



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**FARKLI ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN
STREPTOCOCCUS MUTANS SORTAZ A ENZİMİ
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN
MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMİ İLE
İNCELENMESİ**

Merve SALMANLI

UZMANLIK TEZİ

Prof. Dr. Tamer TÜZÜNER

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**FARKLI ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN
STREPTOCOCCUS MUTANS SORTAZ A ENZİMİ
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN
MOLEKÜLER MODELLEME YÖNTEMİ İLE
İNCELENMESİ**

Merve SALMANLI

UZMANLIK TEZİ

Prof. Dr. Tamer TÜZÜNER

TRABZON-2020

ONAY SAYFASI

Bu Tez Uzmanlık Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Tamer TÜZÜNER

Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Diş Hekimliğinde Uzmanlık Programı öğrencisi Arş. Gör. Dt. Merve Salmanlı'nın hazırladığı "Farklı Antimikrobiyal Ajanların *Streptococcus Mutans* Sortaz A Enzimi Üzerindeki Etkinliklerinin Moleküler Modelleme Yöntemi İle İncelenmesi" başlıklı tez Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

: 25.09.2020

Danışman Prof. Dr. Tamer TÜZÜNER

:

Jüri Üyesi Prof. Dr. Özgül BAYGIN

:

Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Sema AYDINOĞLU

:

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Polat Koşucu

Dekan

Eylül-2020

TRABZON

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabileceğini beyan ederim.

25.09.2020

Merve SALMANLI

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca büyük bir özveri ile bana her zaman destek olan, akademik deneyimi ve tecrübesi ile her daim yol gösteren, öğrencisi olmaktan büyük gurur ve onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tamer Tüzüner'e,

Tez dönemim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, meslek hayatıma kattığı yeni bir bakış açısıyla yol gösterici olan, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gizem Tatar'a,

Uzmanlık sürecimde değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Özgül Baygın ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nagehan Yılmaz'a,

Tez araştırmamı Hesaplamalı Yapısal Biyoloji Proje Çağrısı kapsamında 3662 numaralı proje ile destekleyen Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB)

AÜDHF'de sabundan uzmanlığa giden bu yolda hep beraber olduğum, saatlerce güldüğümüz muhabbetlerimizi ve güzel keklerini her zaman özleyeceğim canım ev arkadaşım Merve Keser'e,

Yoğun çalışma hayatında her zaman birbirimize destek olduğumuz, bu şehri ve hastaneyi sevgileri ve varlıkları ile anlamlı kılan çalışma arkadaşlarım Gizem, Yakup, Güneş, Tuğba, Merve, Yasemin ve Ömer'e, yardımları ve güler yüzleri ile beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum bölüm personelimize,

Birçok güzel anı paylaştığım, sevgilerini her zaman hissettiğim canım arkadaşlarım Sinem, Esmahan, Beyza, Turgay, Rüya, Ayşe ve Nezrin'e,

Mesafelere rağmen her zaman yanımda olduklarını bildiğim kıymetli dostlarım Ayşenur Sak, Zeynep Gürpınar, Merve Boz, Aslı Güler, Yağmur Düz, Gizem Gür, Merve Gizem Şenel, Naz Ortakçı ve Gizem Selçuk'a,

Bu noktaya gelmemde en büyük payı olan beni sonsuz sevgi ve şevkatleri ile her zaman destekleyen, fedakar güzel annem Mevlüde Salmanlı'ya, canım babam Süleyman Salmanlı'ya, abim Kadir Salmanlı ve yengem İmran Er Salmanlı'ya,

Ve en büyük neşe kaynağım olan, yüzümü hep güldüren minnak hastalarım :)

Tüm kalbimle teşekkür ederim...

İthaf

Bu uzmanlık tezimi, 2020'nin fedakar sağlık çalışanlarına ve benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakrlıktan kaçınmayan ve sevgileriyle her zaman yanımda olan canım anneme ve babama ithaf ediyorum..

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI	
KABUL VE ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İTHAF	
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMA, SİMGE VE FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diş Çürüğü	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Etiyoloji	3
2.1.3. Patogenez	4
2.2. Oral Flora	5
2.3. Çürük Mikrobiyolojisi	6
2.3.1. Oral Streptokoklar	6
2.3.1.1. Streptococcus Mutans (S. Mutans)	7
2.3.1.1.1. Streptococcus Mutans'ın Diş Çürüğündeki Önemi	8
2.3.1.1.2. Streptococcus Mutans'ın Metabolik Aktivitesi ve Virülansı	9
2.3.1.1.3. Streptococcus Mutans'ın Diş Yüzeyine Adezyonu	10
2.3.1.1.3.1. Sükroz Bağımlı Adezyon	10
2.3.1.1.3.2. Sükrozdan Bağımsız Adezyon	11
2.4. Sortaz Enzimleri	12
2.4.1. Sortaz A (SrtA) Enzimi	12
2.4.2. Sortaz A Enzimine Yönelik İnhibitörlerin Geliştirilmesi	15
2.4.2.1. Klorheksidin (CHX)	17
2.4.2.2. Kalkonlar	18

2.4.2.3. Flavonoidler	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Moleküler Modelleme	19
3.1.1. Moleküler Docking (Kenetlenme)	20
3.2. Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon, Toksisite (ADMET).....	21
3.3. Moleküler Modelleme Çalışma Protokolü	22
3.3.1. Moleküler Modelleme Çalışma Protokolü Aşamaları	25
4. BULGULAR	29
4.1. Ligandların ADMET Analizinin Değerlendirilmesi	31
4.2. Enzim-Ligand Bileşiklerinin Moleküler Docking Analizlerinin Değerlendirilmesi ...	33
4.3. Enzim-Ligand Yapısının Bağlanma Analizi Sonuçları	34
4.4. Klorheksidin ve Potansiyel İnhibitör Bileşiklerin ADMET Analizinin Sonuçları	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
7. KAYNAKLAR	52
EKLER	68
EK Tablo 1	69
ÖZGEÇMİŞ	82

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Oral mikroflora üyeleri	5
Tablo 2. Oral florada bulunan streptokokların sınıflandırılması	7
Tablo 3. Sortaz A enzim inhibisyonuna yönelik belirlenen 102 bileşiğin ADMET analizi.....	29
Tablo 4. Moleküler docking analizi sonucunda belirlenen en etkin altı bileşiğin ve CHX'in 2B kimyasal yapısı, bağlanma enerjisi ve K_i değerleri	33
Tablo 5. Sortaz A enzim-ligand kompleksinin CHX ve potansiyel inhibitör bileşikler ile aminoasit etkileşimleri	35
Tablo 6. Klorheksidin ve altı potansiyel inhibitör bileşiğin ADMET analizi.....	43
EK Tablo 1. <i>S. mutans</i> SrtA enziminin inhibisyonuna yönelik literatür ve veri tabanlarından elde edilen 102 ligandın, 2B kimyasal yapısı, bağlanma enerjisi ve K_i değerleri.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Diş çürüğü oluşumunda rol oynayan faktörler	4
Şekil 2. Streptococcus mutans kolonilerinin elektron mikroskop görüntüleri	7
Şekil 3. Streptococcus mutans'ın adezyon mekanizması	10
Şekil 4. Yüzey proteinlerinde ve pili bileşenlerinde bulunan ortak yapısal bileşikler	11
Şekil 5. Sortaz A enziminin 3-boyutlu kristal yapısı	13
Şekil 6. Sortaz A'nın katalizlediği transpeptidasyon reaksiyonunun şematik olarak gösterimi.....	14
Şekil 7. Sortaz A enziminin kataliz ve inhibisyon mekanizması	16
Şekil 8. Sortaz A enzimine yönelik bilimsel çalışmalarda kullanılan inhibitörler	16
Şekil 9. Bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemlerinin genel şeması	20
Şekil 10. Moleküler modelleme yöntemi şeması	24
Şekil 11. S. mutans SrtA enzimine ait aminoasit sekans bilgisi	25
Şekil 12. S. mutans SrtA enziminin 3B yapısı, sekans ve ikincil yapı bilgileri	26
Şekil 13. S. mutans SrtA - Klorheksidin bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi	32
Şekil 14. S. mutans SrtA - ChEMBL3335591 (10 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi	36
Şekil 15. S. mutans SrtA - ChEMBL1395334 (12 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi	37
Şekil 16. S. mutans SrtA - ChEMBL373249 (17 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi	38
Şekil 17. S. mutans SrtA - ChEMBL2180472 (75 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi	39

Şekil 18. S. mutans SrtA - Kurarinon (78 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi	40
Şekil 19. S. mutans SrtA - İzobavakalkon (97 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi	41



KISALTMA, SİMGE VE FORMÜLLER DİZİNİ

KISALTMALAR

AAPD	Amerikan Pediatrik Dişhekimliği Birliği
S. Mutans	<i>Streptococcus mutans</i>
SrtA	Sortaz A
CHX	Klorheksidin
Gtf	Glikozil transferaz
CADD	Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı
MIC	Minimum inhibe edici konsantrasyon
ADMET	Absorbsiyon, Dagılım, Metabolizma, Eliminasyon, Toksitite
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
K_i	İnhibisyon kat sayı sabiti

SİMGELER

Ca²	Kalsiyum	Val	Valin
µm	Mikromolar	Met	Metiyonin
kcal/mol	Kilokalori/mol	Leu	Lösin
g/mol	Gram/mol	Ser	Serin
Å²	Angstrom kare	PRo	Prolin
Cys	Sistein	Ala	Alanin
Arg	Arjinin		
His	Histedin		
Thr	Treonin		
Ile	İzolösin		

ÖZET

Farklı Antimikrobiyal Ajanların *Streptococcus Mutans* Sortaz A Enzimi Üzerindeki Etkinliklerinin Moleküler Modelleme Yöntemi İle İncelenmesi

Diş çürüğü, dünya nüfusunun yarısında görülen önemli ölçüde, ağrı, diş kaybı, yetersiz beslenme ve kaygıya neden olan yaygın bir kronik hastalıktır. Gram-pozitif bakteri *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) diş çürüğünün ana patojeni olarak kabul edilir. *S.mutans* 'ın yüzey proteinlerinden Sortaz A (SrtA) enzimi, biyofilm oluşumu ile ilişkili enfeksiyonların önlenmesi için antimikrobiyal ve çürük önleyici maddelerin geliştirilmesinde potansiyel bir hedeftir. Bu çalışmada, moleküler modelleme yöntemleri kullanılarak *S.mutans* SrtA enziminin inhibisyon mekanizmasının moleküler seviyede aydınlatılması ve temel yapısal özelliklerini ortaya çıkarılması ile mevcut inhibitörlerden daha etkin ve daha az yan etkiye sahip inhibitörlerin belirlenip deneysel çalışmalara ışık tutması hedeflenmektedir. Bu doğrultuda 1. aşamada; hedef enzimin 3-boyutlu yapısı ve inhibitörlerin bağlanma afinitesi gösterebileceği etkileşim bölgeleri belirlenmiştir. 2.aşamada, veri tabanları aracılığıyla *S.mutans* SrtA enzimi inhibisyonuna yönelik kimyasal bileşikler taranmıştır. 3.aşamada taranan bu bileşikler farmakokinetik açıdan değerlendirilmiştir. 4.aşamada; farmakokinetik açıdan uygun olan bileşikler ile hedef enzim yapısı arasında moleküler kenetlenme yöntemi uygulanarak serbest bağlanma enerjisi ve inhibisyon katsayısı hesaplanmıştır. Son aşamada ise, enzim-ligand etkileşim mekanizmasında rol oynayan aminoasitler moleküler seviyede aydınlatılmıştır. Taramalar sonucunda, *S.mutans* SrtA enzimi inhibisyonuna yönelik 102 bileşik belirlenmiştir. *S.mutans* üzerindeki antibakteriyel etkisi bilinen klorheksidin (CHX) pozitif kontrol olarak belirlenmiştir. Yapılan kenetlenme sonuçlarına göre, *S.mutans* SrtA enzimine karşı 6 bileşik (78, 10, 75, 12, 17, 97) pozitif kontrol CHX'in serbest bağlanma enerjisinden (-6.29 kcal/mol) yüksek bağlanma enerjisine sahip olup (sırasıyla, -7.18, -6.59, -6.53, -6.47, -6.43, -6.39 kcal/mol) daha etkin bağlanma afinitesi göstermiştir. Ayrıca bu etkin bileşikler CHX'e göre farmakokinetik açıdan daha uygun bulunmuş ve SrtA enziminin biyolojik aktivitesinde önemli role sahip Arg213 ve Cys205 aminoasitleriyle güçlü bir kimyasal etkileşim oluşturmuşlardır. Bu çalışma sayesinde, çok sayıda kimyasal bileşiğin daha hızlı bir şekilde test edilerek diş çürüğünün önlenmesine yönelik olarak SrtA enzimine karşı daha etkin ve spesifik inhibitörlerinin geliştirilmesine imkân sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Diş çürüğü, enzim inhibisyonu, moleküler kenetlenme, *Streptococcus mutans*, Sortaz A

ABSTRACT

Investigation of the Activity of Different Antimicrobial Agents on *Streptococcus Mutans* Sortase A by Molecular Method

Tooth decay is a common chronic disease that affects half of the world's population significantly causing pain, tooth loss, malnutrition and anxiety. *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), a gram-positive bacteria, is considered the main pathogen of the tooth decay. Sortase A (SrtA) enzyme, one of the surface proteins of *S.mutans*, is a potential target in the development of antimicrobial and caries prevention agents to prevent infections associated with biofilm formation. In this study, by using molecular modeling methods to elucidate the inhibition mechanism of *S.mutans* SrtA enzyme at the molecular level and to reveal its basic structural features, it is aimed to determine the inhibitors that are more effective and have less side effects than existing inhibitors and to shed light on experimental studies. In this direction, in the first stage; the 3-dimensional structure of the target enzyme and interaction sites where inhibitors can show binding affinity were determined. In step 2, chemical compounds for *S. mutans* SrtA enzyme inhibition were screened through databases. In step 3, these compounds that were screened were evaluated for pharmacokinetics. In step 4, the free binding energy and inhibition coefficient were calculated by applying the molecular docking method between the pharmacokinetically suitable compounds and the target enzyme structure. At the last stage, amino acids that play a role in the enzyme-ligand interaction mechanism have been enlightened at the molecular level. As a result of the screening, 102 compounds were identified for *S.mutans* SrtA enzyme inhibition. Chlorhexidine (CHX) with known antibacterial effect on *S.mutans* was determined as a positive control. According to molecular docking results, 6 compounds (78, 10, 75, 12, 17, 97) on *S.mutans* SrtA enzyme had higher free binding energy (-7.18, -6.59, -6.53, -6.47, -6.43, -6.39 kcal/mol, respectively) than positive control CHX (-6.29 kcal/mol) showed more effective binding affinity. In addition, these active compounds were found to be more pharmacokinetically suitable than CHX and formed a strong chemical interaction with Arg213 and Cys205 amino acids, which have an important role in the biological activity of the SrtA enzyme. Thanks to this work enabled the development of more effective and specific inhibitors against the SrtA enzyme for the prevention of tooth decay by testing many chemical compounds more rapidly.

