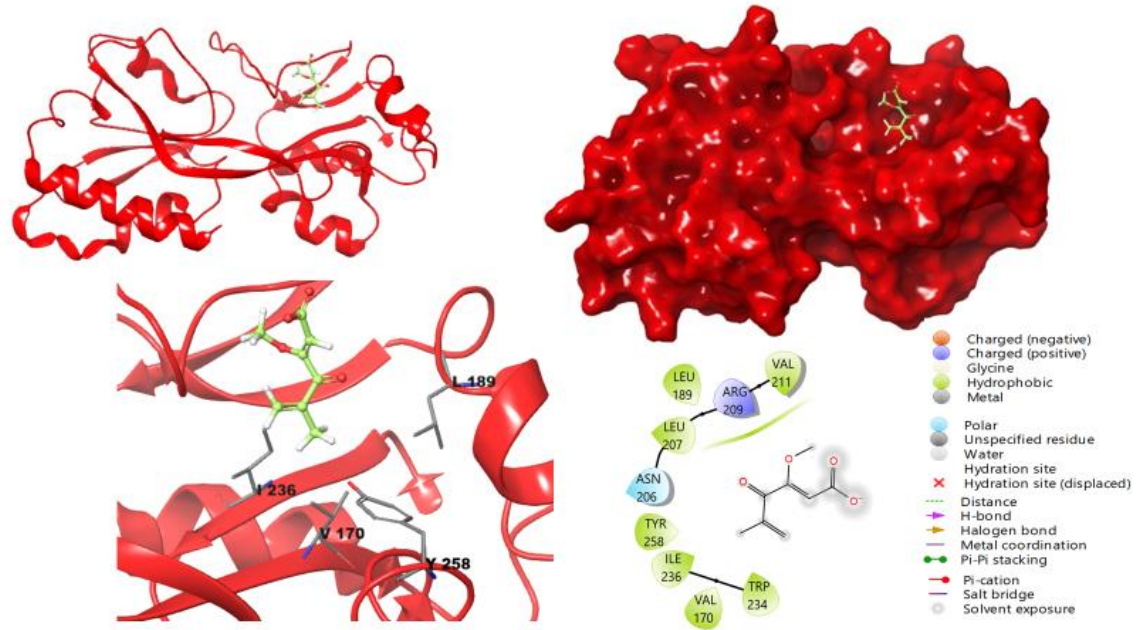
Şekil 3.54. 4JVI-antagonist (QZN) kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

QZN LEU197, LEU207 ve ILE236 H bağı kurmuştur.



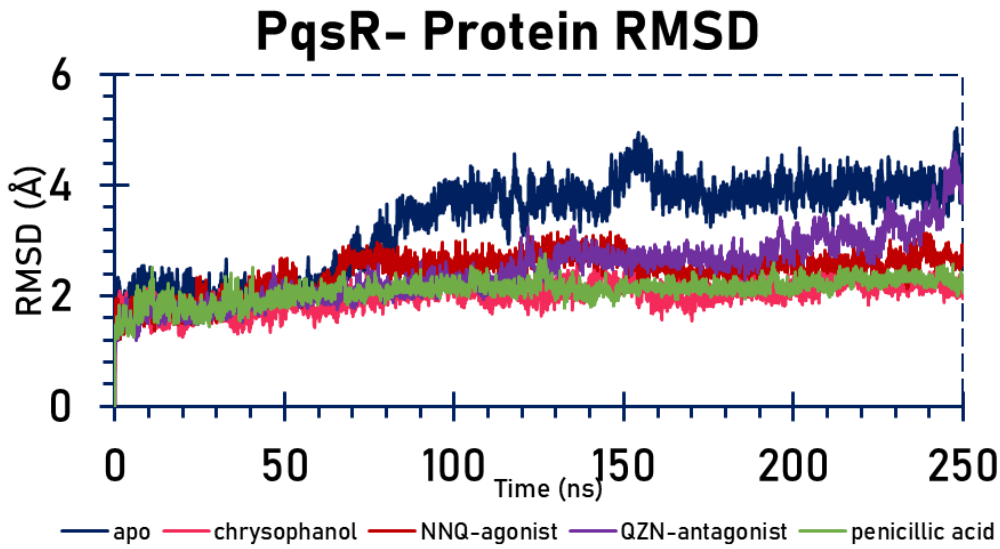
Şekil 3.55. 4JVI-chrysopanol kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

Şekilde *chrysophanol* LEU197 ile H bağı kurmuştur.



Şekil 3.56. 4JVI-penicillic acid kompleksinin 250 nanosaniyelik simülasyonundan alınan 3B, 2B ve yüzey görüntüleri

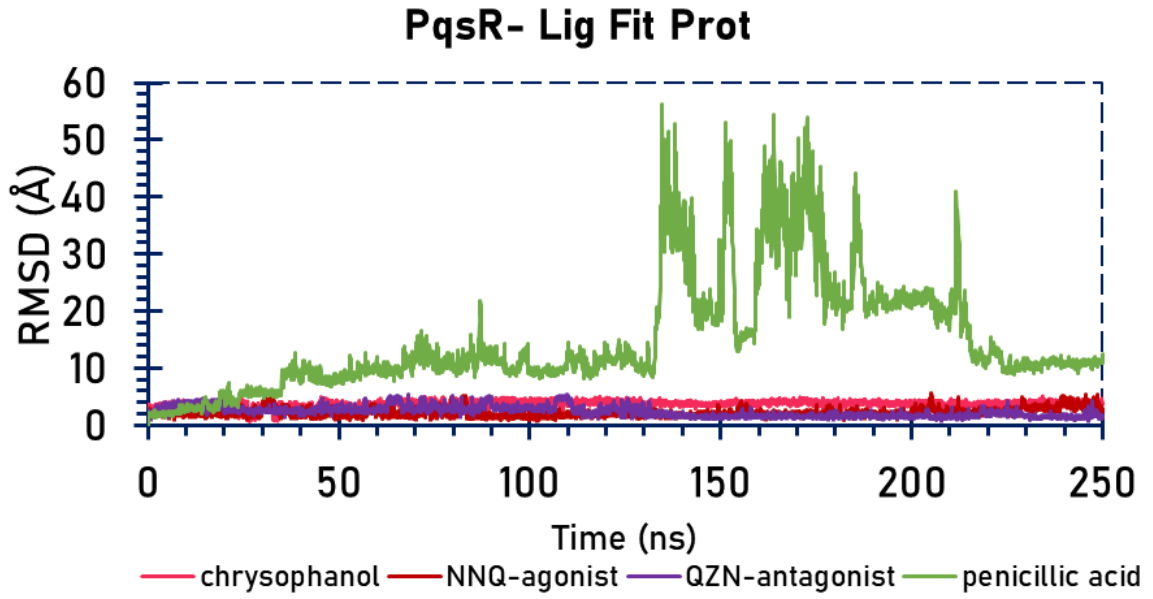
PqsR ile *NNQ*, *chrysophanol*, *penicillic acid* ve *QZN* kompleksleri ile simüle edilen sistemlerin Prot-RMSD, LigFitProt, LigFitLig ve Protein-RMSF analizleri **Şekil 3.57-Şekil 3.60** arasında verilmiştir.



Şekil 3.57. PqsR'ye ait Protein-RMSD grafiği

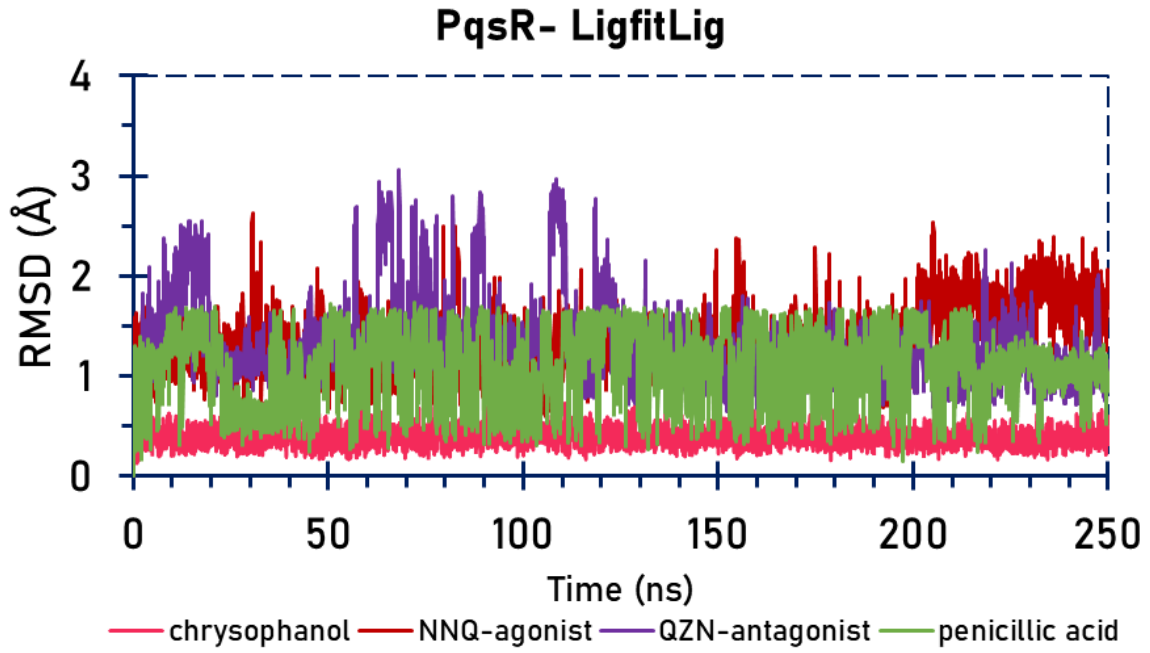
250 nanosaniye boyunca simüle edilen tüm sistemler RMSD bazında dengeye ulaşmaktadır. Yalnız antagonist olan *QZN* molekülünde 230. Nanosaniyeden itibaren RMSD seviyesinde bir artış gözlemlenmiştir (yaklaşık 4Å).

Apo (ligand olmayan) sistem 4Å seviyesinde dengelenmektedir. Buna bağlı olarak diğer sistemlere bakıldığında *chrysophanol*, antagonist molekül *penicillic acid*; endojen ligand olan *NNQ* ile benzer RMSD seviyelerinde bulunmuştur (yaklaşık 2 Å). Bununla birlikte *chrysophanol* molekülü simülasyonun başından sonuna kadar dengeli olup sistemde belirgin bir sapma görülmemiştir.



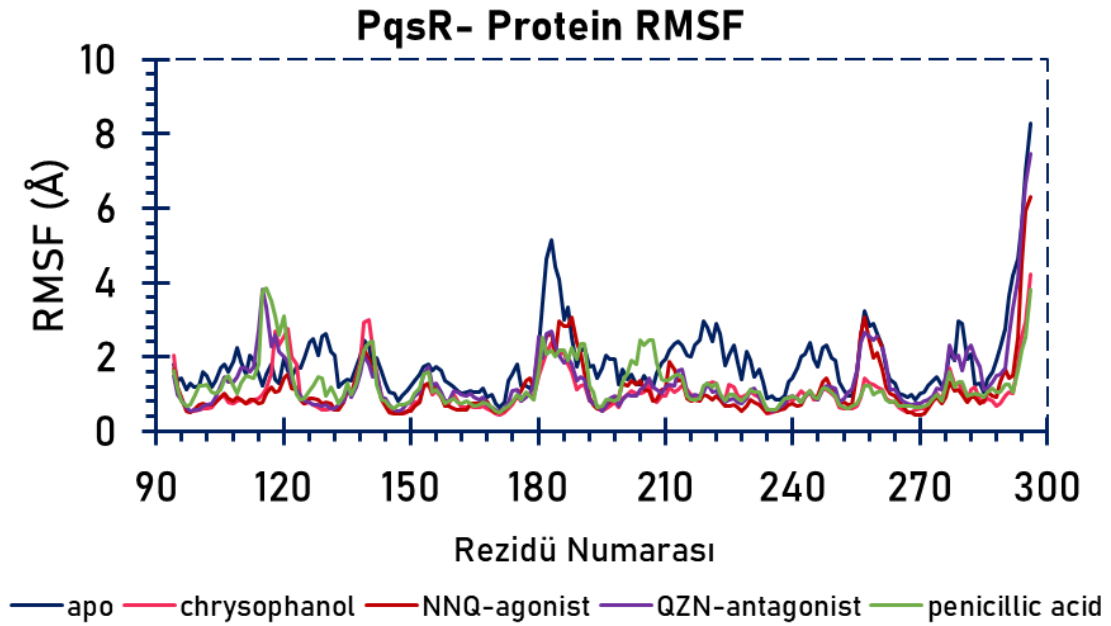
Şekil 3.58. PqsR'ye ait protein ile ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/ zaman (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Prot grafiği

Penicillic acid molekülünün protein içerisindeki torsiyonel hareketlerinin yaklaşık 20. nanosaniyeden itibaren proteinden uzaklaşmaya başlayarak sapmasının yükseldiği, 130. Nanosaniyeden itibaren ise sapmasının 60 Å seviyelerine kadar çıktığı görülmüştür. *Chrysophanol* molekülünün konumu simülasyon boyunca belirgin sapmalar gözlenmeksizin 4 Å seviyelerinde kalmıştır. Agonist molekül *NNQ* ile antagonist molekül *QZN* benzer RMSD seviyelerinde bulunmuştur.



Şekil 3.59. PqsR proteinine ait ligand, agonist ve antagonist moleküllerin RMSD(Å)/Time (ns) değerlerine bağlı olan Lig Fit Lig grafiği

Penicillic acid molekülünün simülasyon süresince translasyonel hareketi yaklaşık 0.1 Å - 1.5 Å arasında değişmektedir. *Chrysophanol* ise simülasyonun başından sonuna kadar 0.5 Å civarında seyretmekte ve stabil kalmıştır. *QZN* ve *NNQ* ‘ya bakıldığında birbirlerine yakın olarak 2 Å civarında görülmüştür.

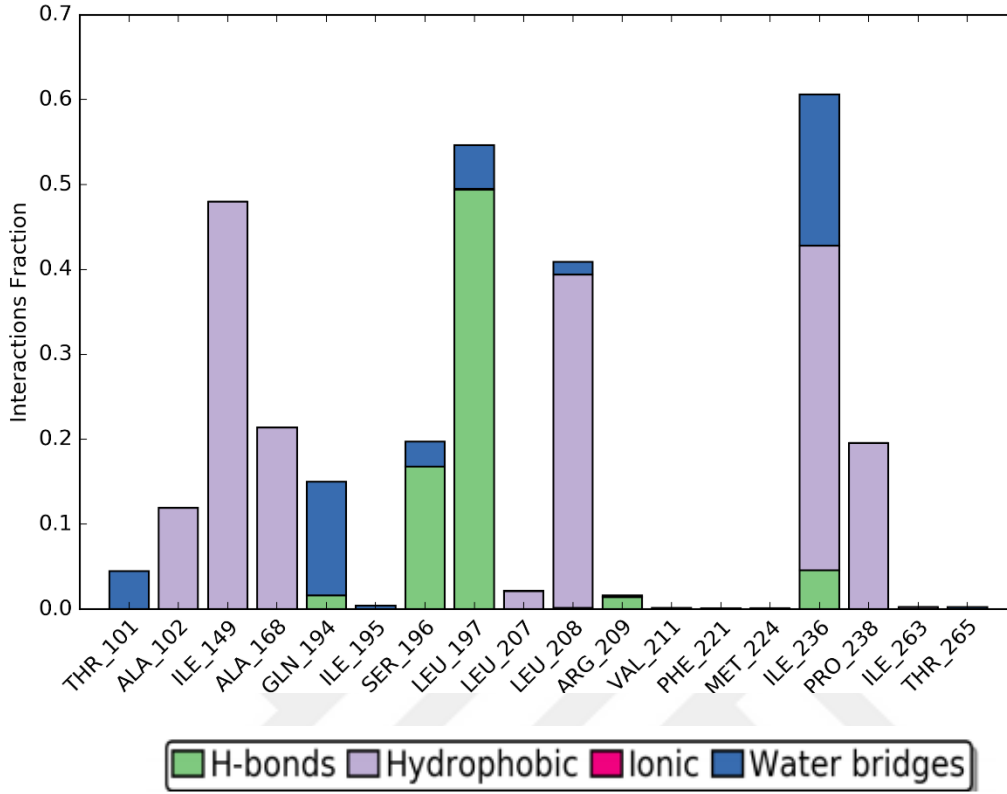


Şekil 3.60. PqsR proteinine ait RMSF/Rezidü Numarası grafiği

Proteindeki alfa karbon atomlarındaki değişimin aminoasit rezidülerindeki dağılımı RMSF grafiği ile ifade edilmektedir. Yüksek RMSF değeri gösteren rezidüler, LEU183, ASN220, GLY296 (apo), MET121, ASN140, GLY296 (*chrysophanol*), SER188, LEU257, LEU295 (*NNQ*), LEU116, HIE184, 296 (*QZN*), ASP117, ASN140, LEU183, SER205, GLY296 (*penicillic acid*) dir.