Keywords: Enzyme inhibition, molecular docking, *Streptococcus mutans*, Sortase A, tooth decay

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü, diş sert dokularının mikroorganizmalar tarafından yıkımı ile ortaya çıkan, estetik olmayan görünüme ve fonksiyon kaybına neden olabilen bulaşıcı bir hastalık olup dünyanın birçok ülkesinde önemli halk sağlığı problemlerinden biridir (1, 2). Diş çürüğü etiyolojik olarak biyolojik, çevre ve mikroorganizma nedeniyle oluşan çok faktörlü bir hastalık olup *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) diş çürüğünün primer etiyolojik ajanlarından birisi olarak kabul edilir (3, 4). Bu nedenle son on yılda, çürük oluşumu ile *S.mutans* varlığı arasındaki ilişkiyi anlamak için birçok araştırma yapılmıştır. *S. mutans*, hücre duvarı yüzey proteinleri ve diş plağı yoluyla diş yüzeyine yapışarak, karbonhidratların fermentasyonu ile patojenik asit metabolitleri üretilip, diş dokularının demineralizasyonu ile diş çürüğüne sebep olmaktadır (5, 6).

S. mutans'ın yüzey proteinlerinden Sortaz A (SrtA) enziminin, bakterinin konakçı canlının hücre ve dokularına tutunabilmesine aracılık ederek çürük gelişiminde etkili rol oynadığı bilinmektedir (7, 8). Dolayısıyla *S. mutans* SrtA enzimi, bakterilerin diş yüzeyi ile etkileşimleri sonucunda oluşan biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların önlenmesinde, çürük önleyici antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesi için potansiyel bir hedef haline gelmiştir. Bu amaç doğrultusunda, SrtA enzimine karşı farklı yöntemler kullanılarak geliştirilmiş birçok inhibitör mevcuttur ancak bu inhibitörlerin birçoğunun diş çürüğünün ana patojeni olan *S. mutans* SrtA enzimine yönelik etkinlikleri incelenmemiştir. Ayrıca, bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri bilinse bile, virölans önleme üzerindeki etkileri hala belirsizdir.

Bilgisayar teknolojilerinin hızlı bir şekilde ilerleme göstermesi, biyomoleküler etkileşimlerin moleküler seviyede incelenmesini ve yeni kimyasal moleküllerin tasarımının (türevlendirme veya yeniden tasarım) bilgisayar ortamında yapılmasını mümkün kılmaktadır (9). Özellikle bilgisayar destekli ilaç tasarımı, bileşiklerin etken maddelerinin sentezlenmeden biyoaktiviteleri hakkında bilgi edinilmesine ve laboratuvar ortamında günler alan işlemlerin bilgisayar ortamında daha güvenilir şekilde ve zaman tasarrufu sağlanarak kimyasal ve biyolojik yönden incelenmesine olanak sağlamaktadır (9, 10). Bu sayede, disiplinler arası bilgiler kombine halde kullanılarak hücresel mekanizmada rol oynayan biyomolekül yapılar ve ilaç etken maddesine sahip kimyasal bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik etkileri arasındaki ilişkiler belirlenerek klinik çalışmalara ışık tutulmaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan bu çalışmada, çeşitli antimikrobiyal ajanların bilgisayar destekli moleküler modelleme yöntemleri ile incelenerek, *S.mutans* SrtA enziminin inhibisyon mekanizmasının daha iyi anlaşılması ve temel yapısal özelliklerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu sayede enzimin görev aldığı hastalıkların tedavisine yönelik önemli katkıların sağlanması hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Diş Çürüğü

Diş çürüğü; spesifik oral bakterilerin fermente olabilen diyet karbonhidratları ile etkileşimleri sonucunda açığa çıkan organik asitlerin, diş sert dokularını çözmesi olarak meydana gelen kronik, enfeksiyöz bir hastalıktır (11). Çürük ilk olarak dişin inorganik kısımlarının dekalsifikasyonu ile başlar ve bu süreç devam ederse dişin organik kısmının yıkımı gerçekleşir (2)

Amerikan Pediatrik Dişhekimliği Birliği'nin (AAPD) raporuna göre, ağız ve diş hastalıkları özellikle çocukları etkilemeye devam etmektedir (12). Süt dişlenme dönemindeki diş çürükleri önlenabilir ve geri dönüştürülebilir bir hastalık sürecidir. Fakat tedavi edilmediği takdirde ağrı, bakteriyemi riski, büyüme ve gelişim geriliği, konuşma bozuklukları, erken diş kaybı ve bunlara bağlı olarak ortaya çıkan çiğneme bozuklukları, özgüven kaybı ve daimî dentisyonun zarar görmesi şeklinde sonuçlanabilir (13).

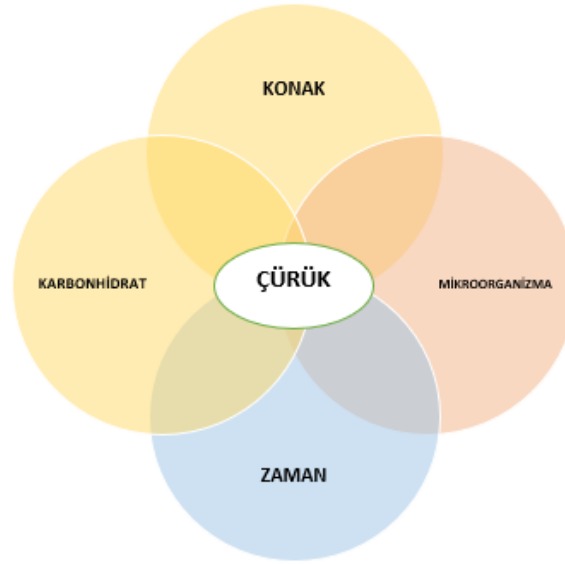
2.1.1 Epidemiyoloji

Diş çürüğü, çocukluk çağıının en sık görülen kronik hastalığı olup, astımdan beş kat, saman nezlesinden yedi kat daha fazla görülen ve okul çocuklarının %60-90'ını etkileyen enfeksiyöz bir diş hastalığıdır (14, 15). Diş çürüklerinin yaygınlığı, gelişmiş seviyedeki ülkeler ile sosyoekonomik seviyesi düşük ülkeler arasında oldukça farklılık gösterirken, yaygın diş çürüğüne sahip bireyler genellikle düşük sosyoekonomik seviyeye sahiptir. Bireylerin diş çürüğüne eğilimleri hayat tarzları, koruyucu önlemlere uyup uymamaları ve genetik farklılıklar tarafından da etkilenmektedir (6, 16).

2.1.2 Etiyoloji

Diş çürüğünün oluşumu için gerekli faktörler günümüze kadar çeşitli şekillerde şematize edilmiştir. Çürük etkenleri özetle venn şemasında gösterilmektedir (**Şekil 1**) (17).

1. Konak
2. Mikroflora
3. Karbonhidrat
4. Zaman



Şekil 1. Diş çürüğü oluşumunda rol oynayan faktörler

Temel olarak 4 etken üzerinde durulsa da günümüzde diş çürüğünün multifaktöriyel bir hastalık olduğu ve oluşumunda genetik ve sosyokültürel faktörler, davranışsal ve çevresel faktörler, oral hijyen alışkanlıkları ve florid kullanımı, bağışıklık sistemi, dişin yüzey özellikleri, tükürük kalite ve miktarı gibi birçok faktörün rol oynadığı kabul edilmektedir (4, 15).

2.1.3 Patogenezi

Diş çürükleri diş mineralleri ve oral mikrobiyal biyofilm tabakası arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (18). Diş çürüğü oluşum mekanizması tüm çürüklerde benzerdir. Endojen bakteriler (*Streptococcus* ve *Lactobacillus*) fermente edilebilir karbonhidratların metabolizmasının bir yan ürünü olarak zayıf organik asitler üretirler. Bu asit lokal pH değerinin kritik bir değerin altına inmesine ve diş dokusunun demineralizasyonuna neden olur.

Diş çürüğünün ilerlemesi, durması veya tekrarlaması demineralizasyon ile remineralizasyon arasındaki dengeye bağlıdır. Demineralizasyon ile remineralizasyon arasındaki süreç gün boyu devam eder. Zamanla bu süreç ya kavite ya lezyonun iyileşmesi ile sonuçlanır (19). Çürük gelişimi mikrobiyal olarak; ilk evrede, *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) ile primer enfeksiyon; ikinci evrede, *Streptococcus mutans* ve diğer asidürik mikroorganizmaların dental plakta yüksek oranda birikimi sonucunda oluşan

mikrobiyal değişim; son evrede ise, minenin demineralizasyonu ve kavitasyonu olmak üzere üç evrede gerçekleşir.

2.2 Oral Flora

Oral kavite; dişler, dişeti, dil, yanaklar, sert ve yumuşak damak ve bademcikler dahil olmak üzere; yoğun biçimde bakteriler ile kaplanmış geniş bir yaşam alanı içerir (20). Ağız florası, 700'den fazla farklı bakteri türünün yaşadığı insan vücudunun en karmaşık mikrobiyal topluluklardan biridir (21). Diş plağı, içeriğinde çok sayıda mikroorganizma, protein ve polisakkaritler bulunduran yapışkan karakterli bir yapıdır ve oral florada yer alan karyojenik bakterileri barındırır. Diş çürüğü ve periodontal hastalıklar diş plağına bağlı olarak gelişmekte ve mikroorganizmalar ile konak arasındaki normal dengenin bozulmasıyla meydana gelmektedir (22).

Son zamanlarda insan oral floranın yapısı, işlevi ve çeşitliliği ile ilgili yapılan çalışmalarda, oral mikrofloranın bireye özgü olduğu açıkça gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerin bile yerleşik oral florası önemli şekilde farklılık gösterir. Bu çeşitliliğin nedeni tam anlaşılamamış olsa da diyet, çevre, genetik ve erken mikrobiyal maruziyetin rol aldığı düşünülmektedir (23). Sağlıklı bireylerin ağız ortamında bulunan mikroorganizmalar **Tablo 1**'de gösterilmektedir (22).

Tablo 1. Oral mikroflora üyeleri

Gram-pozitif		Gram-negatif		
Kok	Çomak ve Filamanlar	Kok	Çomak ve Filamanlar	
Abiotrophia Enterococcus Micromonas Peptostreptococcus Streptococcus Staphylococcus Stomatococcus	Actinomyces Bifidobacterium Corynebacterium Eubacterium Lactobacillus Propionibacterium Pseudoramibacter Rothia	Moraxella Neisseria Veillonella	Actinobacillus Haemophilus Bacteroids Johnsonii Campylobacter Leptotrichia Cantonella Prophyromonas Capnocytophaga Prevotella	Eikenella Treponema Fusobacterium Wolinella Cantipedia Selenomonas Desulphovibro Simonsiella Desulphobacter Tannarella

2.3 Çürük Mikrobiyolojisi

Leeuwenhock 1683'te mikroskop altında ilk kez dental plakta mikroorganizma varlığını gözlemlemiştir (24). Bu mikroorganizmalardan bazılarının, çürük ve dişeti hastalıkları gibi iki önemli ağız hastalığından sorumlu oldukları bilinmektedir (25). 1960'larda Keyes ve arkadaşları diş çürüğünün bulaşıcı, enfeksiyöz bir hastalık olduğunu deney hayvanları üzerinde göstermişlerdir (26, 27).

Çürük etiyojisiyle ilgili ilk ortaya atılan hipotez spesifik olmayan plak hipotezi olup, tüm plağın patojen olduğunu savunur. Bunun üzerine Loesche spesifik/alternatif plak hipotezini öne sürmüş ve bu hipotezinde sadece hastalık varlığında plağın patojen kabul edilebileceğini savunmuştur (28, 29). Günümüzde geçerli olan Phillip D. Marsh tarafından yaratılan ekolojik plak hipotezi ise ekolojik stres nedeniyle toplam mikrofloradaki dengenin bozulacağını ve bunun sonucu olarak hastalığın oluşacağını savunmaktadır (30, 31). Tek patojen hipotezi ise diş çürüklerinin nedeni olarak tek bir organizmayı, özellikle *S. mutans*'i işaret eder. Ekolojik plak hipotezi günümüzde büyük ilgi görse de bu hipotez de çürüğün önlenmesi açısından kritik olmaya devam etmektedir (32).

Diş çürüğünün oluşmasından başlıca sorumlu olan Mutans Streptokoklar ve Laktobasiller dişlere yapışır, asit üretirler (asidojeniktirler) ve asitli ortamda yaşayıp fonksiyon görebilirler (asidüritirler) (17). Bu karyojenik bakteriler, diş çürüğünün gelişim sürecinde farklı patojenik özelliklere sahiptir. Mutans Streptokokların esas olarak diş çürüğünün başlamasından, Laktobasillerin başlamış olan çürük lezyonunun ilerlemesinden sorumlu oldukları bilinmektedir (7, 33).

2.3.1 Oral Streptokoklar

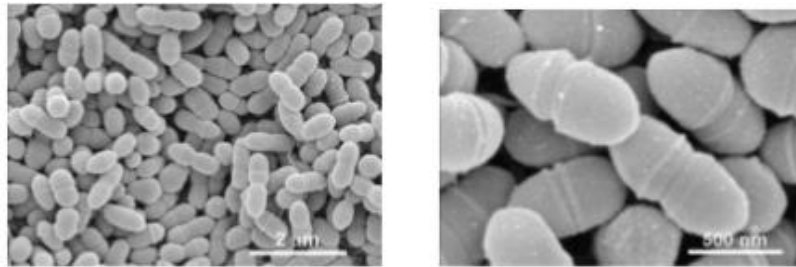
Streptokoklar, ağız mikroflorasının büyük bir kısmını oluşturan ve ağız içerisindeki tüm bölgelerden izole edilebilen mikroorganizmalardır. Yuvarlak veya oval şekilli 0.5-2 µm çapında kok türü bakterilerdir. Gram pozitif karakterde olan streptokoklar, besinden zengin bir ortamda, optimum sıcaklıkta (37 °C) ürerler. Metabolizmaları fermantatif olup başlıca laktat üretirler. Oral streptokoklar 4 ana grupta incelenmektedir (34-38). Bu gruplar **Tablo 2'**de gösterilmektedir.

Tablo 2. Oral florada bulunan streptokokların sınıflandırılması

GRUP	TÜR
Mutans Grubu Streptokoklar	S. mutans, serotip c, e, f, k S. sobrinus, serotip d, g, h S. cricetus, serotip a S. rattus, serotip b S. ferus S. macacae S. downei, serotip h
Salivarius Grubu Streptokoklar	S. salivarius S. vestibularis
Anginosus Grubu Streptokoklar	S. constellatus S. intermedius S. anginosus
Mitis Grubu Streptokoklar	S. sanguinis S. gordonii S. parasanguinis S. oralis S. mitis S. crista

2.3.1.1 *Streptococcus Mutans (S. Mutans)*

1924 yılında İngiltere’de doktor J.K Clark tarafından bir çocuk dişindeki çürük lezyonundan *Streptococcus* izole edilmiş ve gram boyamada daha oval gözüken bu streptokoklara mutant anlamında *Streptococcus mutans (S.mutans)* demiştir (3). Kapsamlı taksonomik çalışmalar bu organizmaların, hareketsiz, kapsülsüz, katalaz ve oksidaz yanıtları negatif, gram pozitif, 0.5-0.75 µm çapında kısa-orta zincirler halinde bulunan, kok şekilli bakteriler olduğunu göstermiştir (**Şekil 2**) (33, 39-42).



Şekil 2. *Streptococcus mutans* kolonilerinin elektron mikroskop görüntüleri (34)

Yapılan serolojik çalışmalarda, hücre duvarındaki karbonhidrat antijenlerine göre 8 serotipe ve şu ana kadar izole edilmiş olanlar da 7 türe ayrılırlar. Bu türler; *S. mutans* (serotip c, e, f), *S. cricetus* (serotip a), *S. rattus* (serotip b), *S. ferus* -*S. macacae* (serotip c), *S. sobrinus* (serotip d, g, h), *S. downei* (serotip h)'dir. İnsanda en fazla görülen %70-100 oranında *S. mutans*'ın c serotipidir (5, 34, 43, 44).

Streptococcus mutans normal ağız ve boğaz florasının bir üyesidir. Bütün *S. mutans* serotipleri çürüğün önemli potansiyel sebebi olarak gösterilmektedir. Asidojenik ve asidürik olan *S. mutanslar*, hücre duvarı yüzey proteinleri aracılığıyla dış yüzeyine yapışıp mannitolü ve sorbitolü fermente ederek asit üretebilmekte ve süktrozdan özellikle glukoz olarak suda erimeyen hücre dışı polisakkaritler sentezleyebilmektedir. Bu polisakkaritler, diş plağı olarak da bilinen biyofilm tabakasının oluşmasında dolayısıyla diş çürüğünün patogeneğinde kritik bir öneme sahip olarak kabul edilmektedir (7, 17, 25, 43).

2.3.1.1.1 *Streptococcus Mutans*'ın Diş Çürüğündeki Önemi

Birçok epidemiyolojik çalışma sonucunda bebeklerdeki biberon çürükleri, çocuklar ve genç erişkinlerde mine çürükleri ve yaşlılardaki kök çürüklerinin birinci sıradaki etkeninin *S. mutans* olduğu tespit edilmiştir (43). Beyaz nokta lezyonlarından ve çürük başlangıcı görülen dişlerden alınan plak örneklerine bakıldığında *S. mutans* ile diş çürüğü arasında önemli bir ilişki olduğu görülmüştür (45-47).

Diş yüzeyinde ilk kolonize olan mikroorganizma olmamasına rağmen, Loesche, *S. mutans* bakterisinin diş çürüğü üzerindeki rolünü kapsamlı olarak araştırmış ve *S. mutans*'ın fissürlerde ve düzgün mine yüzeylerinde diş çürüğünün başlamasında çok önemli bir rol oynadığını belirtmiştir (43).

Dünya genelinde tüm insanlarda ırk, etnik köken veya coğrafik durum göz önüne alınmaksızın *S. mutans* mevcuttur (34, 48). Önceki yıllarda yapılan çalışmalara göre *S. mutans*'ın kolonize olmak için sert yüzeylere ihtiyaç duyduğu, bu yüzden bebeklerde diş sürmesinden önce bulunmadığı bildirilmiştir (49). Ancak Rosenblatt ve arkadaşlarının yeni doğanlarda yaptığı çalışmada, ilk 48 saat içerisinde oral kavitede *S. mutans* görüldüğü bildirilmiştir (50). Tanner ve arkadaşları ise 6-18 aylık 57 bebekle yaptığı çalışma sonucunda plak örneklerinin %55'inde, dilden alınan örneklerin %70'inde *S. mutans* görüldüğünü bildirmiştir (51).

*Streptococcus mutans*lar, 19-31. aylarda, süt dişlerinin belirmesiyle birlikte kolonize olmaya başlarlar (52). Kolonizasyon yaş ve sert yüzeylerin artması ile sürmekte olan dişlere yayılmayla birlikte artar. Ayrıca, diş yüzeyi kadar dil yüzeyi de mikroorganizmalar için bir rezervuar görevi görür (21). Okul öncesi çağıdaki çocuklar arasındaki *S. mutans* prevalansı % 2.5 ile %13.7 arasında değişmektedir. Yapılan çalışmalar, erken dönemde *S. mutans* kolonizasyonu engellenirse ileri dönemlerde çürük riskinin önemli miktarda azalacağını bildirmektedir (49, 53, 54).

2.3.1.1.2 *Streptococcus Mutans*'ın Metabolik Aktivitesi ve Virülansı

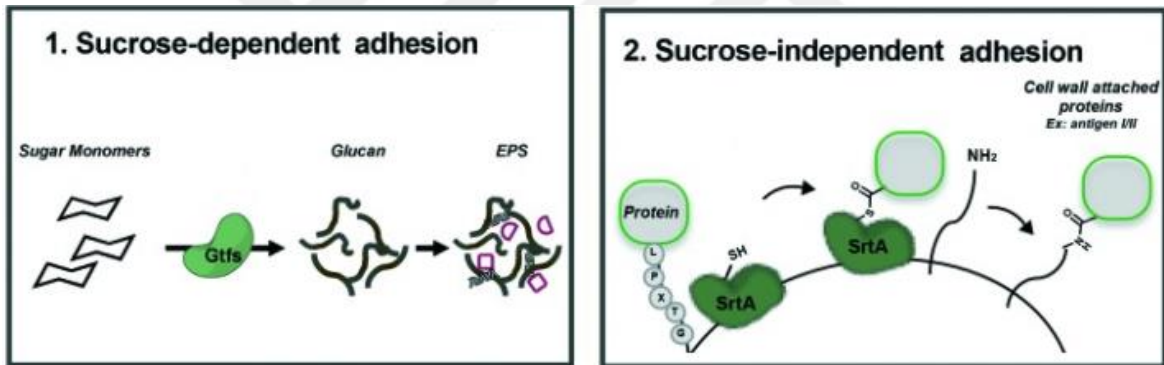
Virülans, bir mikroorganizmanın konakta hastalığa yol açabilecek özelliklere sahip olmasıdır. Virülans faktörleri, konakçı dokuların istilaları, biyofilm oluşumu, bağışıklık sisteminden kaçış, bakteriyel patogeneze, yapışma ve bulaşıcılığa aracılık etmede önemli roller oynamaktadır (8, 55). Hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakteriler bu nedenle çok sayıda hücre duvarı proteini ve protein kompleksi içermektedir (56).

*Streptococcus mutans*ların diş yüzeyini çevreleyen dental plağın içerisinde yaşayabilmelerini ve kolonize olabilmelerini sağlayan virülans faktörleri; sahip oldukları hücre yüzeyi proteinlerinin aracılığı ile diş yüzeyine yapışabilmeleri (adezyonu), asidojenik ve asidürik olmaları, ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkarit sentezi yapabilmeleri, suda erimeyen glukan ve fruktan polimerlerinin sentezini kataliz eden glukozil transferaz (Gtf) ve fruktozil transferazlara (Ftfs) sahip olmaları şeklinde sıralanabilmektedir (57).

*Streptococcus mutans*ların diş yüzeyine adezyonları ve ekstrasellüler matriks içerisinde mikrokoloniler oluşturabilmeleri, patojenik biyofilmin oluşmasında ve gelişiminde kritik öneme sahiptir. Karbonhidrattan zengin besinlerin (özellikle şeker ve nişasta) sık tüketilmesi ile bu patojenik biyofilmin diş yüzeyleri üzerinde kalmaya devam etmesi sonucu, *S. mutans* glukan sentezlemeye ve şekeri organik asitlere metabolize etmeye devam edecektir (58). *S. mutans*'ın asit toleransı, *Lactobacillus* gibi diğer aside toleranslı türlerin birikimini de artıracaktır. Bu birikim ortamda asit üretim ve asidifikasyon miktarının artmasını sağlayacak kritik plak pH'nın normalden daha hızlı düşüşüne neden olacaktır. Bu düşük pH ortamı mine yüzeyinin hızla çözünmesine sebep olmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında, araştırmacılar *S. mutans* 'ın adezyon, asit üretme ve aside tolerans özelliklerine odaklanmaktadır (59, 60).

2.3.1.1.3 *Streptococcus Mutans*'ın Dış Yüzeyine Adezyonu

Bakterilerin konak doku yüzeyine bağlanmaları ve ekstraselüler matriks içerisinde mikrokoloniler oluşturmaları, patojenik biyofilmin oluşmasında ve gelişiminde kritik öneme sahiptir. *S. mutans*, tükürük ile kaplı yüzeylere özel bakteriyel adezinler ve spesifik pelikül proteinleri aracılığıyla tutunabilmektedir (61). *S. mutans*'ın dış plağı içine adezyonu sü kroza bağlı ve sü krozdan bağımsız olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir (**Şekil 3**) (62). Sü krozdan bağımsız yapışma, dış yüzeyindeki tükürük bileşenlerine bağlanma sürecini başlatır, ancak sü kroza bağlı yapışma, dış yüzeyinde kolonizasyon oluşturmaktan esas olarak sorumlu olabilmektedir. *S. mutans*'ın sü krozdan glukan sentezleme yeteneği, yapışma verimini arttırarak, diğer oral streptokok, laktobasillus ve aktinomiçes türleri dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların dış plağı içindeki kolonizasyonunu arttıracaktır (60, 63, 64).



Şekil 3. *Streptococcus mutans*'ın adezyon mekanizması (54)

2.3.1.1.3.1 Sükroz Bağımlı Adezyon

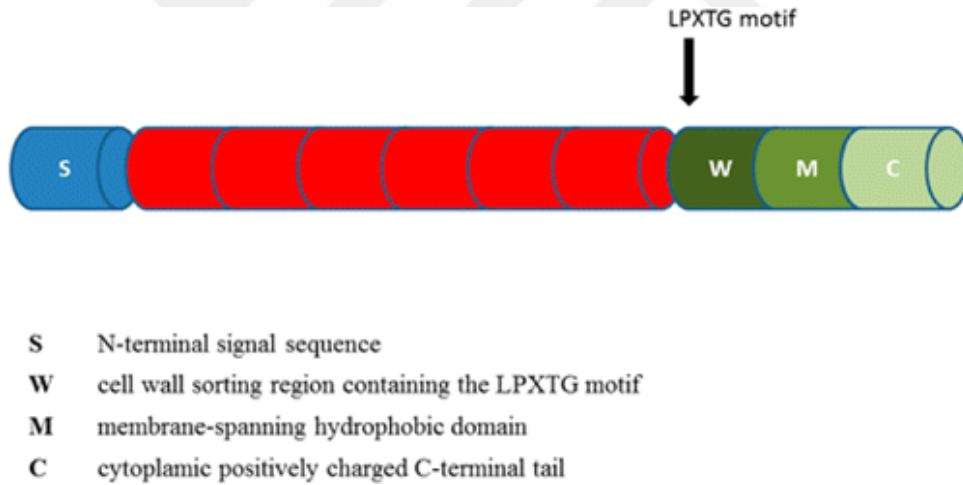
Glikozil transferazların (Gtf) glukanların sentezindeki etkisi, sü kroza bağlı yapışmanın arkasındaki temel mekanizmadır (65). Bu enzimler, büyüme koşullarında sü kroz mevcut olduğunda biyofilm oluşumu ve virülans için gereklidir. *S. mutans*, gtfB, gtfC ve gtfD tarafından kodlanan üç gtf'ye sahiptir. Tüm gtf'ler hem suda çözünür hem de suda çözünür olmayan glukanları sentezler. Bu polimerler, özellikle suda çözünmeyen glukanlar, plak biyofilm matrislerinin ana bileşenleridir (7, 66, 67).

Glukanın *S. mutans*'ın yapışmasını kolaylaştırma kabiliyetinin, hem tükürük zarıyla hem de diğer bakterilerle hidrojen bağı yapabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir

(68). Glukan daha önce süktrozdan bağımsız yollarla yapılmış olan *S. mutans* veya başka oral streptokoklar tarafından sentezlenebilir. *S. mutans*'ın neden birden fazla Gtf'ye ihtiyaç duyduğu bilinmemektedir, ancak farklı Gtf'lerin bakteri yüzeyi veya tükürük pelikülü için farklı afinitelere sahip olduğuna ve her birinin belirli bir oranının optimal süktroza bağlı adezyonu için gerekli olduğuna dair mevcut kanıtlar bulunmaktadır (35, 60, 69).

2.3.1.1.3.2 Süktrozdan Bağımsız Adezyon

Konakçı dokuya yapışma, bakteriyel virülans için kritik bir adımdır ve hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakteriler çok çeşitli hücre duvarı proteinleri ve protein komplekslerini içermektedir (56, 70). Gram-negatif bakterilerde pili yapışmada önemli bir rol oynarken, gram-pozitif bakteriler adezyon için, pilin bileşenlerine benzer yapısal motiflere sahip proteinleri içerir. Bu proteinler "yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri" olarak adlandırılmaktadır (**Şekil 4**) (71).