180-190 (alfa heliks), 250-260 numaralı rezidülerin genel olarak yüksek pik gösterdiği gözükmemektedir. İçlerinden ILE186, LEU189 ve TYR258 aktif bölgede bulunan aminoasit rezidüleridir.

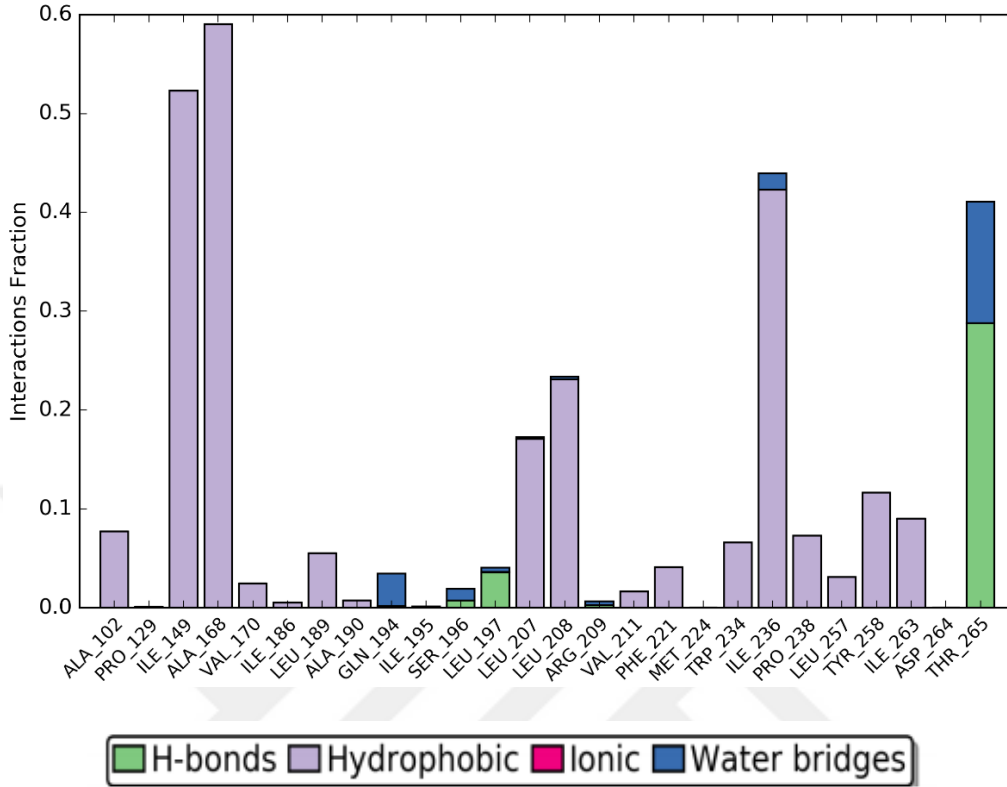
250 nanosaniye boyunca PqsR sistemi için simüle edile protein-ligand komplekslerine ait histogramlar **Şekil 3.61-** **Şekil 3.64** arasında verilmiştir.



Şekil 3.61. PqsR- *chrysophanol* kompleksine ait protein ligand histogramı

Verilen komplekse ait histogramda ILE149 adlı aminoasit alfa heliks yapıda olup 250 nanosaniyelik simülasyonun %50'sinde, LEU208 %40'ında , PRO238 %20'sinde, ALA102 ise %15inde hidrofobik etkileşimler kurmuşlardır.

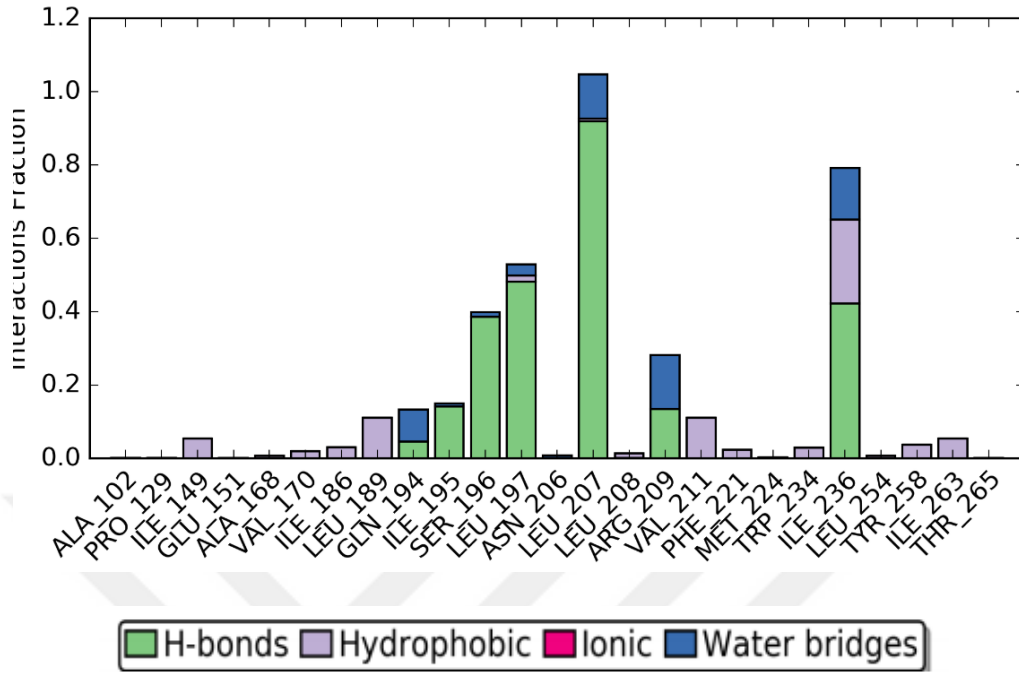
ILE236 simülasyonun %30'unda hidrofobik, %20'sinde su köprüsü, %10'unda ise hidrojen bağı kurmuştur. LEU197, alfa heliks yapıda olup, simülasyonun %50'sinde hidrojen bağı, %10'unda su köprüsü kurmakta olup SER196 simülasyonun %20'sinde hidrojen bağı kurmuştur.



Şekil 3.62. PqsR- NNQ (agonist) kompleksine ait protein-ligand histogramı

PqsR-NNQ agonist histogramında, ILE149 beta tabaka yapı üzerinde bulunup simülasyonun %50'si boyunca, ALA168 loop üzerinde bulunup simülasyonun %60'ı boyunca hidrofobik etkileşimler kurmuştur.

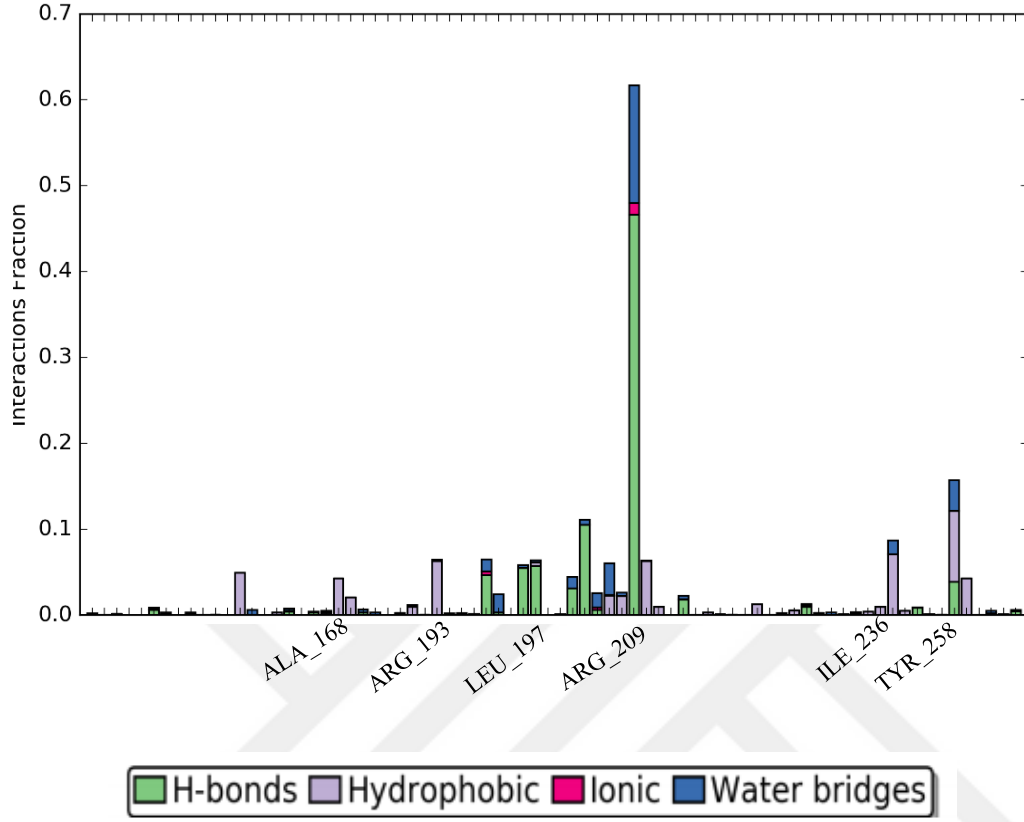
ILE236 250 nanosaniyelik %45'inde , LEU208 %25'inde ve LEU207 %20'sinde hidrofobik etkileşimler kurmuştur. ALA102, LEU189, TRP234, PRO238, TYR258, ILE263 aminoasitleri ise simülasyonun yaklaşık %10'u boyunca hidrofobik etkileşimler kurmaktadır. THR265 ise simülasyonun %30'u boyunca hidrojen bağı, %20'si boyunca ise su köprüsü kurmuştur.



Şekil 3.63. PqsR- QZN (antagonist) molekülüne ait protein-ligand histogramı

PQsR-QZN kompleksine ait histogramda 250 nanosaniyelik simülasyonda aminoasitlerin hidrojen bağı, hidrofobik/iyonik etkileşim veya su köprüsü kurma yüzdeleri belirtilmiştir. Bu histograma göre ILE195, simülasyonun yaklaşık %20'sinde ve SER196 %40'ında hidrofobik etkileşim kurmuştur. LEU207 ise simülasyonun tamamında hidrojen bağı kurarken bu sürenin %20'si boyunca da su köprüsü kurmuştur.

ILE236 simülasyonun %50'sinde hidrojen bağı, %20'sinde hidrofobik etkileşim ve yaklaşık %10'unda ise su köprüsü kurmuştur. ILE189 ve VAL211 aminoasitleri ise simülasyonun yaklaşık %10'u boyunca hidrofobik etkileşim kurmuştur.



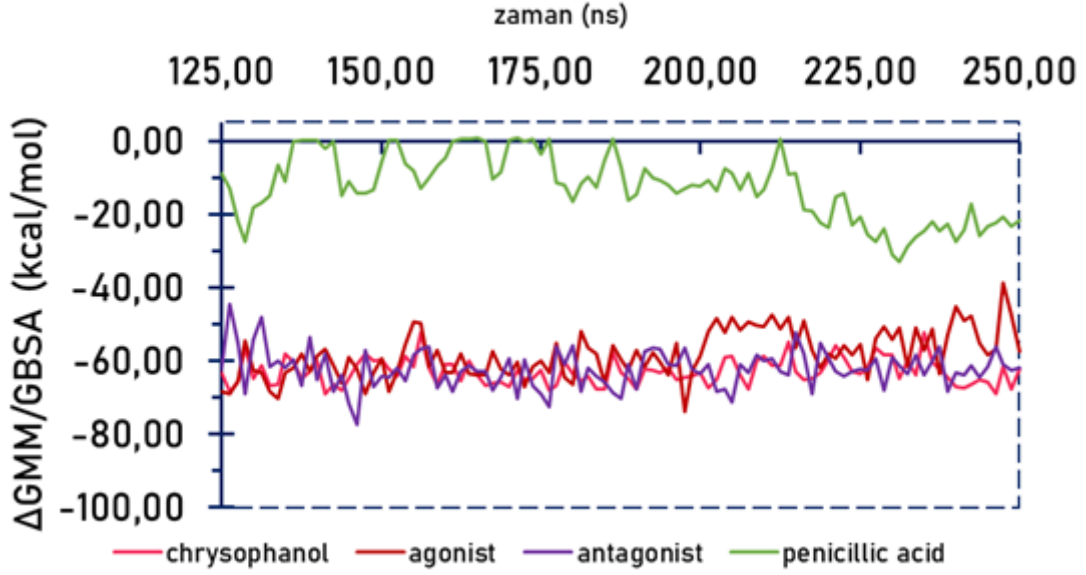
Şekil 3.64. PqsR- *penicillic acid* molekülüne ait protein-ligand histogram

Histogramda ARG209, 250 nanoaniyelik simülasyonun %50'si boyunca hidrojen bağı kurarken, simülasyonun yaklaşık %10'u boyunca su köprüsü ve bir miktar da iyonik etkileşim kurmuştur.

ARG193, ALA168, LEU197 aminoasitleri simülasyonun yaklaşık %10'u boyunca hidrojen bağı kurmuştur. ILE236 ise yaklaşık %10'u süresince hidrofobik ve az miktarda iyonik etkileşim kurmuştur. TYR258 aminoasiti, simülasyonun %5'i boyunca hidrojen bağı, %10'u boyunca hidrofobik etkileşim ve %5'i boyunca ise su köprüsü kurmuştur.

3.1.6.3. MM/GBSA analizleri

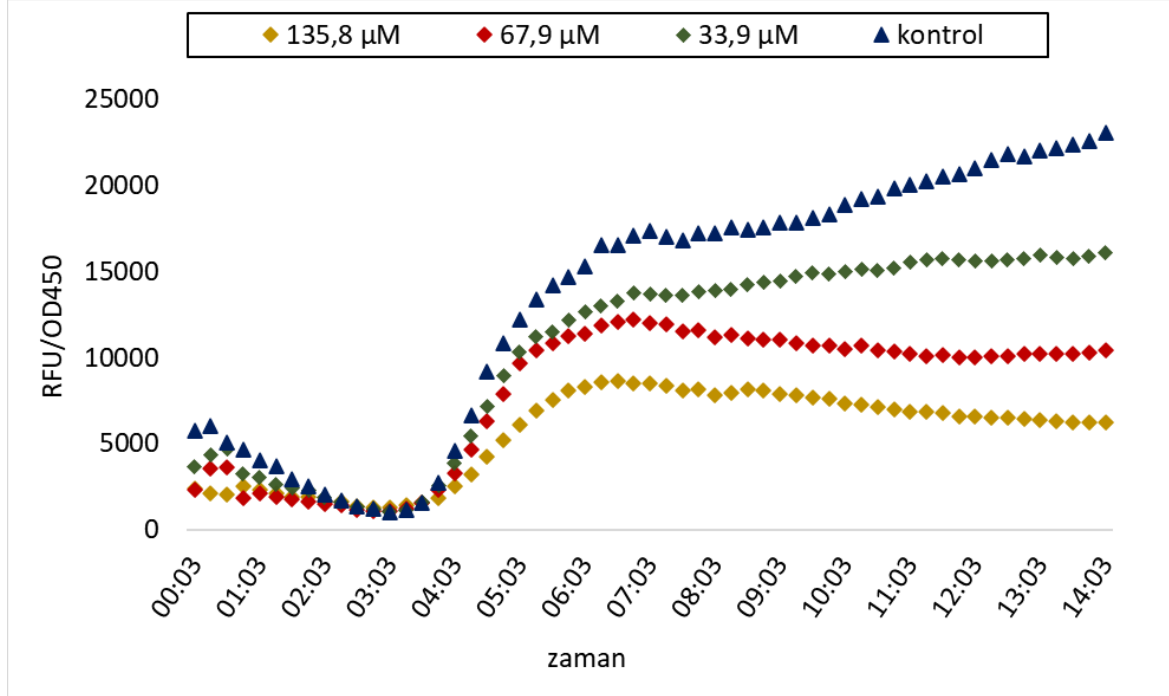
Simüle edilen RhIR-ligand kompleksleri için MM/GBSA serbest enerji hesaplamaları Bölüm 2.2.1.8’de belirtilen Schrödinger/Prime modülü ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.65’de RhIR komplekslerine ait analizler verilmiştir.