Şekil 4. Yüzey proteinlerinde ve pili bileşenlerinde bulunan ortak yapısal bileşimler (71)

S. mutans, süktroz yokluğunda bile kolonizasyonu mümkün kılan çok sayıda yüksek afiniteli yüzey adezinine sahiptir. Çoğu oral streptokokta benzer proteinler bulunur ve bunlar P1, WapA, GbpA, (GbpC), eDNA, BrpA, Psr ve antijen B olmak üzere çeşitli isimlerle belirtilmektedir (60, 67, 72). En çok incelenen adezinlerden biri, aynı zamanda P1, SpaP veya PAc olarak da bilinen ikili Antijen I / II'dir. Bu yapısal olarak karmaşık çok fonksiyonlu

adhezin, konak reseptörlerinden GP340 veya DMBT-1 ile etkileşim yoluyla tükürük zarına yapışmaya aracılık etmektedir (67).

Yüzey proteinleri fibrinojen, fibronektin ve kollajen gibi önemli konakçı hücre dışı proteinlerini bakteri hücre duvarındaki peptidoglikana, bir transpeptidaz enzimi olan Sortaz A enzimi ile kovalent olarak bağlanarak tanınmaktadır (70).

2.4. Sortaz Enzimleri

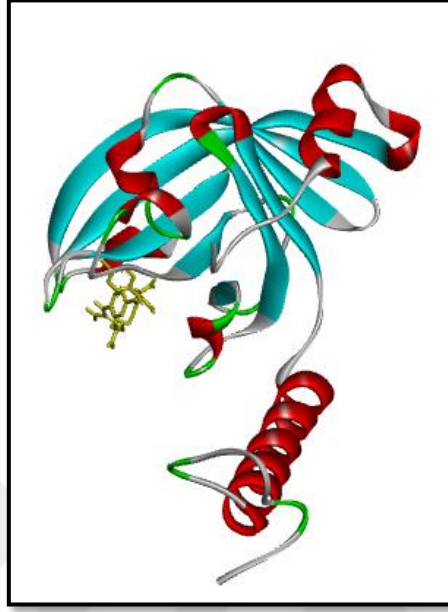
Sortaz enzimleri çoğu gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında yer alan transpeptidaz ailesinin bir üyesidir. Bakterinin dokuya kovalent bağlantısını düzenleyen bu enzim grubu Sortaz A, B, C ve D olmak üzere 4 sınıftan oluşmaktadır (73, 74). Sortaz enzimleri bakterinin yaşaması için gerekli değildir ancak patogeneizde önemli rol oynamaktadırlar. Özellikle sortaz A enzimi, tüm gram-pozitif bakterilerde korunmuş olup *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakterilerin enfeksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır (8, 75).

Farklı bakteri türleri farklı sayıda ve farklı çeşitte sortaz enzimlerine sahiptir. Örneğin; *S. aureus* Sortaz A ve Sortaz B enzimlerine sahipken *S. pneumoniae* 4 farklı Sortaz enzimine sahiptir (76, 77). *S. aureus*, *S. mutans* ve diğer birçok gram-pozitif patojenin virülanslığında hücre dışında yer alan bu enzimlerin birinci derecede katkısı bulunmaktadır. Bunlar arasında Sortaz A tüm gram pozitif bakterilerde bulunmakta ve patojenitede önemli rol oynayan LPXTG motifi içeren proteinlerin hücre duvarına bağlanmalarını sağlamaktadır (74, 75, 78).

2.4.1 Sortaz A (SrtA) Enzimi

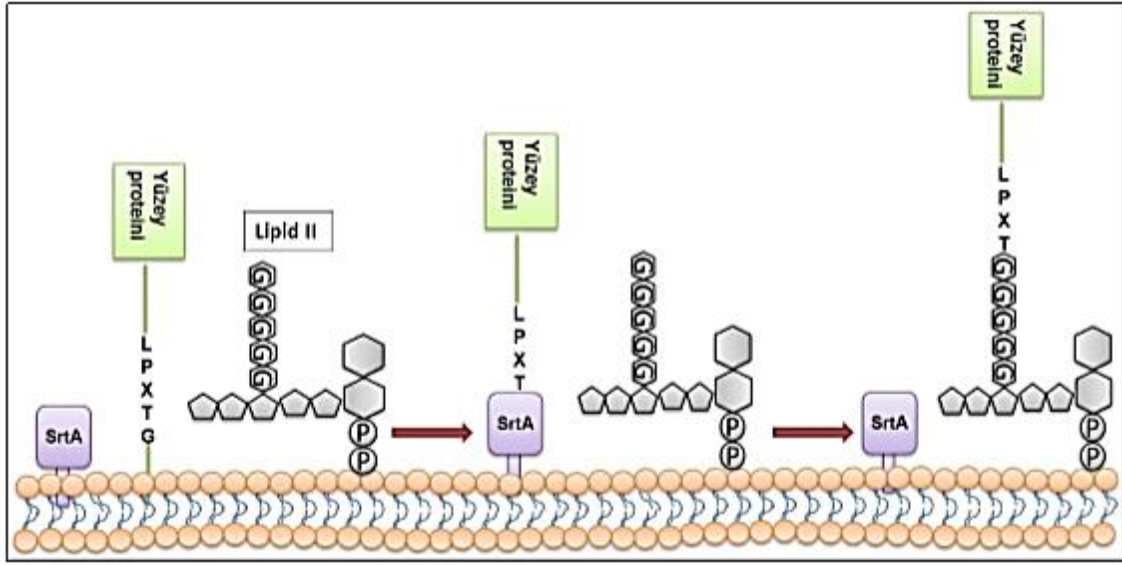
Sortaz A (SrtA), gram-pozitif bakterilerin birçok virülans faktörünün hücre duvarı üzerine kovalent bağlanmasından sorumlu, membran ile ilişkili bir sistein transpeptidaz enzimidir (8). İki kısa sarmal ve birkaç döngü içeren korunmuş sekiz β ipliği içerir. Bu protein, bir katalitik alan ve N-terminalinde bulunan santral transmembran alanından oluşur (**Şekil 5**). Enzimin aktif bölgesi $\beta 6$ ve $\beta 7$ pili tabakalarından oluşan hidrofobik kısımda yer almaktadır (55). *S. mutans*'ın SrtA enziminin aktif bölgesinde, enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu olan sistein 205 (Cys205), arjinin 213 (Arg213) aminoasitleri bulunmaktadır. Cys205 aminoasiti enzim aktivitesinde önemli rol oynamakta olup micheal addition tepkime reaksiyonu ile kovalent bağ yapma özelliğine sahiptir. Katalitik alan kısmındaki (Cys-His-Arg) bölgesi oldukça korunmaktadır (8, 79). NMR (nükleer manyetik rezonans) sonuçlarına

göre ortamda bulunan Ca^{+2} iyonunun, iyon bağlayıcı bölgedeki konformasyonu değiştirerek enzimin katalitik aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (70, 74, 79-81).



Şekil 5. Sortaz A enziminin 3-boyutlu kristal yapısı (Bobinler yeşil, sarmallar mavi, heliksler kırmızı, ligand yapısı sarı renkte belirtilmiştir)

Sortaz A transpeptidasyon reaksiyonunu katalizleyerek yüzey proteinlerinin bakterilerdeki peptidoglikana tutunmasını sağlamaktadır. SrtA enzimleri bu mekanizmada hücre membranında yer alan yüzey proteinlerinin C-terminalinde korunmuş bir beş aminoasit dizisini (LPXTG) tanır ve aktif bölgede yüksek oranda korunmuş sistein kalıntısı kullanarak treonin ve glisin arasındaki amid bağını ayırır (79). Daha sonra karboksil terminalindeki treoninin, hücre duvarında yer alan lipid II'nin pentaglisin çapraz köprüsünün serbest amino terminali arasında kovalent bağ oluşturur (8, 55). Son olarak, lipid II-yüzey protein kompleksi, transglikolizasyon ve transpeptidasyon reaksiyonları yoluyla peptidoglikana dahil edilir ve bu hücre duvarı adezyonunda rol oynar (**Şekil 6**). Böylece yüzey proteinleri, bakterinin konakçı canlının hücre ve dokularına tutunabilmesini, bağışıklık sisteminden kaçabilmesini böylece enfeksiyona neden olmasını ve biyofilm oluşturabilmesini sağlamaktadır.



Şekil 6. Sortaz A enziminin transpeptidasyon reaksiyonunun şematik olarak gösterimi (81)

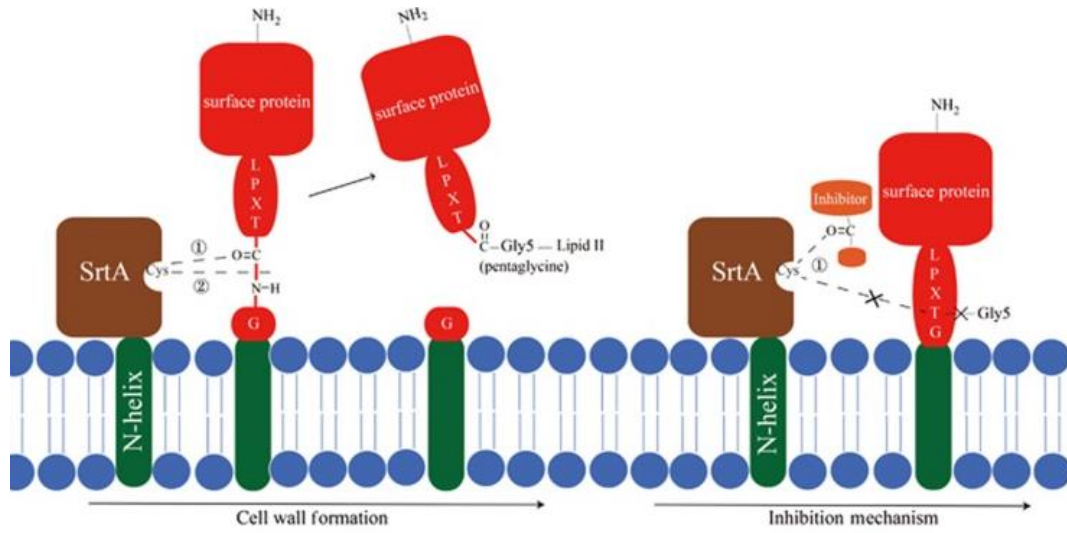
Yapılan bir dizi çalışma, SrtA'nın delesyonundan (eksiklik) sonra, yüzey proteinlerinin (Pac, Dex ve GpbC) çoğunun santrifüjlemeden sonra süpernatanda görüldüğünü, ancak hücre duvarındaki varlıklarının azaldığını göstermiştir (82). Ayrıca, yapılan bir diğer çalışma sonucunda, SrtA eksikliği olan *S. mutans*'ın ağız mukozasına ve dişlere yapışma yeteneğinin engellenmesi sonucu düşük biyofilm biyokütlesi sergileyerek çürük oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (83). Sonuç olarak SrtA, *S. mutans* ile konakçı arasındaki etkileşimde önemli bir role sahiptir ve SrtA aktivitesinin inhibe edilmesi, diş çürümelerini önlemek veya tedavi etmek için antimikrobiyal ve çürük önleyici ajanların geliştirilmesinde potansiyel bir hedef görevi görmektedir.

2.4.2 Sortaz A Enzimine Yönelik İnhibitörlerin Geliştirilmesi

Bakteriyel canlılığın bakterisit bileşikler tarafından bozulması veya büyüme döngüsünün bakteriyostatik ajanlar tarafından inhibe edilmesi, ilaca dirençli popülasyonların hızlı bir şekilde artmasına yol açmıştır (75). Bu sebeple, bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmak için yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Bunlar bakterinin canlılığından ziyade virülans faktörlerinin inhibisyonuna dayanan yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyel yapışmanın engellenmesi, dış çürüğü ile mücadelede ideal bir stratejidir, çünkü ağız boşluğu içindeki ekolojik denge bozulmadan biyofilm oluşumu önlenmektedir (84).

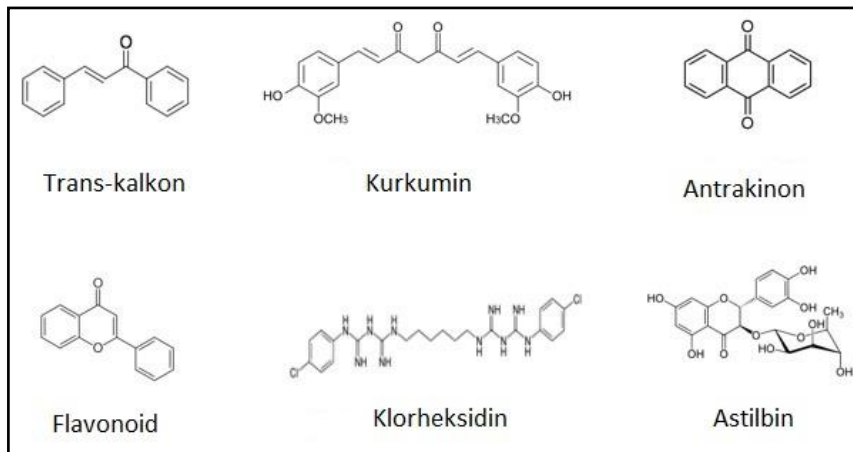
Dış çürüğünü önlemede yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesi için hedef olarak SrtA'nın seçilmesinin sebebi, *S. mutans*'ın virülansında sahip olduğu kilit rolün yanı sıra ve mikrobiyal canlılığa etki etmeden yalnızca biyofilm oluşumunu azaltarak hareket etmesi ve bu sayede dirençli bakteri türlerinin gelişmesine yol açabilecek hiçbir seçici baskı uygulamamasıdır (85). Aynı zamanda, bu enzimin hücre duvarında bulunması, inhibitörlerin bakteri hücresinin içine girmesine gerek olmadığı anlamına gelir ve bu da yeni bir inhibitör için farmakokinetik gereksinimleri azaltmaktadır (86). Tüm bu durumlar, dış hekimliğinde SrtA'ya karşı etkili bir inhibitör geliştirilmesini popüler bir çalışma konusu haline getirmektedir.

İnhibitörler, SrtA'nın etkinliğinde önemli bir role sahip olan olan Cys205 aminoasiti ile aralarında hidrojen bağları veya Michael tepkimesi oluşturup, SrtA'nın yüzey proteinlerinin LPXTG motifini tanımasını engelleyerek etki göstermektedirler. Böylece yüzey proteinlerinin hücre duvarı adezyonu engellenmiş olur (Şekil 7) (8).



Şekil 7. Sortaz A enziminin kataliz ve inhibisyon mekanizması (8)

Günümüzde SrtA inhibitörlerinin çeşitli sınıfları tanımlanmıştır ve bunlar arasında sentetik küçük moleküller (70, 76, 87, 88) rasyonel tasarımı ligand, peptid analogları (88, 89) ve bitkilerden elde edilen doğal ürünler (90-92) yer almaktadır. Bunlardan en sıklıkla kullanılanları; trans-kalkon (79), kurkumin (93), klorheksidin (94) ve flavonoid (95, 96) bileşikleridir (**Şekil 8**). Flavonoidler polifenolik bitkisel doğal ürünlerdir ve *S. mutans*'ın SrtA enzimine karşı iyi inhibisyon sergilemektedir (91, 95, 96).



Şekil 8. Sortaz A enzimine yönelik bilimsel çalışmalarda kullanılan inhibitörler

Antibakteriyel aktivite bu bileşiklerin birçoğu için bilinse bile, virülans önleme üzerindeki etki mekanizmaları hala tam olarak açıklanamamaktadır. Ayrıca bu inhibitörlerin seçiciliklerinin ve inhibisyon özelliklerinin yeteri kadar iyi olmaması da antimikrobiyal ajan olarak kullanımlarını sınırlandırmaktadır (97). Bu nedenle, enzimin etkinliğinde kritik role sahip aminoasitlerin moleküler seviyede aydınlatılarak buna yönelik seçici inhibitörlerin tasarlanması büyük önem taşımaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan bu tez çalışmasında, *S.mutans* SrtA enziminin inhibisyon mekanizmasını daha iyi anlamak ve temel yapısal özelliklerini ortaya çıkarmak için yeni antimikrobiyal ajanların moleküler modelleme yöntemi ile geliştirilmesi ve bu sayede diş çürüğü tedavisine yönelik önemli katkıların sağlanması amaçlanmıştır.

2.4.2.1 Klorheksidin (CHX)

Klorheksidin gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler, bazı mantar ve virüsler de dahil olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı çok çeşitli antimikrobiyal aktivite gösteren katyonik bir bisbiguanid ajandır (94). Etkisini bakteri hücre zarının yapısını değiştirip hücre içi ozmotik dengeyi bozarak göstermektedir (98, 99). İlk olarak 1953 yılında antiseptik ajan olarak klinik tıbbı girmiştir. Diş hekimliğinde sıklıkla oral hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılırken, dental plağı önlemede altın standart olarak kabul edilmektedir (94, 100). CHX Klinik diş hekimliğinde ağız gargarası, sprej jel ve cila formunda yaygın olarak kullanılmaktadır (101).

Klorheksidin dil, diş, mukoza gibi oral dokular tarafından absorbe edilmesi sayesinde uzun süreli antimikrobiyal etkinlik göstermektedir (102). Klorheksidin jelinin çürük önleyici etkinliğinin değerlendirildiği klinik çalışmalarda, oral florada yer alan bakterilerin azaltılması ve plak oluşumunun kimyasal kontrolü sayesinde çürük oluşumunu %68'e varan oranlarda önlediği aynı zamanda diş eti iltihabını azalttığı birçok çalışmada bildirilmektedir (103-105). Klorheksidin, *S. mutans*'a karşı kanıtlanmış antibakteriyel etkinliğinin bulunması nedeniyle, yeni materyallerin antibakteriyel etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda kontrol grubu olarak kullanılmaktadır (101, 106).

Bununla birlikte, CHX'in uzun süreli (2 haftadan fazla) ve yüksek konsantrasyonda (>%0,2) kullanımı dil, dişler, oral mukoza ve restorasyonlarda kahverengi lekelenmelere ve tat duyusundaki değişime neden olmaktadır (107, 108). Ayrıca yine zaman ve doza bağlı olarak insan hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstererek nekrotik hücre ölümüne sebep

olabilmektedir (99). Bu sebeple dental plağın önlenmesine yönelik çalışmalar, CHX'in potansiyel yan etkilerinden kaçınmak için daha az sitotoksik, biyouyumlu, kimyasal olmayan doğal ürünlerin keşfine doğru yönelmiştir.

2.4.2.2 Kalkonlar

Bitkilerde oldukça yüksek miktarda bulunan tüm flavonoid gruplarının öncü bileşiği olan kalkonlar kimyasal olarak üç karbonlu α,β - doymamış karbonil köprüsü ile iki aromatik halka içeren, genellikle trans formunda bileşiklerdir (109). Doğal olarak bitkilerden izole edilebilen kalkonlar sentetik olarak da sentezlenebilmektedir. Kalkonların antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser, antiinflamatuvar ve antihistaminik gibi biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır (110, 111). Geniş biyolojik aktiviteleri ve de pek çok sentez reaksiyonunun başlangıç bileşiği olarak kullanılabilmesi sebebiyle son zamanlarda literatürde kalkonların ilaç olarak kullanımı üzerine oldukça fazla çalışmanın yer aldığı görülmektedir.

2.4.2.3 Flavonoidler

Flavonoidler ailesi başlıca; flavonlar, flavanlar, flavonoller, kateşinler ve antosiyanidinler üyelerinden oluşan, bitkilerin biyolojik süreçlerde doğal olarak sentezledikleri polifenolik bileşiklerdir (112). Günümüzde 4000'in üzerinde tanımlanmış flavonoid bulunmaktadır. Bu moleküller, büyük oranda bitkilerin yapraklarında, çiçeklerinde ve tohumlarında bulunmasının yanı sıra sebze ve meyvelerin doğal yapılarında bulunan antioksidanlar olarak da bilinmektedirler (113).

Flavonoidlerin anti-inflamatuvar, antioksidan, antialerjik ve antikanser özelliklere sahip oldukları uzun zamandır bilinmektedir. Ayrıca flavonoidlerin antibakteriyel, antifungal, antiviral, özelliklere sahip oldukları çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (91, 95). Bu özelliklerinden dolayı, birçok flavonoid beslenme, gıda güvenliği ve sağlık alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (114, 115).

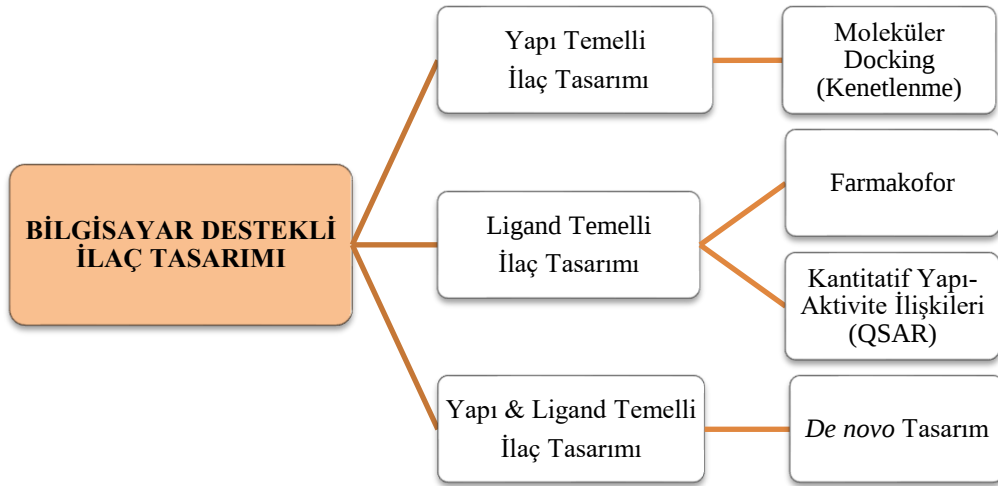
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Moleküler Modelleme

Moleküler modelleme, deneysel çalışmalar doğrultusunda molekülerin kimyasal ve fiziksel özellikleri arasındaki temel ilişkiyi, almış olduğu üç boyutlu (3D) ve kimyasal yapıları anlamaya çalışan bir tekniktir. Bu tekniğin birçok olası metotları ve uygulamaları mevcuttur. Örneğin, atom veya aminoasit ölçeğinde proteinlerin nasıl katlandıkları, fonksiyonlarını nasıl gerçekleştirdikleri, protein-protein etkileşimleri, protein-ilâç etkileşimleri (moleküler docking), biyolojik sistemlerdeki çeşitlilik, ekolojik değişimler veya diğer sebeplerden dolayı biyolojik sistemlerde oluşan sürekli değişimler (mutasyonlar) gibi araştırmalarda moleküler modelleme yaklaşımlarından faydalanılmaktadır (10, 116).

Farmasötik araştırmalarında kullanılan moleküler modelleme tekniklerine Bilgisayar Destekli (Rasyonel) İlaç Tasarımı (Computer Assisted Drug Design (CADD) adı verilmektedir. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı, farmasötik ilâç keşfine yönelik yeni akılcı yaklaşımlar geliştirerek moleküllerin yapı ve etkinliklerinin arasındaki ilişkilerinin aydınlatılmasına olanak sağlayan önemli bir bilimsel çalışma alanıdır. Bu alan, 1980'lerden bu yana daha da ivme kazanarak moleküler biyolojide ve deneysel/teorik yapısal kimyada ve de bilgisayar teknolojilerinde olağanüstü gelişmelere neden olmuştur. Bu gelişmelerin her biri, moleküler modellemenin temelinde önemli bir yere sahiptir (117, 118).

Günümüzde bilgisayar destekli ilâç tasarımına yönelik geliştirilmiş birçok akılcı yaklaşım mevcuttur. Hücresel mekanizmalarda rol oynayan hedef biyomolekülerin 3-boyutlu (3B) yapı bilgisi mevcut ise, efektör (ligand) yapılarının bu hedef yapılara yönelik biyolojik etkinlik tahmini için **yapı temelli (hedef yapı tabanlı) ilâç tasarımı**, hedef biyomolekülün 3B yapı bilgisi mevcut değilken etkinliği daha önce bilinen ligand yapı bilgileri mevcut ise, **ligand temelli ilâç tasarım** yöntemleri kullanılmaktadır (9, 119). Ayrıca hem hedef biyomolekülün hem de ligand molekülerinin yapı bilgileri mevcut olduğu durumlarda ise ilâç keşfinde ve endüstrisinde son zamanlarda sıklıkla uygulanan **de novo tasarım** yöntemine başvurulmaktadır (Şekil 9).



Şekil 9. Bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemlerinin genel şeması

Öte yandan farmakokinetik yöntemler ise kimyasal yapıların, vücutta Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon ve Toksikite (ADMET) analizleri yapılarak incelenmesine dayanmaktadır (119).

3.1.1 Moleküler Docking (Kenetlenme)

Yapı temelli ilaç tasarımı olarak bilinen moleküler docking, 3-boyutlu yapı bilgisi mevcut olan hedef biyomoleküller ile efektör yapılar arasındaki etkileşimlerin incelenmesine olanak sağlayan bilgisayar destekli ilaç tasarım yöntemidir (10, 97).

Moleküler docking, kararlı bir kompleks oluşturmak üzere birbirine bağlanan iki molekülden birinin tercih edilen yönlendirilmesini bilgisayar ortamında tahmin edebilen bir yöntem olup hem ilaçların rasyonel tasarımında hem de biyolojik sürecin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir. Bu yöntem, protein etkileşmesini sağlayan ana sebepleri anlamak ve moleküler seviyede bu olayların kontrolünü sağlamak için önemli bir adımdır (120).

Moleküler kenetleme yöntemi için kullanılan birçok paket program mevcuttur. DOCK (121), FlexX (122), GOLD (123), Glide (124), AutoDock (125), ICM-Pro (126) ve MOE (127) bu yöntem için en sık kullanılan docking programlarıdır. Bu programlardan özgür yazılıma sahip AutoDock Tools (ADT), moleküler kenetlenme analizleri için en çok

tercih edilen docking programıdır. Bu paket programın serbest bağlanma enerjisi hesaplamaları için kuvvet alanı temelli skorlama fonksiyon denklemi kullanılmaktadır:

$$\Delta G = (V_{bağlı}^{L-L} - V_{bağsız}^{L-L}) + (V_{bağlı}^{P-P} - V_{bağsız}^{P-P}) + (V_{bağlı}^{P-L} - V_{bağsız}^{P-L} + \Delta S_{konf})$$

Bu denklemde, ΔG , her bir olası konformasyon durum için ligand ve hedef protein yapı arasındaki serbest bağlanma enerjisini temsil etmektedir. Serbest bağlanma enerjisi, ligand ve proteinin bağısız durumlarındaki intramoleküler, ligand ve proteinin bağlı durumlarındaki intermoleküler enerjilerinin ve bağlanma sırasındaki konformasyonel entropinin (ΔS) toplamı şeklinde hesaplanır.

3.2 Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon, Toksikite (ADMET)

ADMET özellikleri, bir ilaç molekülünün absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması, eliminasyon ve toksisitesi ile ilgilidir (128). İlaçların organizma içerisindeki bu farmakokinetik özellikleri, ilacın tedavi etkinliğini ve sonrasında tüm organizmada bıraktığı etkiyi tanımlamaktadır. Bundan dolayı ilacın vücuda verilme şekli (intravenöz, oral, intramuskular), vücutta dağılımı (ilacın vücuda verilmesinden sonra yüzde kaçının sistemik dolaşıma girdiği), vücutta ilacın metabolize olması (ilacın vücuda verilmesinden sonra yüzde kaçının mide, bağırsaklar ve karaciğerde metabolize olduğu) ve vücuttan ilacın eliminasyonu (ilacın vücutta metabolize edildikten sonra yüzde kaçının renal yolla atıldığı) farmakolojik olarak önemli özelliklerindendir. Bu özelliklerin ilaçtan ilaca farklılık göstermesi ilaçların kimyasal yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (129).

Bir ilaç molekülünün canlı sisteme metabolik olarak denenebilmesi için toksik etkisi olabildiğince azaltılmalı ve istenmeyen etkilerinin minimum seviyeye indirilmesi gereklidir. Bu amaçla, ilaç olarak tasarlanan bileşiklerin ADMET değerlerinin hesaplanması ile vücutta daha az yan etki gösteren (toksikitesi düşük) farmakokinetik açıdan uygun yapıların belirlenmesi sağlanmaktadır (130). Bileşiklerin molekül ağırlıkları, dağılım katsayıları (LogP), polar yüzey alanları, hidrojen bağı yapabilme dereceleri, toplam atom sayıları gibi kimyasal özellikleri vücut içerisindeki etkileşimlerini ve vücuttaki farmakokinetik özelliklerini belirleyen en önemli unsurlardır (131).