Şekil 3.65. PqsR protein ve ligand komplekslerine ait MM/GBSA grafikleri

Verilen grafikte ortalama değerlere bakıldığında QZN (antagonist), NNQ (agonist), *Chrysophanol* ve *penicillic acid*’e ait MM/GBSA değerleri sırası ile; -62.33 kcal/mol, -58.24 kcal/mol, -63.07 kcal/mol ve N/A’dır. *Chrysophanol* molekülünün skoru agonist ve antagoniste yakın olduğu gözükmemektedir.

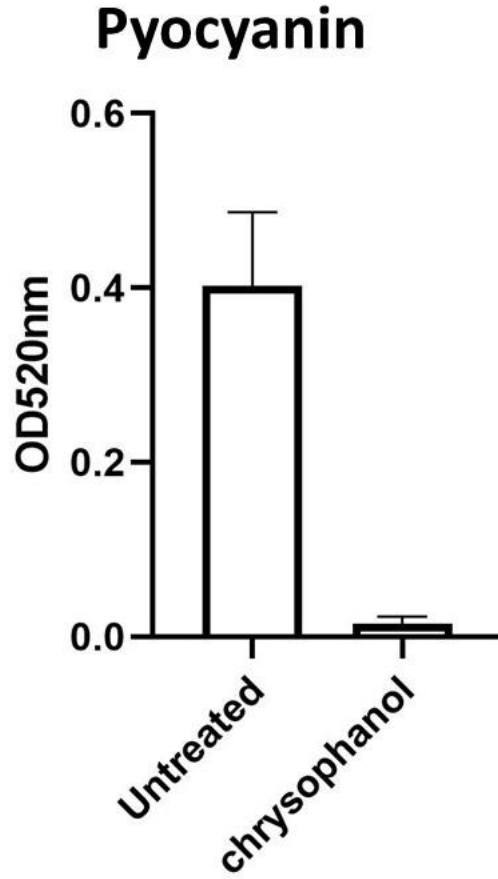
3.1.6.4. *pqsA-gfp* suşu üzerindeki anti-QS aktivitesi



Şekil 3.66. 135,8 µM, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlarındaki *Chrysophanol* çözeltisinin *P. aeruginosa pqsA-gfp* suşu QS mekanizmasının inhibisyona ait RFU/OD grafiği. Kontrol grubuna *chrysophanol* çözeltisi eklenmemiştir.

Chrysophanol'ün 135,8 µM, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlarının *pqsA-gfp* suşu üzerine QS inhibisyon oranları, sırasıyla %73.06, %54.95 ve %30.48 olarak belirlenmiştir.

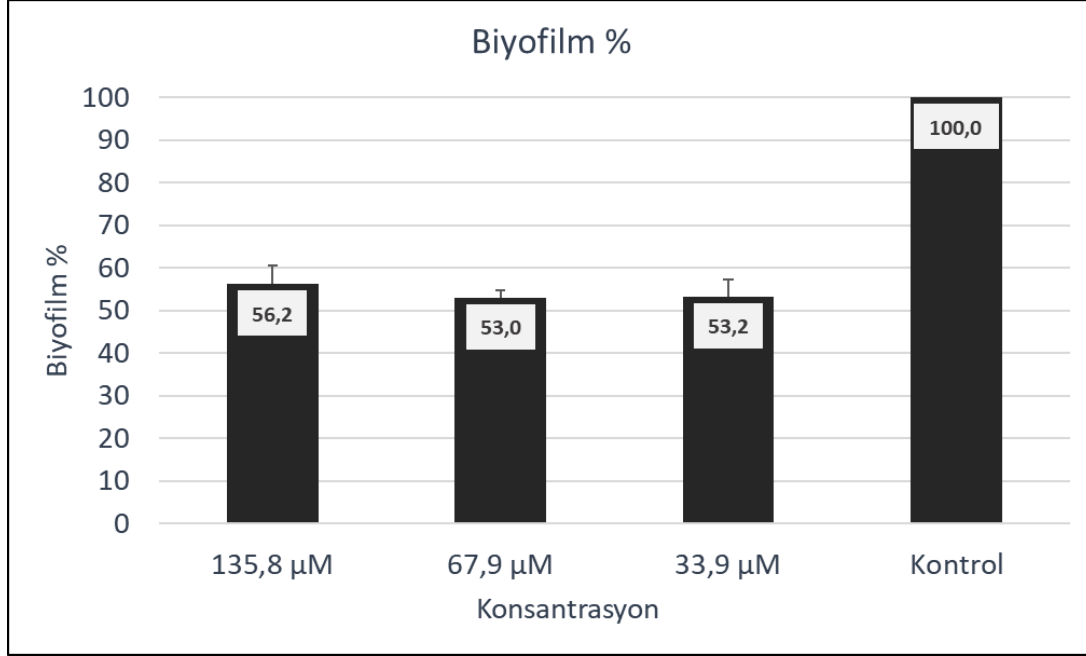
3.1.6.5. Piyosiyanin üretimi üzerindeki etkisi



Şekil 3.67. *Chrysophanol*’ün 135,8 μ M dozunun OD520nm’de piyosiyanin üretimine etkisi. Kontrol grubuna *chrysophanol* çözeltisi eklenmemiştir.

Chrysophanol uygulama yapılmamış gruba göre piyosiyanin üretimini %96.3 oranında inhibe etmiştir.

3.1.7. *Chrysophanol*ün PAO1 üzerindeki Antibiyofilm etkisi



Şekil 3.68. 135,8 µM, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlarındaki *Chrysophanol* çözeltisinin *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerine biyofilm (OD-590nm) inhibisyonu grafiği. Kontrol grubuna *chrysophanol* eklenmemiştir.

Elde edilen bulgulara göre, *P. aeruginosa* PAO1 suşu ile muamele edilen *Chrysophanol* çözeltisinin 135,8 – 33,9 µM arasındaki dozlarının hepsi birden biyofilm inhibisyonu gerçekleştirmiştir. 135,8 µg/M’lık, 67,9 µM’lık ve 33,9 µM’lık konsantrasyonlarındaki özütlerin inhibisyon oranları sırasıyla, %43,81 (±4,24), %46,97 (±1,69) ve %46,80 (±3,91) olarak hesaplanmıştır. Tüm konsantrasyonlardaki *Chrysophanol* çözeltisi birbirine yakın oranlarda % inhibisyon vermiştir.

Tablo 3.5. A. LasI, B. LasR, C. PqsR ve D. RhlR reseptörleri ve ligandlara ait kenetlenme skoru, MD analizlerinin ve MM/GBSA analizlerinin ortalama değerleri

A.

	LasI-kenetlenme skoru (Glide/SP) (kcal/mol)	ortalama RMSD (Å)			ortalama (kcal/mol) MM/GBSA
		LigfitProt	LigfitLig	Ca	
<i>chrysophanol</i>	-5.853	4.12 (±1.72)	0.30 (±0.08)	2.05 (±0.26)	-60.71
<i>penicillic acid</i>	-3.513	3.36 (±1.19)	0.58 (±0.30)	3.15 (±1.14)	N/A
3-oxo-C12-HSL	-2.387	4.41 (±0.95)	2.01 (±0.33)	2.43 (±0.42)	-63.80

B.

	LasR-kenetlenme skoru (Glide/SP) (kcal/mol)	ortalama RMSD (Å)			ortalama (kcal/mol) MM/GBSA
		LigfitProt	LigfitLig	Ca	
<i>chrysophanol</i>	-6.83	7.07 (±1.42)	0.24 (±0.08)	1.89 (±0.34)	-47,97
<i>penicillic acid</i>	-2.86	1.98 (±0.44)	0.59 (±0.22)	1.55 (±0.13)	N/A
3-oxo-C12-HSL	-8.34	1.31 (±0.23)	0.9 (±0.19)	1.50 (±0.29)	-86,47

C.

	PqsR-kenetlenme skoru (Glide/SP) (kcal/mol)	ortalama RMSD (Å)			ortalama (kcal/mol) MM/GBSA
		LigfitProt	LigfitLig	Ca	
<i>chrysophanol</i>	-6.63	3.78(±0.54)	0.39(±0.09)	2.0(±0.24)	-63.07
<i>penicillic acid</i>	-4.79	15.03 (±10.17)	1.10(±0.36)	2.09(±0.21)	N/A
NNQ	-4.49	2.22(±0.69)	1.34(± 0.31)	2.42(±0.34)	-58.24
QZN	-7.1	2.37(±0.90)	1.29(±0.41)	2.46(±0.57)	-62.33

D.

	RhlR-kenetlenme skoru (Glide/SP) (kcal/mol)	ortalama RMSD (Å)			ortalama (kcal/mol) MM/GBSA
		LigfitProt	LigfitLig	Ca	
<i>chrysophanol</i>	-4.43	9.78 (±8.79)	0.44 (± 0.17)	2.49 (±0.35)	-27.28
<i>penicillic acid</i>	-2.41	21.86 (±13.39)	1.12 (±0.38)	2.24 (±0.33)	N/A
C4-HSL	-3.74	26.53 (±6.56)	1.34 (±0.14)	2.38 (±0.4)	-34.89

Tablo 3.6. *Chrysophanol* molekülünün *in vitro* deneylerine ait yüzde inhibisyon verileri

	<i>lasB-gfp</i>	<i>rhlA-gfp</i>	<i>pqsA-gfp</i>	PAO1-Biyofilm	piyosiyanin	elastaz	proteaz
135,8 µM	% 52.60	% 20.1	% 73.1	% 43.8	% 96.3	% 88.3	% 52.3
67,9 µM	% 34.21	% 9.4	% 54.9	% 46.9			
33,9 µM	% 16.51	% -0.4	% 30.5	% 46.8			



3.2. TARTIŞMA

Anti-virölans tedavi yaklaşımları, dirençli patojenlerin patogenezinin önlenmesinde potansiyel bir hedef haline gelmiştir (Martinez ve ark., 2019). Bu nedenle, bakterisidal veya bakteriyostatik etkiler yoluyla bakterileri ortadan kaldırmayan, ancak patojenspesifik müdahale ile virölans mekanizmaları üzerinde etki gösteren antivirölans stratejisi önem kazanmıştır (Schütz, C., & Empting, M., 2018). Tasarlanmış bir antivirölans maddede (i) bakteri üremesini veya canlılığını bozmamak, direnç gelişimi için baskıyı azaltmak; (ii) bakterinin virölans faktörleri üretmesi için gereken yolağa spesifik olmak; (iii) evrimsel olarak korunmuş bir virölans özelliği hedefleyerek farklı patojenlere karşı etkili olmak; (iv) konakçı için toksik olmayan ve düşük aktif konsantrasyonlarda bulunmak ve (v) kimyasal sentez için maliyetinin düşük, optimizasyona açık ve yüksek verimli olması gibi özellikler bulunmalıdır (Silva ve ark., 2016).

Quorum Sensing sistemi (QS) birçok virölans faktörün üretilmesinden ve biyofilm oluşumundan sorumlu olduğu için antivirölans ilaçlarının keşfinde QS sistemlerinin bloke edilmesi (QQ-quorum quenching) önemli bir yaklaşım olarak bilinmektedir (Defoirdt, 2017; Schütz ve Empting, 2018). *P. aeruginosa*'nın QS sistemini, biyofilm oluşumu ve virölans faktörü üretimini azaltma yolu ile bloke edebilen QS antagonistlerinin geliştirilmesi QQ stratejilerinden biridir (Paluch ve ark, 2020). Reseptörlere bağlanan inhibitörler, aktif bölgelerin blokajına, reseptörlerin yapısal dengesizleşmesine, reseptörlerin dimerasyon ya da oligomerizasyonlarının bozulması sonucu DNA'ya bağlanamamasıyla spesifik gen ekspresyonunun bozulmasına veya RNA polimeraz ile ilişkinin bozulması gibi çeşitli mekanizmalarla sinyalleşme kaskadını doğrudan etkilemektedir (Stevens ve diğerleri, 2010; Paczkowski ve diğ. , 2017; Suneby ve ark., 2017; Martinez ve ark., 2019).

SBDD farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Son yıllarda, yeni QSI'lerin araştırılmasında da SBDD tekniklerinden yararlanılmıştır. Anti-QS aktivitesi gösteren doğal bileşiklerin araştırılması patogenezin önlenmesinde önemlidir. Doğal QSI'ler liken, bakteri, alg, hayvan, bitki veya mantar gibi çeşitli organizmalar tarafından üretilmekte ve QSI etkileri literatürde bilinmektedir. Likenlerin de bir çok özgün sekonder metabolit içerdiği bilinmektedir. Bu sebeple 637 adet liken

sekonder metaboliti içeren kütüphaneden Metacore/MetaDrug toksisite ve terapötik aktivite (deri hassasiyeti ve bakteriyel etki) tahminlerinden başarılı çıkan moleküller belirlenmiştir (ön çalışma). Bu moleküllerin LasI ve LasR reseptörleri üzerindeki (ana QS sistemi olduğundan) bağlanma enerjilerini belirlemek için moleküler kenetlenme simülasyonları yapılmıştır (ön çalışma). Hit moleküllerden biri ve tedarik edilebilir bir molekül olduğu için antrakınon grubuna ait *Chrysophanol* detaylı *in siliko* hesaplamalar ve *in vitro* deneylerde kullanılmak üzere bu çalışma için seçilmiştir. Doğal bileşik *penicillic acid* molekülünün, *P. aeruginosa*'da aşağı regüle edilen QS regüle edilmiş genleri % 60 oranında azalttığı ve bu da QS regüle edilmiş gen ekspresyonu için özgüllük olduğunu düşündürmektedir (Rasmussen ve ark., 2005). *Penicillic acid* molekülünün monitör suşların *gfp* üretimini büyük ölçüde inhibe edebildiği bilgisi literatürde bulunmaktadır. Rasmussen ve arkadaşları 2005 yılında *Penicillium* cinsine ait türlerden 41 elde ettikleri *penicillic acid* ile yaptıkları çalışmada *lasB-gfp* suşunu kullanarak 80 µM konsantrasyonda QS mekanizmasını neredeyse tamamen inhibe ettiklerini belirtmişlerdir. Gökalsın (2015), *P. aeruginosa* üzerine QS inhibisyon etkisi bilinen *penicillic acid*'in 96 µM dozundaki QSI özelliğini *lasB-gfp* ve *rhlA-gfp* floresan suşları ile incelemiştir. 96 µM konsantrasyonunda her iki suшта neredeyse tamamen inhibisyon gözlenmiştir. Bu nedenle *in vitro* QSI etkinliği bilinen *penicillic acid* *in siliko* hesaplamalarda pozitif kontrol olarak test edilmiştir.

Bakteri genlerinin QS regülasyonu; sinyal molekülleri, sinyal-sentazlar (I protein) ve sinyal-reseptör proteinleri (R proteinleri) ile sağlanır (McDougald ve ark. 2007). Bu tez çalışmasında *Chrysophanol* molekülünün, *in vitro* biyomontör suşlar kullanılarak ilgili QS genlerinin GFP ışımaya bağlı olarak kantitatif analizleri ve QS sinyal yolağında bulunan önemli hedef reseptör proteinler (LasI, LasR, PqsR ve RhlR) kullanılarak potansiyel QS inhibitörü olma özelliği ileri *in siliko* yöntemlerle araştırılmıştır.

3.2.1. LasI/R sistemine *Chrysophanol* Molekülünün *in siliko* ve *in vitro* Etkisi

LasI/R sistemi *P. aeruginosa* QS sistemleri arasındaki hiyerarşinin başında yer almaktadır. *P. aeruginosa*'nın LasI sentazı (I protein), LuxR'ye homolog olan transkripsiyonel bir regülatör (R proteini) olan LasR'ı aktive eden sinyal 3-oxo-C12-HSL (N-3-oksododekanoil-L-homoserin lakton) üretmektedir. 3-oxo-C12-HSL ile aktive edilmesi, LasR'nin dimerizasyonu ile sonuçlanır. Bu durum da elastaz ve proteaz virülans faktörlerinin ve biyofilm oluşumundan sorumlu bir çok genin transkribe edilmesine sebep olmaktadır.

N-açıl homoserin laktonlar (AHL'ler), kompleks dimerini oluşturmak ve daha sonra belirli DNA bölgesinin transkripsiyonunu başlatmak için anahtar reseptör olan LasR ile bağlanacak olan *P. aeruginosa*'nın QS oto indüktörü-1 (AI-1) dür. HSL üreten enzim LasI, belirli koşullar altında biyofilm oluşumunu ve çok sayıda virülansla ilişkili genin ve virülansla ilişkili metabolitlerin ekspresyonunu etkiler. LasI/R sistemi *P. aeruginosa*'nın virülans gen düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca açıl homoserin lakton sentaz (LasI) elastazın modüle edilmesinde görevlidir. 3-oxo-C12-açıl taşıyıcı protein (acyl-ACP) ve S-adenozil-L-metiyoninin (SAM) substratı olan 3-oxo-C12-AHL'yi üretir. LasR ise, LasI'nın sentezlediği 3-oxo-C12-HSL'yi algılayarak çeşitli genlerin ekspresyonuna izin verir (Lidor ve ark., 2015). 3-oxo-C12-HSL'nin bağlanma bölgesi V şeklindeki hidrofobik bir boşluğa giristen oluşur. LasI numaralandırmasında ARG30, ASP44, ASP47, ARG70, GLU101, SER103 VE ARG104 AHL sentezi için gerekli olan aminoasit rezidüleridir. Bilinen tüm LuxI benzeri AHL sentazlarında serin veya treonin olarak korunan Ser103 (LasI), bu kümenin (V yarığı) merkezinde yer alır ve doğrudan ARG70 ve GLU101'e bağlı bir köprü su molekülü ile etkileşime girer. Bu küme, N-terminal heliksleri ile yapının ön yüzeyi arasındaki etkileşimlerin stabilitesine katkıda bulunmakla birlikte katalitik bir fonksiyon gerçekleştirebildiği de düşünülmektedir.

Tez çalışmamızdaki sonuçlara göre, LasI- 3-oxo-C12-HSL kompleksinde moleküler kenetlenme simülasyonunda (-2. 39 kcal/mol) ARG30 ve ILE107 H bağı kurmuş ve uzun MD simülasyonunda ILE107 ile olan etkileşimini korumuştur.

Kompleksin RMSD (Prot-RMSD) değerleri apo formuna göre stabil kalmıştır. Ligandın protein içinde (LigfitProt) ve kendi konformasyonu (LigfitLig) izlendiğinde konumsal olarak yer değiştirmediği görülmüştür. Moleküler kenetlenme simülasyonunda -3.51 kcal/mol skor veren 1RO5-*penicillic acid* kompleksinin ARG30 (tuz köprüsü), ILE107 (H bağı) kurduğu ve simülasyon boyunca bu etkileşimleri koruduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bağlanma bölgesinde bulunan PHE105 ve VAL148 ile hidrofobik etkileşim kurmuştur. MD simülasyonlarının analizi sonucunda 160ns den sonra kompleksin apo forma göre konumsal olarak 2Å kadar sapma gösterdiği (Prot-RMSD), ligandın 160-180ns zaman dilimi arasında bağlanma paketinden uzaklaştığı (yaklaşık 7Å kadar) sonrasında eski konumuna geri döndüğü (LigFitProt) söylenebilir. Moleküler kenetlenme simülasyonunda -5.85 kcal/mol skor veren *chrysophanol*-1RO5 kompleksinde aktif bağlanma bölgesinde bulunan ARG30 ve PHE105 aminoasitleriyle H bağı kurmuştur. Ayrıca ARG30 AHL sentezi için gerekli olan aminoasitlerden biridir. Dockingden alınan yapı ile 250 nanosaniye MD simülasyonu sonucunda simülasyonun % 80 süresince TRP33 ile hidrofobik etkileşimler kumuştur. Ayrıca ARG30, TRP33 ile bağlantı kurması SAM bağlanma bölgesinde bulunduğunu göstermiştir. Moleküler dinamik simülasyonlarından elde edilen RMSD ve RMSF grafiklerine bakıldığında ise, kompleks yapı olarak apo formuna göre daha stabil olduğunu (Prot-RMSD), protein içindeki konumuna (LigFitProt) bakıldığında ise simülasyonun başlangıcında (yaklaşık 10ns) 10Å kadar sapma gösterdiğini fakat çok geçmeden 2-3 Å dolaylarına ulaşarak protein bağlanma bölgesinde kaldığı görülmüştür. Ligandın simülasyon boyunca translasyonel değişime (LigFitLig) uğramadan stabil kaldığı (yaklaşık 1 Å) görülmüştür. Tez alışmamızda, *chrysophanol*'n LasI'nın kendi endojen ligandı olan 3-oxo-C12-HSLye göre kenetlenme afinitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sinyal molekülünden farklı olarak LasI'nın katalitik mekanizmasında önemli olan TRP33 ve PHE105 aminoasitleriyle etkileşim kurmuştur. MD simülasyonu incelendiğinde ise ligandın kendi içindeki rotasyon hareketlerinin incelendiği LigFitLig analizinde ise daha stabil olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol olarak belirlediğimiz *penicillic acid* ise kenetlenme skoru göz önüne alındığında reseptör ile *chrysophanol* kadar etkili etkileşim kuramamıştır. Ayrıca simülasyon süresince *penicillic acid*'in bağlanma paketinde kalmaması dikkat çekmiştir. Simüle edilen tüm LasI-ligand komplekslerinin MM/GBSA

serbest enerji hesapları incelendiğinde *penicillic acid* molekülünün gerek kenetlenme skoru bakımından gerekse MD simülasyonlarında proteinin bağlanma paketinde kalmamış olması MM/GBSA serbest enerjisinin (-26.03 kcal/mol) düşük olması ile korelasyon göstermiştir. *Chrysophanol*'ün (-60.71 kcal/mol) serbest bağlanma enerjisinin endojen sinyal molekülü olan 3O-C12-HSL'ye (-63.8 kcal/mol) yakın bir değerde olduğu görülmüştür. Bu sebeple *chrysophanol* LasI reseptörüne *penicillic acid* molekülünden daha etkili bir şekilde bağlandığı söylenebilir. Kenetlenme skoru ve MD analizlerinde kurduğu aminoasit etkileşimleri bakımından SAM bağlanma paketinde kaldığı görülmüştür.

Lidor ve ark. (2015), TZD, TZD-C8 ve TZD-C10 moleküllerinin LasI için sentetik bir inhibitör olma özelliğini araştırdıkları çalışmada moleküler kenetlenme sonucuna göre LasI'ya bağlanma afinitelerini sırasıyla -4.2, -8.1 ve -6.2 kcal/mol (Autodock Vina) olarak hesaplamışlardır. TZD (trans-cinnemaldehide) ARG30 ile H bağı kurmaktadır. Ayrıca TZD-C8'in ARG30 ile ILE107 aminoasitleri ile H bağı kurduğunu göstermişlerdir. Lidor ve arkadaşlarının çalışması ile *chrysophanol*'ün kenetlenme enerjisi ve kurduğu a.a etkileşimleri karşılaştırıldığında TZD molekülünden daha etkili olduğu; TZD-C8 ve TZD-C10 türevlerinin ise kenetlenme skorunun *chrysophanol*e göre daha düşük (etkili) olduğu söylenebilir. Fakat karşılaştırılan çalışmada moleküler dinamik simülasyon verisi bulunmaması sebebiyle reseptör-ligand dinamikleri bakımından bir karşılaştırma yapılamamıştır.

LasR reseptörüne ait bağlanma enerjisi (-8.39 kcal/mol) belirlenen endojen ligandın (3OC12-HSL) kristal makalesinde belirtilen önemli etkileşimlerin çoğunu (TYR56, TRP60, ASP73 ve SER129 ile H bağı) gerçekleştirdiği görülmüştür. MD simülasyonunda ise TRP60, ASP73 ve SER129 ile kurduğu H bağını koruduğu gözlemlenmiştir. *Penicillic acid*'in LasR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonunda (-2.88 kcal/mol) TRP60 ile hidrojen bağı ve ARG61 ile tuz köprüsü kurmaktadır. Uzun MD simülasyonunda bu etkileşimleri koruduğu görülmüştür. Ayrıca protein-ligand histogramında ASP73 ile simülasyonun genelinde iyonik etkileşimler, TYR64 ve TRP88 ile hidrofobik etkileşimler kurmuştur. *Chrysophanol*-LasR kompleksi moleküler kenetlenme simülasyonunda (-6.83 kcal/mol) THR75 aminoasiti ile hidrojen

bağı kurmaktadır. Uzun MD simülasyonunda ve protein-ligand histogramı analizlerinde *Chrysophanol*ün TYR47, ARG61 ve SER129 ile H bağı kurduğu ve THR75 ile olan etkileşimini de koruduğu görülmüştür. MD analizlerinde LigFitProt analizinde RMSD bazında yaklaşık 10Å kadar sapma görülmüştür. MD trajektörüsü izlendiğinde protein içindeki başlangıç konumundan uzaklaşmadığını (Şekil 26) fakat simülasyonun başından ortasından ve sonundan alınan yapılar backbone atomlarına göre hizalandığında ligandın konformasyonunda büyük değişiklik olduğu görülmüştür. Enerjetik açıdan yorumlamak amacıyla ilk 125ns süresine de MM/GBSA analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları birbirine yakın skorlar vermiştir. Bu durum karşısında yüksek RMSD değerleri enerjetik açıdan fark yaratmıyor şeklinde yorum yapılabilir.

Kim ve ark., (2008) furanon türevlerinin *P. aeruginosa* las sistemi üzerinde antagonistik özelliklerini inceledikleri çalışmada, kenetlenme skoru ile LasR inhibisyon derecesi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu fakat gerçek inhibisyonun reseptör-ligand kompleksinin nihai konformasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Ligand ile reseptörün konformasyonu LasR-AHL'ye (endojen ligand) benzer olması ligandın bir inhibitör değil aktivatör olarak işlev görmesine sebep olmaktadır. Bu sebeple bir ligandın inhibitör görevini göstermesi için protein-ligand kompleksinin konformasyonunun başlangıç konformasyona göre “geçersiz form” a değişmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise LasR de potansiyel antagonistlerin seçilmesi için TYR47, TYR56, TRP60, TYR64, ASP73, TRP88 rezidülerinin önemli olduğunu belirtmişlerdir. TYR56 LuxR tipi reseptörlerde korunmuş bir rezidüdüdür. TYR56 ve SER129 ile etkileşimler protein-ligand kompleksinin stabilitesini sağlamaktadır. Korunmuş rezidülerin antagonist aktiviteden sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Ahumedo ve ark., 2010; Ahumedo ve ark., 2014; Capilato ve ark., 2016). Ayrıca, O'Brien ve ark., (2015) CYS79 ile kovalent etkileşimin, LasR antagonizmine sebep olduğunu bildirmektedir.

Penicillic acid'in kenetlenme ve MD sonrasında Ahumedo ve ark., (2010,2014) ile Capilato ve arkadaşlarının (2016)'nin LasR antagonizmi için bahsettikleri aminoasit etkileşimlerinden TRP60, TYR64, ASP73, TRP88'i göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında, *chrysophanol* molekülünün ise bahsi geçen TYR47, ve SER129 rezidüleri ile etkileşim kurduğunu görülmüştür. Endojen ligandın ise beklenen tüm etkileşimlere sahip olduğu

görülmüştür. MM/GBSA analizlerinde endojen ligand olan 3OC12-HSL (-86.47 kcal/mol) beklenildiği üzere literatürde belirtilen etkileşimleri kurmakta ve proteinin aktif bölgesindeki konumunu korumaktadır. *Chrysophanol*'ün serbest bağlanma enerjisi *penicillic acid* den daha etkili olarak görülmüştür.

Lidor ve ark, (2015), TZD, TZD-C8 ve TZD-C10 moleküllerinin LasR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonları sonucunda bağlanma enerjilerini sırası ile -4.3 kcal/mol, -7.0 kcal/mol ve -5.0 kcal/mol olarak hesaplamışlardır. *Chrysophanol* LasR reseptörüne TZD ve TZD-C10 dan daha etkili bir skor ile bağlanmış, TZD-C8 ile de benzer skorlar vermiştir. Tan ve ark., (2013), yeni QSI adaylarının keşfi için yapı temelli bir sanal tarama (SB-VS) ile 3.040 doğal bileşiğin üç boyutlu yapılarını ve bunların türevleri elde etmiş ve LasR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonunu yapmıştır (The Molegro Virtual Docker (MVD)). Eleme için minmal Rerank skorunu -60 olarak belirleyerek, 22 moleküle kadar inmişlerdir. *In vitro* QS deneylerinde 5 doza bağlı bir şekilde *P. aeruginosa*'da QS ile düzenlenen gen ekspresyonunu inhibe edebildiği bulunmuştur. İçlerinden en başarılı olan, 1.56 μ M G1 (2-amino-3- (3-florofenil) propanoik asit (F1), 5-imino-4,6-dihidro-3H-1,2,3-triazolo [5,4-d] pirimidin-7-on)'in *lasB-gfp* suşunu %49.1 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir. Ek olarak, moleküler kenetlenme simülasyonunda G1; TRP 60, THR 75, TYR 93 aminoasitleri ile H bağı kurmuştur. *In vitro* olarak *Chrysophanol*'ün *lasB-gfp* suşu üzerinde anti-QS etkisinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Her iki molekülün de moleküler kenetlenme simülasyonlarında THR75 aminoasitiyle H bağı kurduğu belirlenmiştir.

Rajkumari ve ark., (2019), doğal bir bileşik olan 5-hydroxymethylfurfural'ın (5-HMF) LasR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonlarında -5.7 kcal/mol bağlanma afinitesi göstermiştir. 5-HMF- LasR kompleksinde SER129 ile H bağı kurmuştur. kompleks yapının 20 nslik MD simülasyonu sonucunda iki sisteminde RMSD bazında dengeye geldiği görülmüştür. LasR-HMF kompleksinin serbest bağlanma enerjisi (MM-PBSA) -70.2 kJ / mol'dür. *Chrysophanol* moleküler kenetlenme skoru bakımından LasR'ye yüksek afinite ile bağlanmıştır. Tez çalışmamızda Rajkumari ve ark.'dan daha uzun MD simülasyonu yapılmıştır. MD sonrası serbest enerji hesaplarında bu çalışmada MM/GBSA protokolü kullanılmıştır fakat 5-HMF'nin MM/PBSA skorunun

kcal/mol cinsiden ifadesi (-16.8 kcal/mol) ile karşılaştırıldığında *Chrysophanol*'ün(-47.97 kcal/mol), 5-HMF'ye göre daha düşük bir enerjiyle LasR reseptörüne daha etkili bağlandığı yorumu yapılabilir.