Lipinski ve arkadaşları 1997'de, bir bileşiğin oral biyoyararlanımı ve emilimi gibi farmokinetik özelliklerini tahmin etmek için kurallar önermişlerdir. Önerilen bu kurallar test edilen bileşiklerin fiziko kimyasal özelliklerine dayanmaktadır. Bu özellikler;

- Moleküler ağırlık ≤ 500 g / mol
- Hidrojen bağı alıcı sayısı (toplam N ve O atomlarının) ≤ 10
- Hidrojen bağı verici sayısı (toplam OH ve NH grupları) ≤ 5
- Lipofilite katsayısı (oktanol ile su arasındaki dağılım katsayısı) (Log P) ≤ 5

olarak belirtilmiştir (132). Lipinski'nin beş kuralına göre, bir molekül, dört kuraldan ikisini veya daha fazlasını ihlal ederse, ilaç olmak için yeterli sayılmamaktadır. Ancak kurallar, daha basit ve küçük moleküllerden çıkarıldıkları için karmaşık doğal ürünler için her zaman uygun olmamaktadır (133). Günümüzde, daha iyi ADMET özelliklerine sahip etkili moleküller bulmak önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

ADMET analizleri için kullanılan birçok program mevcuttur. Bunlardan özellikle Discovery Studio (134), QikProp (135), SwissADME (136), VolSurf (137), ADMET Predictor(138) ve MetaDrug(139) en çok kullanılan programlardır.

Yukarda belirtilen bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışması için yararlandığımız moleküler modelleme teknikleri ve bu teknikler sonucu oluşan bulgular aşağıda açıklanmıştır.

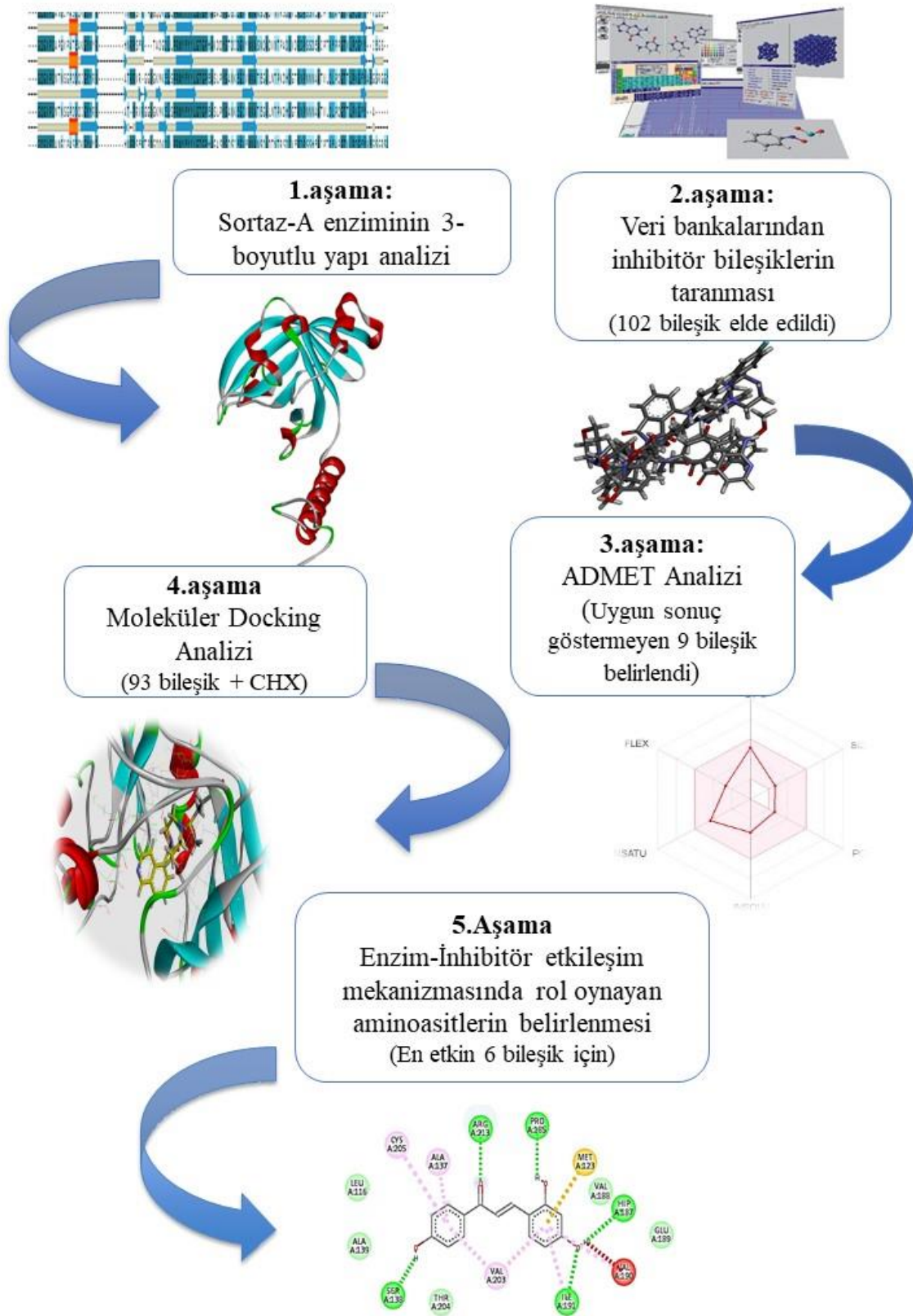
3.3 Moleküler Modelleme Çalışma Protokolü

Bu tez çalışmasında, *S. mutans*-SrtA enzimine yönelik farklı antimikrobiyal ajanların inhibisyon mekanizmasının, yapı-temelli ilaç tasarım yöntemi ile aydınlatılarak dış çürüğü oluşumuna yönelik önleyici ve tedavi edici olarak daha spesifik ve etkin inhibitörlerin geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

Bu doğrultuda çalışmamız beş ana basamaktan oluşmaktadır (**Şekil 10**). Öncelikli olarak ilk aşamada hedef enzimin, aminoasit sekans bilgisi doğrultusunda 3-boyutlu yapısı ve inhibitörlerin bağlanma afinitesi gösterebileceği etkileşim bölgeleri belirlenmiştir. 2.aşamada, birçok veri tabanları aracılığıyla *S. mutans* SrtA enzimine yönelik kimyasal bileşikler taranmıştır. 3.aşamada taranan bu bileşikler ADMET özelliklerine göre farmakokinetik açıdan değerlendirilmiştir. 4.aşamada ise farmakokinetik açıdan uygun olan bileşikler ile hedef enzim yapısı arasındaki etkileşim mekanizmasının moleküler seviyede

incelenmesi amacıyla moleküler docking yöntemi uygulanarak bağlanma serbest enerji ve inhibisyon katsayısı hesaplanmıştır. Son aşamada ise, enzim-ligand etkileşim mekanizmasında rol oynayan aminoasitler moleküler seviyede aydınlatılmıştır. Çalışmanın aşamaları **Şekil 10**'da şematize edilmiştir.





Şekil 10. Moleküler modelleme yöntemi şeması

3.3.1 Moleküler Modelleme Çalışma Protokolü Aşamaları

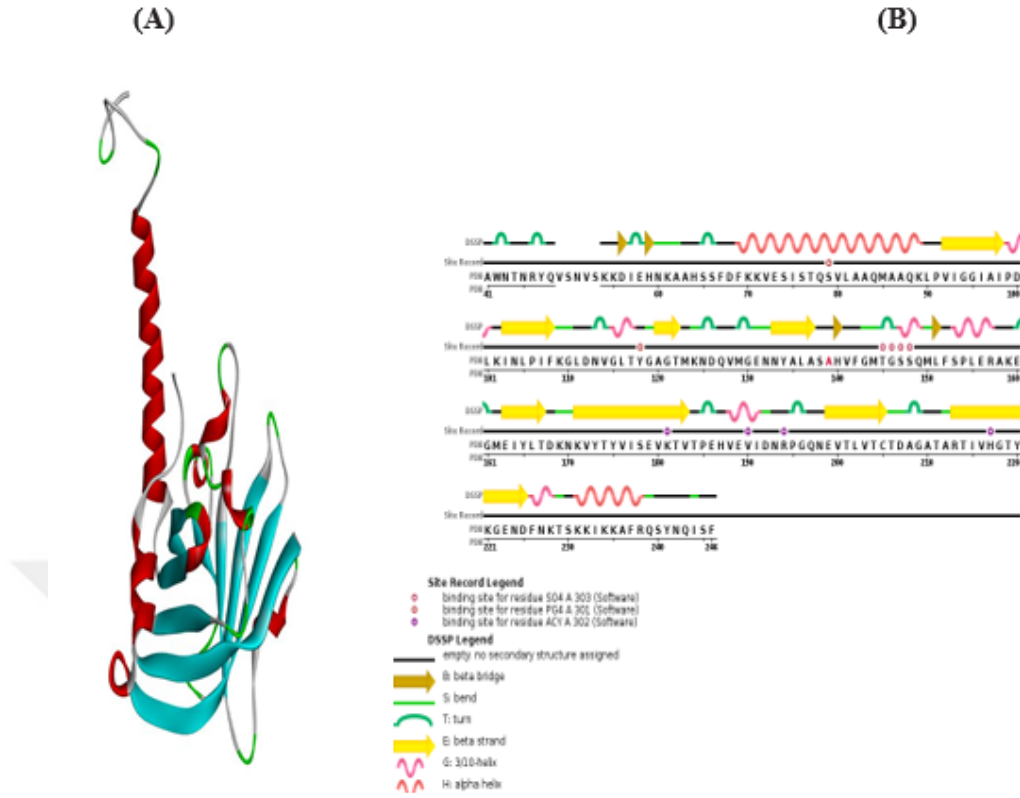
1. Aşama: *Streptococcus mutans* Sortaz A enziminin yapı bilgisi:

- Öncelikle bu tez kapsamında hedef yapımız olan *S. mutans* SrtA enziminin, NCBI veri tabanından aminoasit sekans bilgisine erişilmiştir. Bu bilgilere göre; *S. mutans* türüne ait olan SrtA enzimi 246 amino asit uzunluğundadır (**Şekil 11**).

```
>APU53343.1 sortase [Streptococcus mutans]
MKKERQSRKKRSFLRTFLPILLLVIGLALIFNTPIRNTLIAWNTNRYQVSNVSKKDIEHNKAAHSSFDF
KKVESISTQSVLAAQMAAQKLPVIGGIAIPDLKINLPFKGLDNLVGLTYGAGTMKNDQVMGENNYALAS
HHVFGMTGSSQMLFSPLEAKEGMEIYLTDKNKVYTYVISEVKTVTPEHVEVIDNRPGQNEVTLVTCTD
AGATARTIIVHGTYKGETDFNKTSSKIKKAQRQSYNQISF
```

Şekil 11. *S. mutans* SrtA enzimine ait aminoasit sekans bilgisi

- Bu enzimin 42-206 aminoasit kısmını içeren bölgesinin 3-boyutlu (3B) yapısı X-ray yöntemi ile aydınlatılmıştır. 3B yapı bilgisine protein data bankasından (<http://www.rcsb.org/>) ulaşılmıştır (PDB kodu: 4TQX) (**Şekil 12**).



Şekil 12. (A) *S. mutans* SrtA enziminin 3B yapısı (B) *S. mutans* SrtA enziminin sekans ve ikincil yapı bilgileri

- SrtA enzime ait 3B kristal yapıdaki su molekülleri Discovery Studio 2017 S2 (134) programı kullanılarak çıkartılıp, **PBD2PQR** (140) programı ile fizyolojik pH koşullarında protonlanma yapılararak kenetlenme işlemi için hazırlanmıştır.

2. aşama: *S. mutans* SrtA enziminin inhibisyonuna yönelik kimyasal bileşiklerin taranması

- Bu analiz için; ChEMBL (141), PubChem (142), ZINC (143) veri tabanı ve literatür bilgileri kullanılarak SrtA enzime yönelik kimyasal bileşikler taranmıştır.
- Tarama sonucu 77 kalkon, 24 flavonoid türevli bileşik ve klorheksidin olmak üzere toplamda 102 adet kimyasal bileşik reaksiyonun ligandları olarak belirlenmiştir (**Ek Tablo 1**).

3.aşama: ADMET Analizi

- Taranan 102 adet kimyasal bileşiğin (.smiles) formatında veri dosyaları hazırlanmıştır.
- Bu dosyalar, bileşiklerin fizikokimyasal, farmakokinetik, lipofilite ve suda çözünürlük gibi özelliklerine Lipinski (132) ve Veber (144) kurallarına göre filtreleme yapan **SwissADME** (136) programına yüklenmiştir.
- Moleküler ağırlık, dönebilen bağ sayısı, hidrojen bağı alıcılarının sayısı, hidrojen bağı vericilerin sayısı, lipofilite katsayısı (LogP), kutuplaşmış yüzey alanı, molar refraktivite parametreleri ile farmakokinetik açıdan değerlendirilmiştir.

Bu sayede, dış çürüğünü azaltmaya yönelik geliştirilebilecek ajanların uygulanım sonrası tükürük aracılığı ile yutulabilmesi sonucunda oluşabilecek yan etkiler azaltılabilecektir.

4. aşama: Moleküler Docking (Kenetlenme) Analizi

- Hedef enzim yapısının kristal yapısında referans bir ligand ve bağlanma bölgesi bilinmediği için bu enzimle sekans benzerliği oldukça yüksek olan *S. aureus* türüne ait SrtA enzimine ait kristal yapının (pdb kod:2MLM) bağlanma bölgesi ile eşleştirilmiştir.
- Bu işlem **Chimera 1.13.1** (145) programının matchmaker fonksiyonu ile birbirlerine üst üste getirelerek (superimpose) gerçekleştirilmiştir.
- Bu işlem sonucunda hedef protein ve ligand yapısı kaydedilerek **AGFR1.1** (146) programında bağlanma bölgesinin x,y,z kartezyen koordinatlarının merkezi 6.85, 27.70, -22.48, grid kutusu 33, 44, 49 ve bu noktalar arası boşluk (grid space) 0.375Å olarak belirlenmiştir.
- Veri tabanları aracılığıyla taranan bileşiklerden farmokinetik olarak uygun olanlara, **Discovery Studio** (134) programı ile Hidrojen atomları eklenip .pdb dosya formatında kaydedilmiştir
- Gerekli hazırlık dosyaları tamamlandıktan sonra, **AutoDock4.2** (125) programı ile ligandlar ve SrtA enzimi arasındaki etkileşimi belirlemek için moleküler docking yöntemi uygulanmıştır.
- Bu yöntem, Lamanckian Genetik algoritma ile 100 çalışma adımında gerçekleştirilmiştir.

- Bu işlem sonucunda her bir olası konformasyon durum için bağlanma serbest enerjisi (ΔG) ve bağlanma ilgisi (afinitesi) hesaplanarak oluşan sonuçlar değerlendirilmiştir.