Chatterjee ve ark., (2017) phenyllactic acid (PLA) molekülünü LasR ile moleküler kenetlenme simülasyonunda (Glide/XP) sonucunda kenetlenme skoru -6.91 kcal/mol olarak bulmuşlardır. LasR-PLA arasında THR75, SER129, TYR64 aminoasitleri arasında H bağı ve PHE101 ile pi-pi bağı bulunmaktadır. Bir başka çalışmada Glide/XP modülü kullanılarak gerçekleştirilen kenetlenme simülasyonunda zingerone; LasR, reseptörlerinin aktif bölgesindeki SER129, TYR93 ve TYR56 ile H bağı kurarak -7.6 kcal/mol bağlanma afinitesi göstermektedir (Kumar ve ark., 2015). Moleküler kenetlenme skorları ve reseptör ile kurduğu etkileşimler karşılaştırıldığında PLA ve zingerone moleküllerinin *Chrysophanol* molekülünden daha etkili bir şekilde LasR'ye bağlandığı gözlemlenmiştir.

Rajkumari ve ark, (2018a,b) *in silico* hesaplamalarda *baicalein* (BCL), LasR reseptörüne -9.29 kcal/mol kenetlenme skoru vererek; TRP60, THR75, THR115 ve SER129 aminoasitleri ile H bağı kurmuştur. *Cinnamic acid* (CA) 'in LasR'ye bağlanma afinitesi -7.3kcal/mol olarak bulunmuştur. Her bir komplekse 20 ns kısa MD simülasyon gerçekleştirmişlerdir. CA-LasR ve BCL-LasR vsistemleri ufak dalgalanmalardan sonra dengeye gelmiştir. MM/PBSA serbest bağlanma enerjileri LasR-CA -97.5kJ/mol (-23.28kcal/mol), LasR-BCL -154.9 kJ/mol (-36.99kcal/mol) 'dür. Baicaleinin kontrol olarak kullanılması sebebiyle bu tez çalışmasındaki sonuçlarla kıyaslamak amacıyla LasR-BCL komplekslerine ait *in silico* hesaplamalar gerçekleştirilmiştir LasR-BCL kompleksi ise -6,27 kcal/mol kenetlenme skoru vermiş, MD simülasyonunda TYR47 ile pi-pi etkileşimi ve THR80 ile H bağı kurmuş ve -45,30 kcal/mol serbest bağlanma enerjisi vermiştir. 250nanosaniyelik simülasyonlarda her iki ligandın protein içinde çok stabil kalmadığı trajektörisi izlendiğinde konumlarının değiştiği gözlemlenmiştir.

Musthafa ve ark., (2012) çalışmasında LasR ile moleküler kenetlenme simülasyonunda 3-oxo-C12-HSL ve 2,5-Piperazinedion'un GLU145 ile etkileşimde bulunmasının sonucu olarak bu bileşiğin bakteriyel QS için bir antagonist olabileceğini bildirmişlerdir

Bu tez çalışmasında *chrysophanol*'ün las sistemi üzerindeki anti-QS aktivitesi *lasB-gfp* monitör suşu kullanılarak belirlenmiştir. Las sistemini inhibe etme potansiyeli 135.8 μ M, 67,9 μ M ve 33,9 μ M dozlarda sırası ile % 52.60, % 34.21 ve % 16.51 olarak belirlenmiştir. En başarılı inhibisyon ilk dozda görülmüştür. Her üç dozda da bakteri popülasyonunda bir azalma dolayısıyla ölüm görülmemiştir.

Elastaz *lasB* geni tarafından kodlanan, tip II sekresyon sistemini kullanarak salgılanan bir metaloproteinazdır. İzolatların >% 75'inde salgılanan önemli virülans faktörlerden biridir (Oıldak ve Trafny, 2005). *lasB* nin mutasyonu *P.aeruginosa*'nın virulansını azalttığı bilinmektedir (García-Reyes ve ark., 2020). Ayrıca *lasB* ekspresyonunun Las, Rhl ve Pqs sistemleri tarafından düzenlendiği de bildirilmektedir (Pesci ve ark., 1997; Brint, J. M., & Ohman, D. E, 1995; Calfee ve ark., 2001). Çalışmamızda *Chrysophanol* 135.8 μ M dozda, uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre elastaz üretimini %88.3 oranında inhibe etmiştir. Wang ve ark., (2020) cladodionen molekülünün 400 μ M dozda %35.7 oranında inhibe ettiğini bildirmektedir. Bir başka çalışmada ise naringenin molekülünün (0.5mg/ml), elastaz üretimini yaklaşık %61 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Bajpai ve ark., 2020). Patulin ve emodin moleküllerinin 50 uM dozda elastaz üretimini engelleme kapasitesi % 62 olarak bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2017). *Chrysohanol*'ün çok daha düşük bir dozda *P. aeruginosa* elastaz aktivitesini inhibe etmede daha başarılı olduğu gözükmemektedir. Bir başka çalışmada G1'in *P. aeruginosa* PAO1 elastaz aktivitesini 50 μ M ve 100 μ M'de neredeyse tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir (Tan ve ark., 2013). Rajkumari ve ark., (2019), ise 1,25 μ L / mL konsantrasyonda 5-HMF'nin elastaz üretimini %36.48 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, Rajkumari ve ark. (2018), *cinnamic acid* ve *baicalein* moleküllerinin 250 μ g/ml konsantrasyonda elastaz aktivitesinde ise sırasıyla %21.81 ve %37.58 oranında inhibisyon belirlemişlerdir. 2,5-Piperazinedion'un elastolitik aktiviteyi engellemede %48'lik bir inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Musthafa ve ark., 2012).

P. aeruginosa las sistemi tarafından hücre dışına salgılanan bir başka önemli virülans faktör ise proteazdır. Adhezyon ve hücre dışı proteinlerinin proteazlar tarafından bozunması, biyofilm yapısının bozulmasına sebep olduğu bilinmektedir (Yu, M. ve Chua,

S.L., 2019). Bu çalışmada ise *chrysophanol*’ün proteaz üretimini inhibe etme potansiyeli 135.8 μ M dozda % 52.3 olarak belirlenmiştir. Bajpai ve ark., (2020) naringenin (0.5 mg/ml) molekülünün proteaz üretimini % 79 oranında inhibe ettiğini bildirmiştir. Zhou ve ark, (2017)’nın çalışmasına göre 50 μ M dozda uygulanan emodin ve patulin moleküllerinin proteaz aktivesini % 23 ve % 31 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Rajkumari ve ark., (2019), 1,25 μ L / mL konsantrasyonda 5-HMF’nin proteaz üretimini %84.49 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Rajkumari ve ark, (2018a,b), cinnamic acid ve *baicalein* moleküllerinin 250 μ g/ml konsantrasyonda toplam proteaz üretiminde sırası ile %71.38 ve %77.09 oranında inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Literatür ile karşılaştırıldığında *chrysophanol*, emodin ve patuli moleküllerine göre daha etkili bulunmuştur.

Chrysophanol’ün *in siliko* çalışmalarda kurduğu etkileşimler ve *in vitro* biyomonitör *lasB-gfp* suşundaki yüksek inhibisyonu ve ayrıca elastaz üretimini engelleme potansiyelindeki başarısının 2,5-Piperazinedion’dan daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sebeple *chrysophanol* hem las sisteminde QSI bir molekül hem de elastaz için etkili bir antivirülans bileşik olabileceği düşünülmektedir.

3.2.2. RhlR sistemine *Chrysophanol* Molekülünün *in siliko* ve *in vitro* Etkisi

Rhl sistemi, N-butilil homoserin laktonunun sentezini yönlendirdiği bilinen bir transkripsiyon aktivatörü RhlR ve RhlI’den oluşur. RhlI, C4-HSL’yi üretmekte ve sinyal sentezi belirli bir eşik değerine ulaşınca RhlR reseptörünü aktive etmektedir. Böylece rhl sistemine bağlı genler eksprese olmaktadır. Bu sebeple, tez çalışmamızda RhlR sistemi hedef alınmıştır. RhlR- C4-HSL kompleksinde TRP114 ile H bağı kurulduğu görülmüştür (kenetlenme skoru: -3.74 kcal/mol). MD simülasyonunda ise LEU161 H bağı kurmuştur. Ligandın protein içinden 10. Ns den sonra çıktığı (LigFitProt) görülmüştür. RhlR-*penicillic acid* kompleksinde (kenetlenme skoru: -2.41 kcal/mol) ARG138 ile H bağı ve tuz köprüsü kurmaktadır. MD simülasyonunda ise ARG138 ile etkileşim kurmaya devam etmiştir. MD analizlerinde *penicillic acid*in 50. Nanosaniyeden sonra bulunduğu bölgeden ayrıldığı 110.ns den sonra tekrar eski konumuna ulaşsa da tekrar proteinden

ayrılarak 40Å dolaylarında bulunduğu görülmüştür. RhlR-*Chrysophanol* kompleksinde ALA67, ARG71 ve TRP114 ile H bağı (kenetlenme skoru: -4.423 kcal/mol) kurmuştur. MD simülasyonundan alınan yapıda ise TYR234 ile pi-pi etkileşimi kurduğu görülmüştür. Protein-ligand histogramında simülasyonun geneli çerçevesinde LEU230, ALA233, ALA237, TRP114 ile hidrofobik etkileşim kurmuştur. LigFitProt grafiğinde ligandın 210. Nanosaniyeden sonra bağlanma paketinden ayrılarak konumsal uzaklığının 40 Å'a kadar olduğu görülmüştür.

MM/GBSA serbest enerji hesaplamaları sonucunda *penicillic acid* molekülünün (N/A) skoru, moleküler kenetlenme skoru ve MD analizlerinde bağlanma paketinden çıkması durumları göz önüne alınarak değerlendirildiğinde enerjinin bu değerde olmasıyla açıklanabilir. *Chrysophanol* (-27.28 kcal/mol) ile C4-HSL (-34.89 kcal/mol) karşılaştırıldığında ikisinin de bağlanma paketinden çıkmasıyla bu durumun MM/GBSA skoru ile korelasyon gösterdiği görülmüştür. *Chrysophanol*'ün RhlR reseptörü üzerinde agonist veya antagonist moleküllerin gösterdiği etkiyi gösterememiştir.

Rajkumari ve ark. (2018a,b)'ya göre BCL'nin RhlR'de kenetlenme skoru - 8.4 kcal/mol olarak bulunmuştur. CA, - 6.1 kcal / mol'lük bir bağlanma afinitesi sergilemiş ve TYR64 ve TYR72 ile hidrofobik etkileşim oluşturmuştur. Her bir komplekse 20 ns kısa MD simülasyon gerçekleştirmişlerdir ve CA-RhlR ve BCL-RhlR sistemleri ufak dalgalanmalardan sonra dengeye gelmiştir. RhlR-CA -96.6 kJ/mol (-23.07 kJ/mol) ve RhlR-BCL -173.1 kJ/mol (-41.34 kcal/mol)'dür. *Baicalein*'in kontrol olarak kullanılması sebebiyle bu tez çalışmasındaki sonuçlarla kıyaslamak amacıyla RhlR-BCL komplekslerine ait *in siliko* hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. RhlR-BCL kompleksi - 3.518 kcal/mol kenetlenme skoru vermiş, MD simülasyonunda ASP23 ile H bağı kurmuş ve -51,79 kcal/mol MM/GBSA serbest enerji skoru vermiştir. 250 nanosaniyelik simülasyonlarda her iki ligandın protein içinde çok stabil kalmadığı trajektörisi izlendiğinde konumlarının değiştiği gözlemlenmiştir

Rajkumari ve ark., (2019) 5-HMF'nin RhlR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonlarında sırasıyla -4.7 kcal/mol oranında bağlanma afinitesi göstermiştir. Kompleks yapının 20 nanosaniyelik MD simülasyonu sonucunda sistemin RMSD bazında dengeye geldiği görülmüştür. RhlR-HMF kompleksinin bağlanma serbest

enerjisi -58.3 kJ / mol (MM-PBSA) dır. *Chrysophanol* ve 5-HMF birbirlerine yakın kenetlenme enerjisi vermiştir. 5-HMF molekülüne RhlR sisteminde 20 ns (kısa) MD simülasyon analizi yapılmıştır, *Chrysophanol* de 20 nanosaniye süresince proteinin bağlanma paketinde kalmış kafat 210. Nanosaniyeden sonra bağlanma paketinden konumsal olarak uzaklaşmıştır.

Chatterjee ve ark., (2017) phenyllactic acid (PLA) molekülünü, RhlR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonu (Glide/XP) sonucunda kenetlenme skoru -7.42 kcal/mol'dür. RhlR aktif bölgesi için bağlanma bölgesini TYR64, TRP68, TYR72, ASP81, TRP96, ve ALA111 nolu aminoasitlerden oluşturmuşlar ve RhlR-PLA kompleksinin CYS117 ile H bağı ve TRP96 ile pi-pi etkileşimi kurdığını bildirmişlerdir. Glide/XP modülü kullanılarak gerçekleştirilen kenetlenme simülasyonunda zingerone; RhlR reseptörlerinin aktif bölgesindeki GLY73 ile H bağı (RhlR) kurarak -4.2 kcal/mol bağlanma afinitesi göstermiştir (Kumar ve ark., 2015). *Chrysophanol* zingerone molekülü ile benzer kenetlenme afinitesi göstermekte olup zingerone 'dan farklı olarak ALA67, ARG71 ve TRP114 aminoasitleriyle H bağı kurmuştur. Moleküler kenetlenme simülasyonlarında PLA molekülü enerjetik olarak RhlR reseptörüne *Chrysophanol*'den daha etkili bağlanmıştır. Fakat PLA ve zingerone moleküllerinin ileri in siliko analizleri hakkında veri bulunmadığı için protein-ligand etkileşimlerinin atomistik düzeyde nicel ve nitel karşılaştırılması yapılamamıştır.

Bu tez çalışmasında potansiyeli 135.8 µM, 67,9 µM ve 33,9 µM konsantrasyonlardaki *Chrysophanol*ün rhl sistemi üzerindeki *in vitro* anti-QS aktivitesi *rhlA-gfp* biyomonitör suşu kullanılarak belirlenmiştir. Her üç dozda da antimikrobiyal etki görülmemiştir. Rhl sistemini inhibe etme potansiyeli 135.8 µM'lık dozda % 20.1 olarak belirlenmiştir. Diğer iki dozda belirgin bir inhibisyon görülmemiştir.

Tan ve ark., 2013, 1.56 µM dozdaki 5-imino-4,6-dihidro-3H-1,2,3-triazolo [5,4-d] pirimidin-7-on (G1) G1'in , *rhlA-gfp* suşunu %46.5 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. *Chrysophanol* molekülünün rhl sistemi üzerindeki anti-QS aktivitesi G1 molekülünden daha başarısız olarak belirlenmiştir.

Mukherjee ve ark. (2017) RhlR'nin gen ekspresyonunun hem C4-HSL'ye bağlı hem de C4-HSL'den bağımsız bir şekilde kontrol ettiğini belirtmişlerdir. RhlR tarafından

C4-HSL'den bağımsız regülasyonu biyofilmlerle önemli ölçüde ilgili olduğunu söylemişlerdir. RhlR'nin RhlI yokluğunda çalışabileceği bir mekanizma, RhlR'nin bağılı ligand olmadan hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edebileceğini, bu yeteneğe sahip LuxR tipi regülatörler mevcut olduğunu bildirmişlerdir. RhlR'nin bir ligand yokluğunda işlev görmesi olasılığı haricinde RhlR hakkında bilinenlerle daha tutarlı olan bir başka olasılığın ise RhlR'nin bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmesini sağlayan alternatif bir ligandın var olabileceğini düşünmüşlerdir. Bu bilgiler göz önünde alındığında *Chrysophanol*'ün RhlR reseptörü ile moleküler kenetlenme skorunun başarısız olması ve MD analizleri sonucunda bağlanma paketinde kalmaması; bunu tasdikleyen *rhlA-gfp* suşunda da etkin bir inhibisyon gösterememesi fakat biyofilm oluşumunu engellemede başarı sağlaması C4-HSL'den bağımsız bir mekanizma kullanmasıyla açıklanabilir.