5. aşama: Enzim-Ligand yapısının bağlanma analizi

- Kenetlenme sonucunda oluşan her bir enzim-ligand yapısının en düşük enerjideki konformasyonlarına ait üç boyutlu yapılarının bağlanma bölgelerindeki etkileşimleri **Discovery Studio** programı ile analiz edilmiştir.
- Bu analizde enzim ile ligand arasındaki etkileşimde önemli role sahip aminoasitler ve yapmış oldukları kimyasal bağlanma türleri (hidrojen, vander waals, hidrofobik) incelenmiştir.

Bu bilgilerin ışığında, dış çürüğünü erken aşamada önlemek ve tedavi etmek için *S.mutans* SrtA enzimine karşı inhibitör olarak belirlenen klorheksidin ve 93 adet doğal bileşiğin moleküler modelleme yöntemi ile inhibisyon mekanizmaları moleküler seviyede aydınlatılmıştır. Böylece, *S.mutans* SrtA enzimine yönelik mevcut inhibitörlerden daha seçici ve daha az yan etkiye sahip inhibitörlerin geliştirilmesine katkı sağlanarak bu alanda yapılacak olan deneysel çalışmaların daha az maliyetli ve isabetli olmasına katkı sağlanacaktır.

4. BULGULAR

4.1 Ligandların ADMET Analizinin Değerlendirilmesi

Döndürülebilir bağlar, moleküler esnekliğin bir ölçüsünü temsil eder. İnhibitörler stabilite göstermesi açısından, düşük moleküler esnekliğe sahip olmalıdır. Bunun yanı sıra, bileşiklerin inhibisyon etkinliği için sahip olması gereken hidrofilik ve hidrofobik özellikler hidrojen bağı alıcı ve verici sayılarına bakarak yorumlanabilir. Bu bilgiler doğrultusunda, sanal veri tabanları ve literatür tarama ile elde edilen 101 adet doğal bileşiğin ve CHX'in farmakokinetik özellikleri Lipinski ve Veber kurallarına göre filtrelenerek ADMET (absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon, toksisite) açısından değerlendirilmiştir.

Bu değerlendirme sonucuna göre 93 doğal bileşik farmakokinetik açıdan uygun bulunmuş olup, CHX ve sekiz bileşik (1, 80, 88, 89, 95, 96, 100, 101, 102 numaralı ligandlar) uygun bulunamamıştır (**Tablo 3**).

Tablo 3. Sortaz A enzim inhibisyonuna yönelik belirlenen 102 bileşiğin ADMET analizi

Referans Aralığı	50-500 g/mol	0-5	0-10	0-5	-2-10	0-5	20-130 Å ²	40-130	Evet
Özellikler	Moleküler Ağırlık	Döndürülebilir Bağ Sayısı	H-bağı alıcı	H-bağı verici	iLogP	mLogP	Kutuplaşmış Yüzey Alanı	Molar Refraktivite	Lipinski Kuralı
Numara									
1 (CHX)	506.45	13	3	7	0.00	2.64	164.89	143.51	Hayır
2	208.26	3	1	0	2.54	3.44	17.07	66.25	Evet
3	256.25	3	4	3	1.70	1.58	77.76	77.32	Evet
4	256.25	3	4	3	1.89	1.58	77.76	72.32	Evet
5	240.25	3	3	2	2.25	2.17	57.53	70.29	Evet
6	256.25	3	4	3	1.89	1.58	77.76	72.32	Evet
7	270.28	4	4	2	2.78	1.83	66.76	76.79	Evet
8	272.25	3	5	4	1.30	1.02	97.99	74.34	Evet
9	270.28	4	4	2	2.43	1.83	66.76	76.79	Evet
10	256.25	3	4	3	1.70	1.58	77.76	72.32	Evet
11	256.25	3	4	3	2.02	1.58	77.76	72.32	Evet
12	256.25	3	4	3	2.02	1.58	77.76	72.32	Evet
13	256.25	3	4	3	2.02	1.58	77.76	72.32	Evet
14	256.25	3	4	3	1.91	1.58	77.76	72.32	Evet
15	270.28	4	4	2	2.33	1.83	66.76	76.79	Evet
16	256.25	3	4	3	2.05	1.58	77.76	72.32	Evet
17	240.25	3	3	2	1.95	2.17	57.53	70.29	Evet
18	256.25	3	4	3	2.08	1.58	77.76	72.32	Evet
19	256.25	3	4	3	1.69	1.58	77.76	72.32	Evet
20	256.25	3	4	3	1.69	1.58	77.76	72.32	Evet
21	240.25	3	3	2	2.23	2.17	57.53	70.29	Evet
22	240.25	3	3	2	2.25	2.17	57.53	70.29	Evet
23	240.25	3	3	2	1.92	2.17	57.53	70.29	Evet
24	240.25	3	3	2	1.91	2.17	57.53	70.29	Evet
25	254.28	4	3	1	2.91	2.42	46.53	74.76	Evet

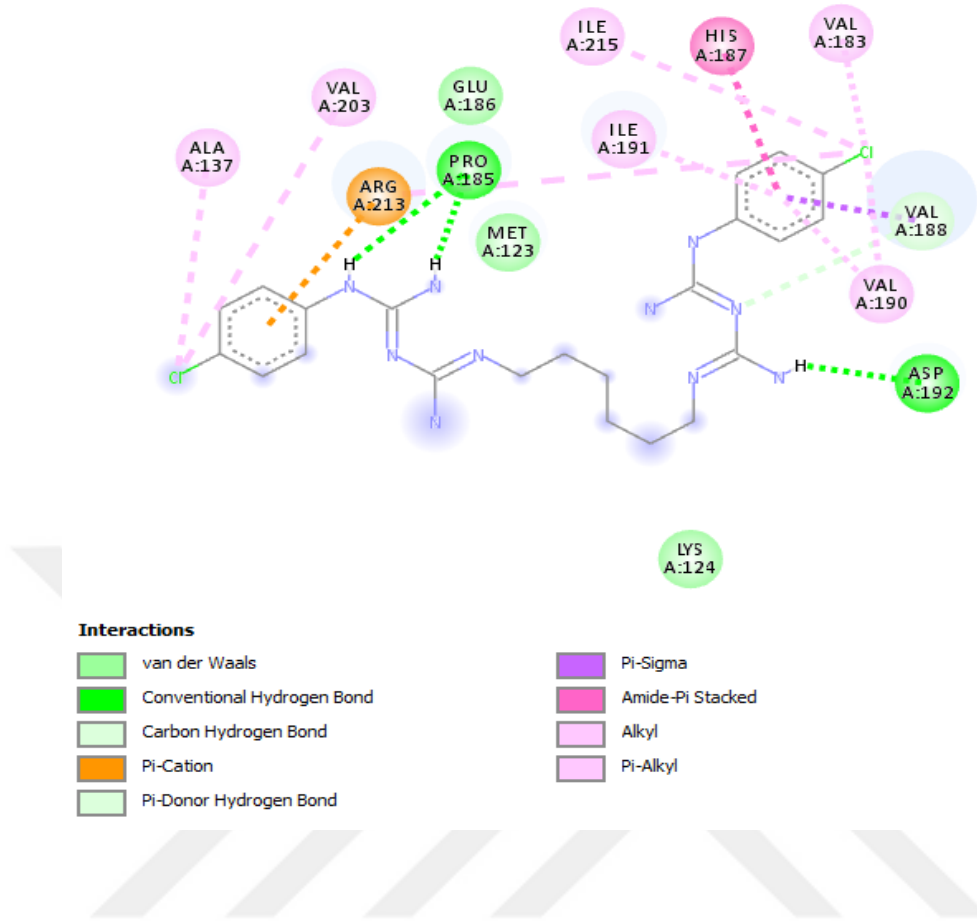
<i>Referans Aralığı</i>	<i>50-500 g/mol</i>	<i>0-5</i>	<i>0-10</i>	<i>0-5</i>	<i>-2-10</i>	<i>0-5</i>	<i>20-130 Å²</i>	<i>40-130</i>	<i>Evet</i>
26	270.28	4	4	2	2.66	1.83	66.76	76.79	Evet
27	270.28	4	4	2	2.12	1.83	66.76	76.79	Evet
28	270.28	4	4	2	2.47	1.83	66.76	76.79	Evet
29	284.31	5	4	1	3.04	2.08	55.76	81.26	Evet
30	270.28	4	4	2	2.74	1.83	66.76	76.79	Evet
31	270.28	4	4	2	1.84	1.83	66.76	76.79	Evet
32	270.28	4	4	2	2.59	1.83	66.76	76.79	Evet
33	270.28	4	4	2	2.62	1.83	66.76	76.79	Evet
34	270.28	4	4	2	2.55	1.83	66.76	76.79	Evet
35	256.25	3	4	3	2.09	1.58	77.76	72.32	Evet
36	272.25	3	5	4	1.03	1.02	97.99	74.34	Evet
37	272.25	3	5	4	1.36	1.02	97.99	74.34	Evet
38	272.25	3	5	4	1.55	1.02	97.99	74.34	Evet
39	302.28	4	6	4	1.53	0.73	107.22	80.83	Evet
40	272.25	3	5	4	1.39	1.02	97.99	74.34	Evet
41	288.25	3	6	5	1.36	0.48	118.22	76.36	Evet
42	288.25	3	6	5	0.94	0.48	118.22	76.36	Evet
43	272.25	3	5	4	1.36	1.02	97.99	74.34	Evet
44	272.25	3	5	4	1.87	1.02	97.99	74.34	Evet
45	272.25	3	5	4	1.38	1.02	97.99	74.34	Evet
46	272.25	3	5	4	1.66	1.02	97.99	74.34	Evet
47	272.25	3	5	4	1.61	1.02	97.99	74.34	Evet
48	272.25	3	5	4	1.84	1.02	97.99	74.34	Evet
49	288.25	3	6	5	1.65	0.48	118.22	76.36	Evet
50	288.25	3	6	5	1.45	0.48	118.22	76.36	Evet
51	304.25	3	7	6	1.29	-0.05	138.45	78.39	Evet
52	272.25	3	5	4	1.69	1.02	97.99	74.34	Evet
53	302.28	4	6	4	1.25	0.73	107.22	80.83	Evet
54	304.25	3	7	6	1.44	-0.05	138.45	78.39	Evet
55	288.25	3	6	5	1.96	0.48	118.22	76.36	Evet
56	276.28	4	5	4	1.37	0.34	97.99	71.95	Evet
57	272.25	3	5	4	1.63	1.02	97.99	74.34	Evet
58	306.70	3	5	4	2.09	1.54	97.99	79.35	Evet
59	272.25	3	5	4	1.69	1.02	97.99	74.34	Evet
60	272.25	3	5	4	1.76	1.02	97.99	74.34	Evet
61	302.28	4	6	4	1.62	0.73	107.22	80.83	Evet
62	256.25	3	4	3	2.12	1.58	77.76	72.32	Evet
63	272.25	3	5	4	1.79	1.02	97.99	74.34	Evet
64	286.28	4	5	3	2.04	1.27	86.99	78.81	Evet
65	288.25	3	6	5	0.82	0.48	118.22	76.36	Evet
66	302.28	4	6	4	1.88	0.73	107.22	80.83	Evet
67	288.25	3	6	5	0.99	0.48	118.22	76.36	Evet
68	286.28	4	5	3	1.78	1.27	86.99	78.81	Evet
69	286.28	4	5	3	1.84	1.27	86.99	78.81	Evet
70	272.25	3	5	4	1.16	1.02	97.99	74.34	Evet
71	286.28	4	5	3	2.35	1.27	86.99	78.81	Evet
72	302.28	4	6	4	2.14	0.73	107.22	80.83	Evet
73	286.28	4	5	3	1.70	1.27	86.99	78.81	Evet
74	284.31	5	4	1	2.77	2.08	55.76	81.26	Evet
75	256.25	3	4	3	1.75	1.58	77.76	72.32	Evet
76	288.73	4	3	1	2.88	2.93	46.53	79.77	Evet
77	270.28	4	4	2	2.35	1.83	66.76	76.79	Evet
78	438.51	7	6	3	3.08	2.48	96.22	125.34	Evet
79	302.24	1	7	5	1.47	-0.56	131.36	78.03	Evet
80	450.39	3	11	7	2.02	-1.91	186.37	105.98	Hayır
81	270.28	2	4	1	2.57	1.52	55.76	74.02	Evet
82	270.28	2	4	1	2.58	1.52	55.76	74.02	Evet
83	240.25	1	3	1	2.06	1.85	46.53	67.52	Evet
84	268.26	2	4	1	2.49	1.33	59.67	76.44	Evet

Referans Aralığı	50-500 g/mol	0-5	0-10	0-5	-2-10	0-5	20-130 Å ²	40-130	Evet
85	298.29	3	5	1	2.97	1.01	68.90	82.93	Evet
86	284.26	2	5	2	2.55	0.77	79.90	78.46	Evet
87	254.24	1	4	2	1.77	1.08	70.67	71.97	Evet
88	610.52	6	16	10	0.46	-3.89	269.43	141.38	Hayır
89	624.54	7	16	9	0.82	-3.69	258.43	145.85	Hayır
90	302.24	1	7	5	1.63	-0.56	131.36	78.04	Evet
91	318.24	1	8	6	1.08	-1.08	151.59	80.06	Evet
92	456.53	8	7	4	2.90	1.76	116.45	127.02	Evet
93	290.27	1	6	5	1.33	0.24	110.38	74.33	Evet
94	402.39	7	8	0	3.96	0.34	85.59	106.87	Evet
95	594.52	6	15	9	-0.11	-3.43	249.20	139.36	Hayır
96	624.54	7	16	9	2.65	-3.69	258.43	145.85	Hayır
97	324.37	5	4	3	3.02	2.70	77.76	96.04	Evet
98	302.24	1	7	5	1.50	-0.56	131.36	78.04	Evet
99	286.28	4	5	3	1.72	1.27	86.99	78.81	Evet
100	464.38	4	12	8	0.94	-2.59	210.51	110.1	Hayır
101	578.52	6	14	8	1.31	-2.96	228.97	137.33	Hayır
102	622.57	8	15	7	3.41	-3.03	227.20	148.29	Hayır

4.2 Enzim-Ligand Bileşiklerinin Moleküler Docking Analizlerinin Değerlendirilmesi

SrtA enziminin literatürde yaygın olarak bilinen inhibitörü ve diş hekimliğinde antibakteriyel ajan olarak en sıklıkla kullanılan kimyasal bileşik CHX, uygun olmayan farmakokinetik özelliklerine rağmen inhibitör etkileri kanıtlandığı için bu çalışmada pozitif (+) kontrol olarak belirlenmiştir (100, 101, 103-107). Çalışmada öncelikle pozitif kontrol olarak kabul edilen CHX'nin ve ADMET analizi sonucunda farmakokinetik özellikleri uygun olan 93 doğal bileşik ile SrtA enzimi arasındaki etkileşim mekanizmasının aydınlatılması amacıyla moleküler docking analizi gerçekleştirilmiştir.