3.2.3. PqsR Sistemine *Chrysophanol* Molekülünün *in siliko* ve *in vitro* Etkisi

PqsR inhibitörlerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda biyofilm oluşumunu ve piyosiyanın üretimini inhibe ettiği bilinmektedir (Hossain ve ark., 2020). Lu ve ark., (2012) çalışmalarında PqsR reseptörü ile sıkı bağlanmanın güçlü antagonistik etkilere sebep olduğunu göstermektedir. Bu etkileşim piyosiyanın üretimini azaltmakta fakat PQS'in elastaz veya ramnolipit gibi virülans faktörlerin aktivitesine herhangi bir etkisinin gözlemlenmediğini bildirmektedirler. *In vivo* yaptıkları çalışmada, bileşik 19'un 3 mM konsantrasyonda piyosiyanın üretimini *P. aeruginosa* PA14'te % 74 oranında azalttığı bildirilmiştir

NNQ, PqsR reseptörünün bilinen agonistidir ve kompleks halinde kristal yapısı bulunmaktadır (PDB No: 4JVD). Tez çalışmamızda, 4JVI-NNQ kompleksinde NNQ moleküler kenetlenme simülasyonunda (-4.488 kcal/mol) herhangi bir aminoasit ile etkileşim kurmamıştır. Protein-ligand histogramında simülasyonun genelindeki etkileşimler içinde ILE149 ve ALA168 nolu aminoasitlerle hidrofobik etkileşim kurmuştur. MD analizlerinde protein içindeki bağlanma paketinde kaldığı görülmüştür. QZN, PqsR reseptörü için bilinen bir antagonist moleküldür. Moleküler kenetlenme

simülasyonunda 4JVI-QZN kompleksi (-7.06 kcal/mol), LEU207 ile H bağı kurmuştur. MD simülasyonunda da bu etkileşimi koruyarak LEU197 ve LEU236 ile de H bağı kurmuştur. Prot-RMSD grafiğine bakıldığında son 50 nanosaniyeden itibaren 2Å konumsal sapma göstermiştir. QZN'nin PqsR içinde stabil kaldığı fakat kendi konformasyonunun dalgalı yapıda olduğu görülmüştür. Fakat bu durumun molekülün kimyasal yapısından ileri geldiği söylenebilir. Moleküler kenetlenme simülasyonunda, 4JVI-*penicillic acid* kompleksi (-4.794 kcal/mol) GLN194, LEU197 ve ILE236 numaraları aminoasit rezidüleri ile H bağı kurmuştur. MD simülasyonundan alınan en düşük enerjili yapıda ise bu etkileşimleri koruyamamıştır. Protein-ligand histogramına bakıldığında, çoğunlukla ARG209 ile H bağı kurmuştur. C α atomuna göre protein-RMSD verilerine bakıldığında stabil bir durum izlemesine rağmen LigFitProt grafiğinde simülasyonun başından itibaren proteinden ayrıldığı ve 60Å kadar konumsal sapma gösterdiği görülmüştür. Trajektöri verisi izlendiğinde bağlanma paketinden ayrıldığı görülmüştür. Moleküler kenetlenme simülasyonundan alınan 4JVI-*Chrysophanol* kompleksinde (-6.631 kcal/mol) ligand, LEU207 ile H bağı kurmuştur. Moleküler dinamik simülasyonunda da bu etkileşimi koruduğu görülmüştür. Ayrıca ILE149, LEU208, ILE236 ile önemli hidrofobik etkileşimleri kurmuştur. LEU197 ile simülasyonun %50 boyunca H bağı kurmuştur. MD simülasyonu analizlerinde *Chrysophanol* ile olan kompleksin proteinin apo formuna göre RMSD bazında yaklaşık 2Å kadar stabil olduğu görülmüştür. LigFitProt ve LigFitLig analizlerinde ise *Chrysophanol*ün bağlanma paketi içinde kaldığı ve kendi içinde translasyonel/konformasyonel değişikliğe uğramadığı görülmüştür.

MM/GBSA hesaplarına göre *Penicillic acid*'in (N/A) serbest bağlanma skoru diğer ligandlar ve *Chrysophanol*'den daha etkisiz gözükmetedir. Bunun sebebi *Penicillic acid*'in bağlanma paketinden çıkması gösterilebilir. *Chrysophanol* (-63.07 kcal/mol) ise diğer antagonist olan QZN (-62.33 kcal/mol) ile benzer skorlarda bulunmuştur. Gerek kenetlenme skoru ve etkileşimleri gerekse MD analizleri sonucunda *Chrysophanol* bağlanma paketinde kalmış ve QZN ile benzer etkileşimleri göstererek antagonist etkisi bulunduğu söylenebilir. Kimyasal yapısına bakıldığında *Chrysophanol*, QZN ve NNQ moleküllerine göre daha rigid (katı) gözükmekte olup dönebilen bağları daha

azdır. Enerjetik olarak QZN molekülüne yakın olmasının molekül yapısından değil kurduğu etkileşimlerden kaynaklandığı söylenebilir.

Lidor ve ark., (2015) TZD, TZD-C8 ve TZD-C10 moleküllerinin PqsR reseptörü ile moleküler kenetlenme simülasyonları sonucunda bağlanma enerjilerini sırası ile -4.3 kcal/mol, -4.8 kcal/mol, -5.7 kcal/mol olarak hesaplamışlardır. *Chrysophanol* her üç moleküle göre daha etkin bir şekilde reseptöre bağlanmaktadır fakat MD simülasyonları ile ilgili bir bilgi sahibi olunmadığı için detaylı yorum yapılamamıştır. Chatterjee ve ark., (2017) phenyllactic acid (PLA) molekülünü, PqsR ile moleküler kenetlenme simülasyonları (Glide/XP) sonucunda kenetlenme skoru sırası -8.66 kcal/mol'dür. PqsR-PLA kompleksinde LEU197, LEU208, ILE236 aminoasitleri ile H bağı kurulmuştur. Bir başka çalışmada Glide/XP modülü kullanılarak gerçekleştirilen kenetlenme simülasyonunda zingerone; reseptörlerinin aktif bölgesindeki GLN194 ile etkileşim kurarak -7.1 kcal/mol bağlanma afinitesi göstermektedir (Kumar ve ark., 2015).

*Chrysophanol*ün pqs sistemini inhibe etme potansiyeli *in vitro* olarak *pqsA-gfp* monitör suşu kullanılarak belirlenmiştir. Pqs sistemindeki QSI etkisi 135.8 μ M, 67,9 μ M ve 33,9 μ M dozlarda sırası ile % 73.1, % 54.9 ve % 30.5 olarak belirlenmiştir. En başarılı inhibisyon ilk dozda görülmüştür. Her üç dozda da bakteri popülasyonunda bir azalma dolayısıyla ölüm görülmemiştir. Tan ve ark., 2013, 1.56 μ M dozdaki 5-imino-4,6-dihidro-3H-1,2,3-triazolo [5,4-d] pirimidin-7-on (G1) G1'in , *pqsA-gfp* suşunu %57.5 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. *Chrysophanol* molekülünün pqs sistemini inhibe etme potansiyeli ilk dozda daha etkili gözükmetedir.

Piyosiyanin, *P. aeruginosa* suşlarının yaklaşık % 90- 95'inde yaygın bir şekilde üretilen bir virülans faktördür (Jayaseelan ve ark., 2014). Ayrıca PQS sistemi, piyosiyanin sentezinin regülasyonunu ve biyofilm üretimini teşvik ettiği bilinmektedir. (Xiao ve ark., 2006; Guo ve ark., 2014). Wang ve ark., (2020) cladodionen molekülünün piyosiyanin üretimini 400 μ M dozda %23.6 oranında inhibe ettiğini bildirmektedirler. Bir başka çalışmada, trans-cinnamaldehyde molekülünün (0.3 mg/ml) piyosiyanin üretimini % 42.06 oranında inhbe ettiğini bildirmektedirler (Tapia-Rodriguez ve ark., 2019). Bajpai ve ark. (2020)'nın çalışmasında naringenin molekülünün (0.5 mg/ml) piyosiyanin üretimini %70 oranında azalttığı bildirilmiştir. Patulin ve emodin moleküllerinin 50 uM

dozda piyosiyenin üretimini engelleme kapasitesi % 48 ve % 50 olarak bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2017). Musthafa ve ark., (2012) 2,5-Piperazinedion'un piyosiyenin üretimini engellemede %85'lik bir inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Rajkumari ve ark, (2018a,b), cinnamic acid ve baicalein moleküllerinin 250µg/ml konsantrasyonda piyosiyenin pigmenti üretiminde sırasıyla %80.94 ve % 79.71 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Rajkumari ve ark., (2019), doğal bir bileşik olan 5-hydroxymethylfurfural'ın (5-HMF) *P.aeruginosa* QS sistemi, biyofilm oluşumu ve virülans faktörü üzerinde etkilerini araştırdıkları detaylı çalışmada 1,25 µL / mL konsantrasyonda 5-HMF'nin piyosiyenin üretimini %65.34 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir. Çalışmamızda *Chrysophanol*ün 135.8 µM konsantrasyonda piyosiyenin üretimini % 96.3 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir. Literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında *Chrysophanol*'ün yukarıda bahsi geçen tüm moleküllere göre piyosiyenin üretimini inhibe etme potansiyelinin daha başarılı olduğu görülmektedir. QS sisteminin; biyofilm oluşumunu ve virülans faktör üretimini düzenlediği bilgisi ile *Chrysophanol*ün piyosiyenin üretimini neredeyse tamamen inhibe etme özelliği ve *pqs* sistemini büyük ölçüde inhibe etmesi ile literatürdeki bilgileri doğrular niteliktedir.

3.2.4. *Chrysophanol* molekülünün anti-biyofilm etkisi

Bu tez çalışmasında *Chrysophanol* molekülünün, *P. aeruginosa*'nın PAO1 ATCC15692 suşu üzerindeki anti-biyofilm etkisi 135.8 uM, 67.9 uM ve 33.9 uM konsantrasyonlarında test edilmiştir. Test edilen molekülün doza bağlı yüzde antibiyofilm etkisi sırasıyla %43,81 (±4,24), %46,97 (±1,69) ve %46,80 (±3,91) olarak belirlenmiştir. Ding ve ark. (2011) çalışmalarında, *Chrysophanol*'ün 200 uM 'de *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerindeki antibiyofilm etkisini % 44 olarak bildirmişlerdir. Emodin ise 20 uM konsantrasyonda *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde % 75 oranında biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Xiang ve ark (2017), aloe-emodin, emodin, physcion, *Chrysophanol* antrakinonlarını içeren sekonder metabolitlerin 1024-2µg/ml doz aralığında *S. aureus* ATCC29213 biyofilm formu üzerinde etkisini inceledikleri çalışmada *Chrysophanol* molekülünün düşük dozlarda bir etkisinin bulunmadığı ancak 1024 µg/ml dozunda düşük antibiyofilm etkisinin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *Chrysophanol* 200 uM konsantrasyonda *S. maltophilia*'da biyofilm oluşumunu % 38

oranında inhibe etmiştir (Ding ve ark, 2011). Ding ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışma ile *Chrysophanol*'ün *P. aeruginosa* biyofilm formu üzerine etkisi karşılaştırıldığında, çalışmamızda daha düşük dozlarda (33.9 uM) neredeyse daha yüksek etki görüldüğü gözlemlenmiştir (%46,80). Xiang ve ark., (2017) *Chrysophanol*'ün *S. aureus* üzerinde bir antibiyofilm etkisinin ancak yüksek dozlarda az bir etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. *Chrysophanol*'ün Gram – bakterilerde antibiyofilm etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Zhou ve ark., (2017) 50 uM dozda emodin ve patulin moleküllerinin PAO1 üzerinde antibiyofilm etkisinin % 45 ve % 52 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve ark., (2020) cladodionen molekülünün PAO1 üzerinde antibiyofilm etkisinin 400 µM dozda %52.4 olduğunu bildirmektedir. Rajkumari ve ark, (2018a,b), cinnamic acid ve baicalein moleküllerinin 250µg/ml konsantrasyonda PAO1 biyofilm oluşumu üzerinde sırası ile %50.13 ve %52.3 oranında inhibisyon göstermişlerdir. 5-HMF , *P. aeruginosa* PAO1 biyofilm gelişimini ise aynı 1,25 µL / mL dozda %29.8 oranında inhibe etmiştir (Rajkumari ve ark, 2019). Zingerone'un PAO1 biyofilm oluşumunu 10mg/ml de önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Kumar ve ark, 2015). Literatürdeki çalışmalar ile çalışmamız karşılaştırıldığında *Chrysophanol*'ün naringenin molekülüne göre daha düşük konsantrasyonda benzer oranda antibiyofilm etkisinin bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca baicalein ve cinnamic acid moleküllerinin daha yüksek konsantrasyonda etkili bulunmasına rağmen *Chrysophanol* molekülü de benzer etkiyi göstermiştir. *Chrysophanol*'ün PAO1 suşu üzerinde antibiyofilm etkisinin 5-HMF molekülünden çok daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Das ve Manefield (2012) yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* PAO1 ve PA14 kültürlerinde piyosiyanin üretiminin eDNA salımının teşvik edilmesinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Hücre dışı DNA (eDNA), *P. aeruginosa* biyofilm matrisinin >% 50'sini içermekte ve piyosiyaninin biyofilm gelişiminde) erken dönemde önemli olan eDNA salımını gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Whitchurch ve ark., 2002; T. Das & M. Manefield, 2012; T. Das & M. Manefield, 2013). Piyosiyanin (PCN) 'nin eDNA'nın çapraz bağlanmasını kolaylaştırdığı ve başlangıçtaki (initial) biyofilm oluşumunu kolaylaştıran viskozitenin arttığı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında piyosiyanin

retiminin, biyofilm tabakasındaki eDNA ile ilgisi bilindiğinde, *Chrysophanol*n eDNA salınımının engelleyerek biyofilm oluşumunu azaltabileceği de söylenebilir.



4. SONUÇLAR

Virülans faktörlerinin üretimine antagonist etki eden ajanların geliştirilmesi, PA'nın neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde yeni ve potansiyel olarak verimli bir yaklaşımı temsil etmektedir (Veesenmeyer ve ark, 2009). Quorum Sensing sisteminin biyofilm oluşumu ile virülans faktörlerle alakalı olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, farmakolojik önemi bilinen *Chrysophanol* molekülünün *in vitro* ve *in siliko* QSI özelliği ve antivirülans potansiyelinin araştırılması bu tez çalışmasında amaçlanmıştır.

- *las*, *rhl* ve *pqs* sistemlerindeki maksimum QS inhibisyon oranı 135.8 µM dozda belirlenmiştir. Belirtilen dozda en başarılı inhibisyonu veren sistem % 73.06 ile *pqs* sistemidir. *las* sisteminde % 52.6 oranında bir inhibisyon belirlenirken, *rhl* sistemindeki inhibisyon % 20.15 oranında kaydedilmiştir.
- Her üç sistemde *in vitro* olarak *pqsA-gfp* suşunda en iyi inhibisyon görülmüş ve *in siliko* hesaplamalarda *Chrysophanol*'ün etkili bir şekilde PqsR reseptörüne bağlandığı görülmüştür.
- Tez çalışmamızda *in siliko* hesaplamalar ve *in vitro* deneyler birbirleriyle tutarlılık göstermiştir. *Chrysophanol* *in siliko* hesaplamalarda da *in vitro* çalışmalarda da *rhl* sisteminde bir etkinlik göstermemiştir. *Las* sistemi ve *pqs* sisteminde her iki ortamda da başarı göstermiştir. *Chrysophanol*'ün *las* ve *pqs* sistemlerinin inhibisyonunda etkili bir antagonist molekül olabileceği düşünülmektedir
- *rhl* QS sisteminin analizinde, *rhlA-gfp* suşu ile yapılan deneylerde *Chrysophanol*'ün etkisiz olduğu tespit edilmiş, RhIR reseptörü ile yapılan *in siliko* hesaplamalarda moleküler kenetlenme skorunun düşük olduğu, gerekli MD analizlerinde de ligandın proteinden ayrıldığı görülmüştür. Bu bağlamda *in vitro* ve *in siliko* analizlerin birbiriyle tutarlılığı belirlenmiştir.
- Biyofilm formunun oluşumunu her üç dozda etkili bir şekilde inhibe etmiştir.
- *pqs* sistemi, biyofilm oluşumu ve piyosiyanin üretiminden sorumlu genleri regüle eder ifadesiyle deney ve hesaplama sonuçlarımız örtüşmektedir.

- *Chrysophanol* 135.8 uM'lik dozda, *P.aeruginosa* 'ya spesifik virölans faktörler olan piosiyanın elastaz ve proteaz üretimini sırasıyla %96.3, %88.3 ve %52.3 oranında inhibe etmiştir. Özellikle piosiyanın ve elastazdaki inhibisyonlar, *Chrysophanol*ün etkili bir antivirölans bileşik olması yönünde umut vadetmiştir.
- *Chrysophanol*ün las ve pqs sistemindeki başarısı, anti-biyofilm etkisi ve anti-virölans etkisi göz önüne alındığında etkili bir anti-virölans bileşik olarak *P. aeruginosa* tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.
- *Chrysophanol* birçok farmakolojik özelliği keşfedilmiş ve literatürde çalışılmış etkin bir sekonder metabolittir. Yapılan literatür çalışmalarında antibakteriyel etkisinin bilinmesine rağmen biyomonitör suşlar kullanılarak *P. aeruginosa* QS sistemine ve *P.aeruginosa* 'nın ürettiği virölans faktörlere (piosiyanın, elastaz ve proteaz) olan etkisi ile alakalı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca bu molekülün QS sistemi üzerindeki detaylı *in siliko* analizlerini yapılması ile *in vitro* bulguların tasdiklenmesi ile literatüre katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.
- *In vitro* deneylerin bilgisayar temelli hesaplamalarla desteklenmesi güncel QS inhibitörlerinin bulunması için harcanan zamandan ve maliyetten büyük ölçüde tasarruf edilmesini sağlamaktadır. *In siliko* hesaplamalar ve *in vitro* deneylerde *Chrysophanol* molekülünün temel iskelet yapısının etkili bir QSI bileşik olduğu çalışmamızca görülmüştür. İleriki çalışmalarda bu iskelet yapısı temel alınarak etkili farmakoforların geliştirilmesi ve etkili bulunan moleküllerin deneysel olarak etkinliğinin belirlenmesi planlanmaktadır.
- Ayrıca *P. aeruginosa* enfeksiyonunun etki mekanizmasını direkt veya indirekt olarak etkileyen birçok yolak bulunması sebebiyle ileriki çalışmalarda bu mekanizmaları hedefleyen diğer reseptör proteinlerin *in siliko* ve *in vitro* çalışmalarının belirlenen farmakofor modelleri ile yapılması ile planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Abagyan, R., Totrov, M., & Kuznetsov, D. (1994). ICM—a new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of computational chemistry*, 15(5), 488-506.
2. Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews*, 106(5), 1589-1615.
3. Ahumado, M., Díaz, A., & Vivas-Reyes, R. (2010). Theoretical and structural analysis of the active site of the transcriptional regulators LasR and TraR, using molecular docking methodology for identifying potential analogues of acyl homoserine lactones (AHLs) with anti-quorum sensing activity. *European journal of medicinal chemistry*, 45(2), 608-615.
4. Ahumado, M., Drosos, J. C., & Vivas-Reyes, R. (2014). Application of molecular docking and ONIOM methods for the description of interactions between anti-quorum sensing active (AHL) analogues and the *Pseudomonas aeruginosa* LasR binding site. *Molecular bioSystems*, 10(5), 1162-1171.
5. Aksoydan, B. (2014). Kitosan nano-parçacıkların *pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisinin *in silico* ve *in vitro* ortamlarda incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
6. Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of chemical physics*, 27(5), 1208-1209.
7. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
8. Annapoorani, A., Umamageswaran, V., Parameswari, R., Pandian, S. K., & Ravi, A. V. (2012). Computational discovery of putative quorum sensing inhibitors against LasR and RhlR receptor proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of computer-aided molecular design*, 26(9), 1067-1077.

9. Arnold, K., Kiefer, F., Kopp, J., Battey, J. N., Podvinec, M., Westbrook, J. D., ... & Schwede, T. (2009). The protein model portal. *Journal of structural and functional genomics*, 10(1), 1-8.
10. Bajpai, R., Yusuf, M. A., Upreti, D. K., Gupta, V. K., & Singh, B. N. (2020). Endolichenic fungus, *Aspergillus quandricinctus* of *Usnea longissima* inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103933.
11. Bajpai, R., Yusuf, M. A., Upreti, D. K., Gupta, V. K., & Singh, B. N. (2020). Endolichenic fungus, *Aspergillus quandricinctus* of *Usnea longissima* inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103933.
12. Baker, D., & Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294(5540), 93-96.
13. Banin, E., Hughes, D., & Kuipers, O. P. (2017). Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 450-452.
14. Banks, J. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, A. E., Damm, W., Farid, R., ... & Murphy, R. (2005). Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1752-1780.
15. Bas, D. C., Rogers, D. M., & Jensen, J. H. (2008). Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein–ligand complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73(3), 765-783..
16. Batool, M., Ahmad, B., & Choi, S. (2019). A structure-based drug discovery paradigm. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2783.
17. Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.

18. Berendsen, H. J., Postma, J. P., van Gunsteren, W. F., & Hermans, J. (1981). Interaction models for water in relation to protein hydration. In *Intermolecular forces* (pp. 331-342). Springer, Dordrecht.
19. Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo-and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.
20. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., ... & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(W1), W252-W258.
21. Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Fiandaca, M. J., Pedersen, J., Hansen, C. R., Andersen, C. B., ... & Høiby, N. (2009). Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology*, 44(6), 547-558.
22. Bottomley, M. J., Muraglia, E., Bazzo, R., & Carfi, A. (2007). Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen Pseudomonas aeruginosa from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13592-13600.
23. Brint, J. M., & Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in Pseudomonas aeruginosa is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *Journal of bacteriology*, 177(24), 7155-7163.
24. Calfee, M. W., Coleman, J. P., & Pesci, E. C. (2001). Interference with Pseudomonas quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by Pseudomonas aeruginosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11633-11637.
25. Capilato, J. N., Philippi, S. V., Reardon, T., McConnell, A., Oliver, D. C., Warren, A., ... & Perez, L. J. (2017). Development of a novel series of non-natural triaryl agonists and antagonists of the Pseudomonas aeruginosa LasR quorum sensing receptor. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 25(1), 153-165.

26. Cavasotto, C. N., & Phatak, S. S. (2009). Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today*, 14(13-14), 676-683.
27. Chatterjee, M., D'morris, S., Paul, V., Warriar, S., Vasudevan, A. K., Vanuopadath, M., ... & Biswas, R. (2017). Mechanistic understanding of Phenyllactic acid mediated inhibition of quorum sensing and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(22), 8223-8236.
28. Cheema, W. A., Manasfi, T., Kaarsholm, K. M., Andersen, H. R., & Boudenne, J. L. (2017). Effect of medium-pressure UV-lamp treatment on disinfection by-products in chlorinated seawater swimming pool waters. *Science of the Total Environment*, 599, 910-917.
29. Cheng, T., Li, Q., Zhou, Z., Wang, Y., & Bryant, S. H. (2012). Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. *The AAPS journal*, 14(1), 133-141.
30. Choudhary, S., & Schmidt-Dannert, C. (2010). Applications of quorum sensing in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1267-1279.
31. Clinton, A., & Rumbaugh, K. P. (2016). Interspecies and interkingdom signaling via quorum signals. *Israel Journal of Chemistry*, 56(5), 265-272.
32. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
33. Das, T., & Manefield, M. (2012). Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one*, 7(10).
34. Das, T., & Manefield, M. (2013). Phenazine production enhances extracellular DNA release via hydrogen peroxide generation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Communicative & integrative biology*, 6(3), e23570.
35. Defoirdt, T. (2018). Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy. *Trends in microbiology*, 26(4), 313-328.
36. Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2017.

37. Dickey, S. W., Cheung, G. Y., & Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(7), 457.
38. Ding, X., Yin, B., Qian, L., Zeng, Z., Yang, Z., Li, H., ... & Zhou, S. (2011). Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of medical microbiology*, 60(12), 1827-1834.
39. Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., & Zhang, L. H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 411(6839), 813-817.
40. Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351-368.
41. Durdagi, S., Aksoydan, B., Erol, I., Kantarcioglu, I., Ergun, Y., Bulut, G., ... & Salmas, R. E. (2018). Integration of multi-scale molecular modeling approaches with experiments for the in silico guided design and discovery of novel hERG-Neutral antihypertensive oxazalone and imidazolone derivatives and analysis of their potential restrictive effects on cell proliferation. *European journal of medicinal chemistry*, 145, 273-290.
42. Durdagi, S., Aksoydan, B., Erol, I., Kantarcioglu, I., Ergun, Y., Bulut, G., ... & Salmas, R. E. (2018). Integration of multi-scale molecular modeling approaches with experiments for the in silico guided design and discovery of novel hERG-Neutral antihypertensive oxazalone and imidazolone derivatives and analysis of their potential restrictive effects on cell proliferation. *European journal of medicinal chemistry*, 145, 273-290.
43. Ekhteiari Salmas, R., Unlu, A., Bektaş, M., Yurtsever, M., Mestanoglu, M., & Durdagi, S. (2017). Virtual screening of small molecules databases for discovery of novel PARP-1 inhibitors: combination of in silico and in vitro studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(9), 1899-1915.

44. El-Mowafy, S. A., El Galil, K. H. A., El-Messery, S. M., & Shaaban, M. I. (2014). Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 74, 25-32.
45. Essar, D. W., Eberly, L. E. E., Hadero, A., & Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of bacteriology*, 172(2), 884-900.
46. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of chemical physics*, 103(19), 8577-8593.
47. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., ... & Sali, A. (2007). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current protocols in protein science*, 50(1), 2-9.
48. European centre for disease prevention and control (ECDC). The bacterial challenge: time to react. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909 TER The Bacterial Challenge Time to React.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf)
49. Evans, D. J., & Holian, B. L. (1985). The nose–hoover thermostat. *The Journal of chemical physics*, 83(8), 4069-4074.
50. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384-13421.
51. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
52. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... & Shaw, D. E. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1739-1749.

53. Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual review of genetics*, 35(1), 439-468.
54. Galloway, W. R., Hodgkinson, J. T., Bowden, S., Welch, M., & Spring, D. R. (2012). Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends in microbiology*, 20(9), 449-458.
55. García-Reyes, S., Soberón-Chávez, G., & Cocotl-Yanez, M. (2020). The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *Journal of Medical Microbiology*, 69(1), 25-34.
56. Ghosh, A. C., Manmade, A. W. I. N. A. S. H., Kobbe, B. R. U. N. H. I. L. D. E., Townsend, J. M., & Demain, A. L. (1978). Production of luteoskyrin and isolation of a new metabolite, pibasterol, from *Penicillium islandicum* Sopp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35(3), 563-566.
57. Gould, T. A., Schweizer, H. P., & Churchill, M. E. (2004). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Molecular microbiology*, 53(4), 1135-1146.
58. Gökalsın, B. (2015) Quorum Sensing İnhibisyonunun *Pseudomonas aeruginosa*'da Floresan Işıma ve Krt-Pzr Yöntemleri Kullanılarak Kantitatif Olarak Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
59. Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., & Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS microbiology reviews*, 40(1), 86-116.
60. Guida, M., Di Onofrio, V., Gallè, F., Gesuele, R., Valeriani, F., Liguori, R., ... & Liguori, G. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pool water: evidences and perspectives for a new control strategy. *International journal of environmental research and public health*, 13(9), 919.

61. Guo, Q., Kong, W., Jin, S., Chen, L., Xu, Y., & Duan, K. (2014). Pqs R-dependent and Pqs R-independent regulation of motility and biofilm formation by PQS in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of basic microbiology*, 54(7), 633-643.
62. Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1750-1759.
63. Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of clinical investigation*, 112(9), 1300-1307.
64. Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., ... & Kjelleberg, S. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148(1), 87-102.
65. Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., ... & Kjelleberg, S. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148(1), 87-102.
66. Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., ... & Manefield, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal*, 22(15), 3803-3815.
67. Hildebrand, A., Remmert, M., Biegert, A., & Söding, J. (2009). Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(S9), 128-132.
68. Holloway, B. W., & Morgan, A. F. (1986). Genome organization in *Pseudomonas*. *Annual Reviews in Microbiology*, 40(1), 79-105.

69. Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 8, 37.
70. Hossain, M. A., Sattenapally, N., Parikh, H. I., Li, W., Rumbaugh, K. P., & German, N. A. (2020). Design, synthesis, and evaluation of compounds capable of reducing *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *European journal of medicinal chemistry*, 185, 111800.
71. Ilangonav, A., Fletcher, M., Rampioni, G., Pustelny, C., Rumbaugh, K., Heeb, S., ... & Chhabra, S. R., Emsley, J., Williams, P. (2013). Structural basis for native agonist and synthetic inhibitor recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing regulator PqsR (MvfR). *PLoS Pathog*, 9(7), e1003508.
72. Jakobsen, T. H., van Gennip, M., Christensen, L. D., Bjarnsholt, T., & Givskov, M. (2011). Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition in vitro. In *Quorum Sensing* (pp. 253-263). Humana Press.
73. Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1159-1168.
74. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of molecular biology*, 267(3), 727-748.
75. Joo, H. S., & Otto, M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry & biology*, 19(12), 1503-1513.
76. Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology advances*, 31(2), 224-245.
77. Kalyaanamoorthy, S., & Chen, Y. P. P. (2011). Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug discovery today*, 16(17-18), 831-839.

78. Kapetanovic, I. M. (2008). Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chemico-biological interactions*, 171(2), 165-176.
79. Kekeç, Ö., Gökalsın, B., Karaltı, İ., Kayhan, F. E., & Sesal, N. C. (2016). Effects of Chlorine Stress on *Pseudomonasaeruginosa* Biofilm and Analysis of Related Gene Expressions. *Current microbiology*, 73(2), 228-235.
80. Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols*, 4(3), 363.
81. Kim, C., Kim, J., Park, H. Y., Park, H. J., Lee, J. H., Kim, C. K., & Yoon, J. (2008). Furanone derivatives as quorum-sensing antagonists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1), 37
82. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11), 935-949.
83. Kumar, L., Chhibber, S., Kumar, R., Kumar, M., & Harjai, K. (2015). Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia*, 102, 84-95.
84. Kuo, Y. H., Lee, P. H., & Wein, Y. S. (2002). Four New Compounds from the Seeds of *Cassia fistula*. *Journal of natural products*, 65(8), 1165-1167.
85. LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77(1), 73-111.
86. Laurie, A. T., & Jackson, R. M. (2005). Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein–ligand binding sites. *Bioinformatics*, 21(9), 1908-1916.
87. Laurie, A. T., & Jackson, R. M. (2006). Methods for the prediction of protein-ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening. *Current Protein and Peptide Science*, 7(5), 395-406.

88. Lavecchia, A., & Cerchia, C. (2016). In silico methods to address polypharmacology: current status, applications and future perspectives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 288-298.
89. Leach, A. R., & Leach, A. R. (2001). *Molecular modelling: principles and applications*. Pearson education.
90. Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26-41.
91. Xiang, H., Cao, F., Ming, D., Zheng, Y., Dong, X., Xiang, H., Cao, F., Ming, D., Zheng, Y., Dong, X., Zhong, X., ... & Wang, L. (2017). Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(17), 6671-6681.
92. Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26-41.
93. Leistner, E., & Zenk, M. H. (1969). *Chrysophanol* (1, 8-dihydroxy-3-methylanthraquinone) biosynthesis in higher plants. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, (5), 210-211.
94. Levitt, M. (2007). Growth of novel protein structural data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3183-3188.
95. Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 48-56.
96. Li, H., Robertson, A. D., & Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4), 704-721.
97. Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S., & Friesner, R. A. (2011). The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(10), 2794-2812.

98. Lidor, O., Al-Quntar, A., Pesci, E. C., & Steinberg, D. (2015). Mechanistic analysis of a synthetic inhibitor of the *Pseudomonas aeruginosa* LasI quorum-sensing signal synthase. *Scientific reports*, 5, 16569.
99. Lu, C. C., Yang, J. S., Huang, A. C., Hsia, T. C., Chou, S. T., Kuo, C. L., ... & Chung, J. G. (2010). *Chrysophanol* induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Molecular nutrition & food research*, 54(7), 967-976.
100. Lu, C., Kirsch, B., Zimmer, C., De Jong, J. C., Henn, C., Maurer, C. K., ... & Hartmann, R. W. (2012). Discovery of antagonists of PqsR, a key player in 2-alkyl-4-quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & biology*, 19(3), 381-390.
101. Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 194-222.
102. Malik, E. M., & Müller, C. E. (2016). Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal research reviews*, 36(4), 705-748.
103. Martínez, O. F., Cardoso, M. H., Ribeiro, S. M., & Franco, O. L. (2019). Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9.
104. Martyna, G. J., Tobias, D. J., & Klein, M. L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of chemical physics*, 101(5), 4177-4189.
105. McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), 585-590.
106. McGuffin, L. J., & Roche, D. B. (2011). Automated tertiary structure prediction with accurate local model quality assessment using the intfold-ts method. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(S10), 137-146.

107. Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201* (pp. 71-115). Springer, Boston, MA.
108. Moore, T. J., Zhang, H., Anderson, G., & Alexander, G. C. (2018). Estimated costs of pivotal trials for novel therapeutic agents Approved by the US food and drug administration, 2015-2016. *JAMA internal medicine*, 178(11), 1451-1457.
109. Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39.
110. Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical biology & drug design*, 93(1), 12-20.
111. Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C. D., Goldberg, J. B., & Bassler, B. L. (2017). The RhlR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS pathogens*, 13(7), e1006504.
112. Mullard, A. (2014). New drugs cost US \$2.6 billion to develop.
113. Mullins, J. G. (2012). Structural modelling pipelines in next generation sequencing projects. In *Advances in protein chemistry and structural biology* (Vol. 89, pp. 117-167). Academic Press.
114. Mungroo, N. A., Oliveira, G., & Neethirajan, S. (2016). SERS based point-of-care detection of food-borne pathogens. *Microchimica Acta*, 183(2), 697-707.
115. Musthafa, K. S., Balamurugan, K., Pandian, S. K., & Ravi, A. V. (2012). 2, 5-Piperazinedione inhibits quorum sensing-dependent factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of basic microbiology*, 52(6), 679-686.
116. Neufeld, B. H., Neufeld, M. J., Lutzke, A., Schweickart, S. M., & Reynolds, M. M. (2017). Metal–Organic Framework Material Inhibits Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Advanced Functional Materials*, 27(34), 1702255.

117. O'Brien, K. T., Noto, J. G., Nichols-O'Neill, L., & Perez, L. J. (2015). Potent irreversible inhibitors of LasR quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS medicinal chemistry letters*, 6(2), 162-167.
118. Ohman, D. E., Cryz, S. J., & Iglewski, B. H. (1980). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *Journal of Bacteriology*, 142(3), 836-842.
119. Ołdak, E., & Trafny, E. A. (2005). Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3281-3288.
120. Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian journal of veterinary research*, 66(2), 86.
121. Onufriev, A., Bashford, D., & Case, D. A. (2004). Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(2), 383-394.
122. Paczkowski, J. E., Mukherjee, S., McCready, A. R., Cong, J. P., Aquino, C. J., Kim, H., ... & Bassler, B. L. (2017). Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4064-4076.
123. Panichayupakaranant, P., Sakunpak, A., & Sakunphueak, A. (2009). Quantitative HPLC determination and extraction of anthraquinones in *Senna alata* leaves. *Journal of chromatographic science*, 47(3), 197-200.
124. Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576.
125. Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.

126. 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.
127. Peterson, J. W. (1996). Bacterial pathogenesis. In *Medical Microbiology. 4th edition*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
128. Pieper, U., Eswar, N., Davis, F. P., Braberg, H., Madhusudhan, M. S., Rossi, A., ... & Shen, M. Y. (2006). MODBASE: a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), D291-D295.
- Rajkumari, J., Borkotoky, S., Murali, A., Suchiang, K., Mohanty, S. K., & Busi, S. (2018). Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biotechnology letters*, 40(7), 1087-1100.
129. Rajkumari, J., Borkotoky, S., Murali, A., Suchiang, K., Mohanty, S. K., & Busi, S. (2018). Attenuation of quorum sensing controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by pentacyclic triterpenes, betulin and betulinic acid. *Microbial pathogenesis*, 118, 48-60.
130. Rajkumari, J., Borkotoky, S., Reddy, D., Mohanty, S. K., Kumavath, R., Murali, A., ... & Busi, S. (2019). Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of 5-hydroxymethylfurfural against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Insights from in vitro, in vivo and in silico studies. *Microbiological research*, 226, 19-26.
131. Ramachandran, G. N. (1963). Aspects of protein structure. In *International Symposium on Protein Structure and Crystallography (1963: Madras, India)*. Academic Press.
132. Raman, S., Vernon, R., Thompson, J., Tyka, M., Sadreyev, R., Pei, J., ... & Kinch, L. (2009). Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(S9), 89-99..
133. Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 149-161.

134. Rather, I. A., Kim, B. C., Bajpai, V. K., & Park, Y. H. (2017). Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi journal of biological sciences*, 24(4), 808-812.
135. Rayo, J., Amara, N., Krief, P., & Meijler, M. M. (2011). Live cell labeling of native intracellular bacterial receptors using aniline-catalyzed oxime ligation. *Journal of the American Chemical Society*, 133(19), 7469-7475.
136. Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Söding, J. (2012). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature methods*, 9(2), 173.
137. Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11), a012427.
138. Sahaboglu, A., Miranda, M., Canjuga, D., Avci-Adali, M., Savytska, N., Secer, E., ... & Durdagi, S. (2019). Drug repurposing studies of PARP inhibitors as a new therapy for inherited retinal degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-18.
139. Sahin, K., & Durdagi, S. (2020). Identifying new piperazine-based PARP1 inhibitors using text mining and integrated molecular modeling approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-10.
140. Saleh, M. M., Abbas, H. A., & Askoura, M. M. (2019). Repositioning secnidazole as a novel virulence factors attenuating agent in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 127, 31–38. doi:10.1016/j.micpath.2018.11.042
141. Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Frontiers in pharmacology*, 9, 923.
142. Sastry, G.M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design* 27, 221-234 (2013).

143. Schmidt, T., Bergner, A., & Schwede, T. (2014). Modelling three-dimensional protein structures for applications in drug design. *Drug discovery today*, 19(7), 890-897.
144. Schrödinger Release: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY. (2015).
145. Schütz C., Empting M. (2018). Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective
146. Schwarz, C., Bouchara, J. P., Buzina, W., Chrenkova, V., Dmeńska, H., de la Pedrosa, E. G. G., ... & Matos, T. (2018). Organization of patient management and fungal epidemiology in cystic fibrosis. *Mycopathologia*, 183(1), 7-19.
147. Seo, E. J., Ngoc, T. M., Lee, S. M., Kim, Y. S., & Jung, Y. S. (2012). *Chrysophanol*-8-O-glucoside, an anthraquinone derivative in rhubarb, has antiplatelet and anticoagulant activities. *Journal of pharmacological sciences*, 1202020654-1202020654.
148. Shelley, J. C., Cholleti, A., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Timlin, M. R., & Uchimaya, M. (2007). Epik: a software program for pK a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of computer-aided molecular design*, 21(12), 681-691.
149. Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., & Trentin, D. S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical reviews*, 116(16), 9162-9236.
150. Sommer, M. O., Munck, C., Toft-Kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm?. *Nature reviews microbiology*, 15(11), 689-696.
151. Song, C. M., Lim, S. J., & Tong, J. C. (2009). Recent advances in computer-aided drug design. *Briefings in bioinformatics*, 10(5), 579-591.
152. Strateva, T., & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of microbiology*, 61(4), 717-732.

153. Su, S., Wu, J., Gao, Y., Luo, Y., Yang, D., & Wang, P. (2020). The pharmacological properties of *Chrysophanol*, the recent advances. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 110002.
154. Suneby, E. G., Herndon, L. R., & Schneider, T. L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* LasR· DNA binding is directly inhibited by quorum sensing antagonists. *ACS infectious diseases*, 3(3), 183-189.
155. Swinney, D. C., & Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered?. *Nature reviews Drug discovery*, 10(7), 507-519.
156. Tan, S. Y. Y., Chua, S. L., Chen, Y., Rice, S. A., Kjelleberg, S., Nielsen, T. E., ... & Givskov, M. (2013). Identification of five structurally unrelated quorum-sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* from a natural-derivative database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(11), 5629-5641.
157. Tapia-Rodriguez, M. R., Bernal-Mercado, A. T., Gutierrez-Pacheco, M. M., Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., ... & Ayala-Zavala, J. F. (2019). Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to carvacrol: alterations of the Quorum sensing at enzymatic and gene levels. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 1-7.
158. Tutin, F., & Clewer, H. W. B. (1911). XCIX.—The constituents of rhubarb. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 99, 946-967.
159. US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Available online at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
160. Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D. A., & Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current opinion in microbiology*, 41, 15-20.
161. Veesenmeyer, J. L., Hauser, A. R., Lisboa, T., & Rello, J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Critical care medicine*, 37(5), 1777.

162. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40(4), 277.
163. Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
164. Wang, M., Zhao, L., Wu, H., Zhao, C., Gong, Q., & Yu, W. (2020). Cladodione Is a Potential Quorum Sensing Inhibitor Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Drugs*, 18(4), 205.
165. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... & Lepore, R. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303.
166. Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 319-346.
167. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.
168. World Health Organization. (2017). *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis* (No. WHO/EMP/IAU/2017.12). World Health Organization.
169. Wright, G. D. (2017). Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery. *Natural product reports*, 34(7), 694-701.
170. Xiao, G., Déziel, E., He, J., Lépine, F., Lesic, B., Castonguay, M. H., ... & Rahme, L. G. (2006). MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Molecular microbiology*, 62(6), 1689-1699.
171. Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153(5), 1318-1328.

172. Yang, L., Rybtke, M. T., Jakobsen, T. H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2009). Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2432-2443.
173. Yeh, R. Y., Farré, M. J., Stalter, D., Tang, J. Y., Molendijk, J., & Escher, B. I. (2014). Bioanalytical and chemical evaluation of disinfection by-products in swimming pool water. *Water research*, 59, 172-184.
174. Yu, M., & Chua, S. L. (2020). Demolishing the great wall of biofilms in Gram-negative bacteria: To disrupt or disperse?. *Medicinal research reviews*, 40(3), 1103-1116.
175. Yu, W., & MacKerell, A. D. (2017). Computer-aided drug design methods. In *Antibiotics* (pp. 85-106). Humana Press, New York, NY.
176. Yusuf, M. A., Singh, B. N., Sudheer, S., Kharwar, R. N., Siddiqui, S., Abdel-Azeem, A. M., ... & Gupta, V. K. (2019). *Chrysophanol*: a natural anthraquinone with multifaceted biotherapeutic potential. *Biomolecules*, 9(2), 68.
177. Zhang, J., Rui, X., Wang, L., Guan, Y., Sun, X., & Dong, M. (2014). Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Food Control*, 42, 125-131.
178. Zhang, C., Song, Y., Wang, C., Zhao, L., Kang, H., Ma, X., ... & Ma, C. (2017). The effects of *Chrysophanol* on ovalbumin (OVA)-induced chronic lung toxicology by inhibiting Th17 response. *Toxicology mechanisms and methods*, 27(5), 327-334.
179. Zhou, J., Bi, S., Chen, H., Chen, T., Yang, R., Li, M., ... & Jia, A. Q. (2017). Anti-biofilm and antivirulence activities of metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 8, 769.

EKLER

EK-1

İstatistiksel Analiz

Chrysophanol molekülünün *P. aeruginosa* QS sistemine (*lasB-gfp*, *rhlA-gfp* ve *pqsA-gfp*), ürettiği spesifik virülans faktörlere (piyosiyanin, elastaz ve proteaz) ve biyofilm formu üzerine etkisini karşılaştırmak amacıyla istatistiksel analiz yapılmıştır. Uygulanan doz değişkenlerin farklılıkları için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey testi birlikte yapılmış, analizleri için SPSS programı kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2014). $P<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Antibiyofilm deneyinde uygulanan tüm dozlar ($135.8\mu\text{M}$, $66.9\mu\text{M}$ ve $33.9\mu\text{M}$) kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

las sisteminin istatistiksel analizinde de tüm dozlar kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

rhl sisteminde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnızca $135.8\mu\text{M}$ dozda anlamlı bir fark belirlenmiştir ($P<0,05$). Uygulama yapılan tüm dozlar arasında da $135.8\mu\text{M}$ 'lık ilk doz diğer dozlara göre anlamlı sonuçlar vermiştir ($P<0,05$).

pqs sisteminde ise, tüm dozlar kendi içinde ve kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

In vitro inhibisyonlar da göz önüne alındığında istatistiksel analizlerle tutarlı olarak tüm deneylerde $135.8\mu\text{M}$ 'lık ilk doz en başarılı doz olarak belirlenmiştir. Tüm deneylerde $135.8\mu\text{M}$ doz alınarak yapılan istatistiksel analizlerde antibiyofilm etkisi ve *las*, *rhl* ve *pqs* sistemleri kendi içlerinde birbirlerine göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI : Ayla YILDIZ

YAZIŞMA ADRESİ : Maden Mahallesi, Kumsal Sokak, Sadiye Hanım Apt.
11/2 Büyükdada/İSTANBUL

DOĞUM TARİHİ ve YERİ: 20/03/1995 İSTANBUL/KADIKÖY

E-POSTA : yildizzayla@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU : Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Sayısal	Suadiye Hacı Mustafa Tarman Lisesi	2013
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2017
Yan-Dal	Eczacılık	Marmara Üniversitesi	2019

Yayınlar

Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Biofilm and pqs System Inhibition Properties of Norlichexanthone against *Pseudomonas aeruginosa*, 6rd International BAU Drug Design Congress, İstanbul Turkey, 2018 (Poster Sunumu)

Norlichexanthone against *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl QS System, 6rd International BAU Drug Design Congress, İstanbul Turkey, (Poster Sunumu)

Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing Inhibition by Cherry Stalk, International IVEK BIO Convention, Istanbul Turkey, (Poster Sunumu)

In silico and *in vitro* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by Ergosterol, XXXVIII International Turkey Microbiology Conference, Antalya Turkey, (Poster Sunumu)

Quorum Sensing and Biofilm Inhibition Properties of Ethyl Acetate Extracts of Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves against *Pseudomonas aeruginosa*, International IVEK BIO Convention, Istanbul Turkey, (Poster Sunumu)

Anti-QS and Anti-Biofilm Activities of *Cucurbita pepo* Extracts against *Pseudomonas aeruginosa*, International IVEK BIO Convention, Istanbul Turkey, (Poster Sunumu)

Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing by *Hypogymnia tubulosa* Lichen and Mycobiont Acetone Extracts, IGBC II. International Green Biotechnology Congress, Istanbul Turkey (Poster Sunumu)

Pseudomonas aeruginosa las and *rhl* Quorum Sensing Inhibition by Atranorin, IGBC II. International Green Biotechnology Congress, Istanbul Turkey, September (Poster Sunumu)

Determination Of The İnhibitory Effects Of *Chrysophanol* on *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Mechanism via *in vitro* and *in silico* Methods, Eurasian BioChem Congress, Ankara, Turkey (Poster Sunumu)

Proje Deneyimi

216S885, Türk Liken Biyokaynakları Kullanılarak Bakteriyel Quorum Sensing İnhibitörü Yeni Antimikrobiyal Bileşenlerin Geliştirilmesi ve Sanayiye Aktarılması, Uluslararası, Burslu, Sonuçlandı ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 18.04.2018 – 01.11.2019, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.11.2017 - 01.11.2019 - Bursiyer