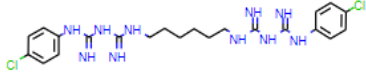
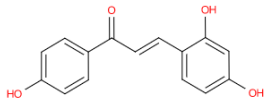
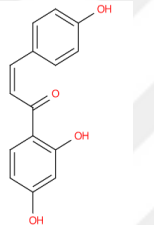
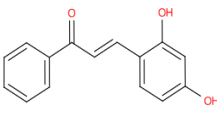
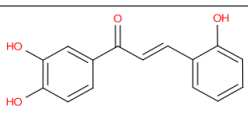
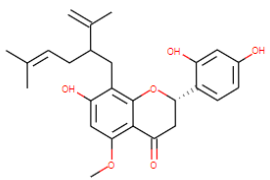
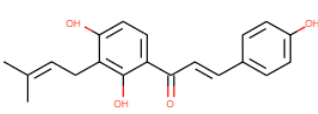
Bu analiz sonucuna göre; *S. mutans* SrtA enzimi ile CHX bileşiği arasındaki bağlanma enerjisi: **-6.29** kcal/mol olarak hesaplanmış olup inhibisyon katsayısı (K_i) **24.45** uM olarak belirlenmiştir (**Tablo 4**). Bunun yanında, CHX bileşiğinin enzim etkinliğinde önemli role sahip olan Arg213 aminoasiti ile Pi-cation bağı, Asp192, Pro185, Val188, ile hidrojen bağı, Ala137, Val183, Val190, Ile215, Val203 ile alkil bağı ve Val190, Ile191 ile Pi-alkil bağı oluşturduğu gözlenmiştir (**Tablo 5 ve Şekil 13**).



Şekil 13. *S. mutans* SrtA - Klorheksidin bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi

ADMET analizi sonucunda farmakokinetik açıdan uygun 93 adet doğal bileşiğin moleküler docking analizine göre, pozitif kontrol olarak kabul edilen CHX'in bağlanma enerjisinden (-6.29 kcal/mol) daha yüksek bağlanma enerjisine sahip olan en iyi beş adet kalkon türevli ve bir adet flavonoid türevli bileşik, *S. mutans* SrtA enzimine karşı potansiyel inhibitör bileşikler olarak belirlenmiştir. Bunlar 10, 12, 17, 75, 78, 97 numaralı ligandlar olup bu bileşiklerin 2B kimyasal yapıları, K_i değerleri ve bağlanma enerjileri **Tablo 4'** de özetlenmiştir.

Tablo 4. Moleküler docking analizi sonucunda belirlenen en etkin altı bileşiğin ve CHX'in 2B kimyasal yapısı, bağlanma enerjisi ve K_i değerleri

Ligand Numara/İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K_i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
Klorheksidin (+kontrol)		24.45	-6.29
10 CHEMBL3335591 (Kalkon)		16.48	-6.53
12 CHEMBL1395334 (Kalkon)		17.98	-6.47
17 CHEMBL373249 (Kalkon)		19.48	-6.43
75 CHEMBL2180472 (Kalkon)		14.72	-6.59
78 Kurarinon CHEMBL243796		5.47	-7.18
97 İzobavakalkon CHEMBL253467		20.79	-6.39

Bu sonuçlara göre Kurarinon (flavonoid türevi) bileşiği **-7.18 kcal/mol** enerji ile diğer tüm bileşiklerden daha yüksek bağlanma enerjisi göstermiştir. Ayrıca beş kalkon türevi bileşik, 10 (-6.53 kcal/mol), 12 (-6.47 kcal/mol), 17 (-6.43 kcal/mol), 75 (-6.59 kcal/mol) ve İzobavakalkon (-6.39 kcal/mol) diğer kalkon ve flavonoid bileşiklerine göre daha belirgin bağlanma afinitesi sergilemiştir (**Tablo 4**). CHX bileşiğine karşı doğal inhibitörlerin docking analizi ile hesaplanan bağlanma enerjisi değerleri daha ileri araştırmalar için umut verici sonuçlar göstermiştir.

4.3 Enzim-Ligand Yapısının Bağlanma Analizi Sonuçları

Sortaz A enzimi ile potansiyel inhibitör bileşikler arasındaki etkileşim mekanizmasında görev alan aminoasitler **Tablo 5**' de özetlenmiştir. Kenetlenme sonucunda bu etkin altı bileşik SrtA enzimi ile esas olarak *Arg,213*, *Cys205*, *His 187*, *Thr204*, *Val203*, *Met123*, *Leu111*, *Ser128*, *Pro185*, *Ile191*, *Val190*, *Ile215*, *Val188* aminoasitleri ile geleneksel hidrojen bağı, van der waals, Pi-Sigma, Pi-Sülfür, Pi-Alkil bağları aracılığı ile etkileşime girmiştir.

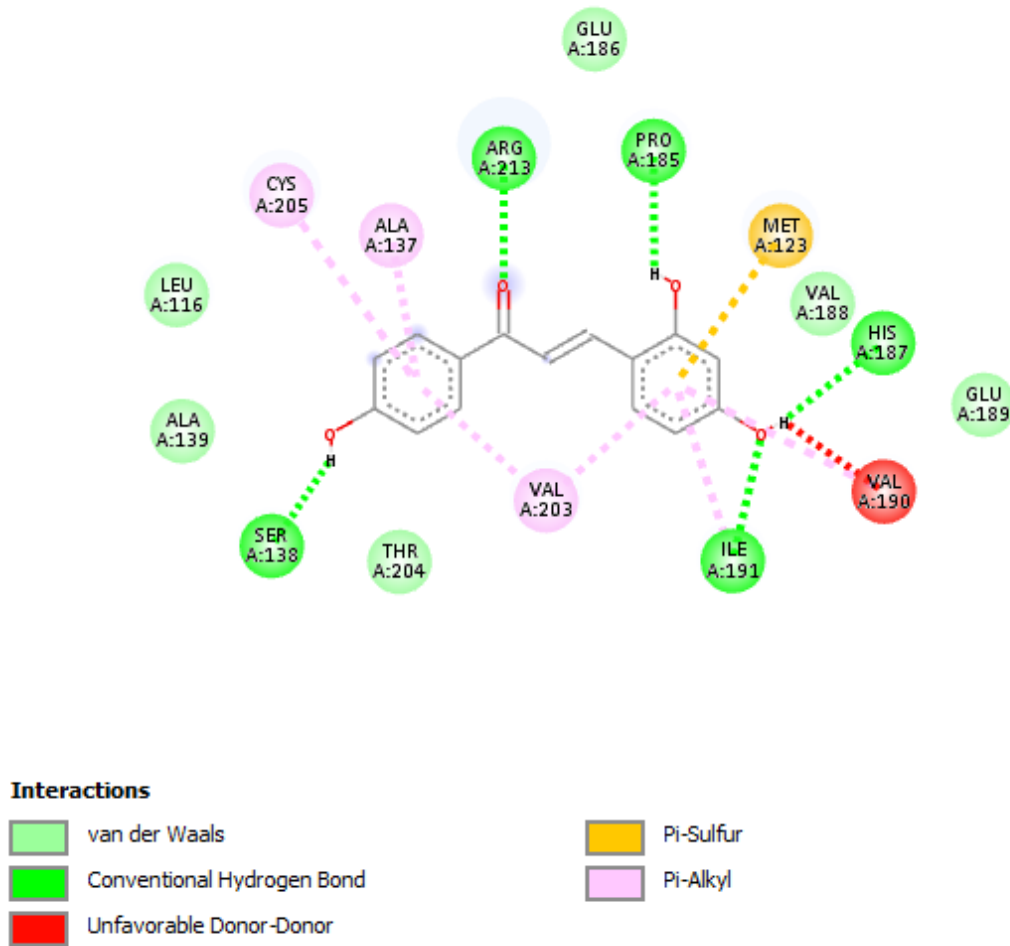
Ayrıca, 75 ve 78 (Kurarinon) numaralı bileşik SrtA enziminin bağlanma bölgesinde bulunan ve inhibisyon mekanizmasında oldukça önemli rol oynayan olan *Arg213*, *Cys205* ile hidrojen bağı oluşturmuştur. 97 (İzobavakalkon) numaralı bileşik haricindeki tüm etkin bileşikler *Arg213* ile hidrojen bağı oluşumuna katılmıştır. Bunun yanı sıra tüm bileşikler *Pro185* aminoasiti ile hidrojen bağı oluştururken, *Ser128* aminoasiti 10,12,75,78,97 numaralı bileşiklerle, *His187* aminoasiti ise 10,12,17 numaralı bileşiklerle hidrojen bağı oluşturmuştur.

Tablo 5. SrtA enzim-ligand kompleksinin CHX ve potansiyel inhibitör bileşikler ile aminoasit etkileşimleri

Ligand Numara /İsim	Srt-A ve Ligandların Bağ Yaptığı Aminoasitler
Klorheksidin (+ kontrol)	His187, Met123, Lys124, Glu186, Asp192, Pro185, Val188, Arg213, Val190, Val183, Ile191, Ile215, Val203, Ala137
10 CHEMBL3335591 (Kalkon)	Val188, Glu189, Leu116, Ala139, Thr204, Glu186, Arg213, Pro185, His187, Ile191, Ser138, Val190, Met123, Val203, Ala137, Cys205
12 CHEMBL1395334 (Kalkon)	Val188, Val190, Val183, Ile215, Met123, Thr204, Ala139, His140, Leu116, Leu111, Arg213, Pro185, Ser138, His187, Val202, Ala137, Cys205
17 CHEMBL373249 (Kalkon)	Val188, Ser138, Thr204, Leu116, Leu111, Glu186, Glu189, Arg213, Pro185, Ile191, His187, Val190, Met123, Ala137, Val203, Cys205
75 CHEMBL2180472 (Kalkon)	Leu116, Leu111, Ala139, Val183, Thr184, Val188, His187, Met123, Pro185, Ser138, Cys205, Arg213, Thr204, Ala137, Val203, Ile191, Val190
78 Kurarininon CHEMBL243796	His140, Thr204, Val203, Met123, Leu111, Glu186, Thr184, Ala139, His187, Ser138, Arg,213, Cys205, Pro185, Ala137, Ile191, Val183, Val190, Ile215, Val188
97 İzobavakalkon CHEMBL253467	His187, Met123, Thr204, Ala139, His140, Thr184, Ser138, Pro185, Cys205, Val188, Val183, Val190, Val203, Arg213, Ile215, Ile191, Ala137

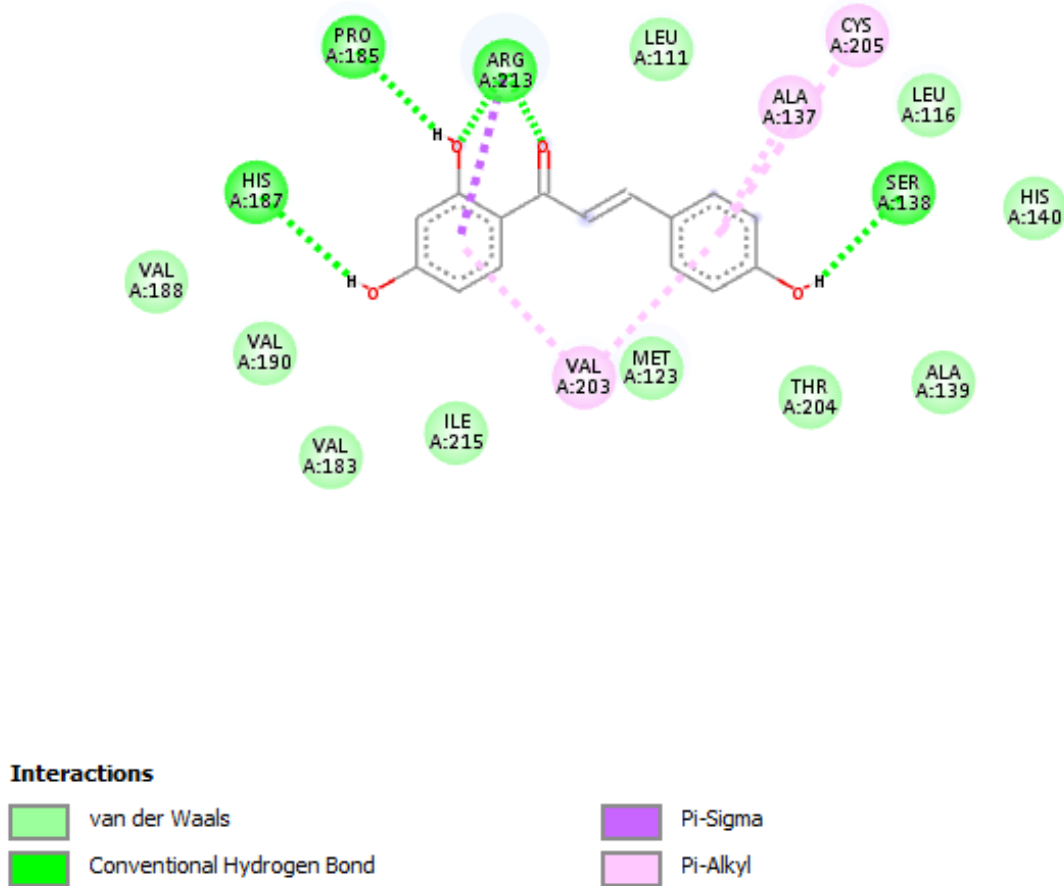
Son olarak moleküler docking ve ADMET analizi sonuçlarına göre belirlenen en etkin altı bileşiğin bu aminoasitler ile yapmış oldukları bağları gösteren 2B resimleri, Discovery Studio programı sayesinde şematize edilerek **Şekil 14, 15, 16, 17, 18 ve 19**'da gösterilmiştir.

- Moleküler docking işlemi sonucunda, 10 numaralı ChEMBL3335591 bileşiği için bağlanma enerjisi **-6.53** kcal/mol, inhibisyon katsayısı **16.48** uM olarak hesaplanmıştır. Bu bileşik, enzim etkinliğinde önemli role sahip olan **Arg213** ile hidrojen bağı ve **Cys205** ile Pi-alkil bağı oluştururken, ek olarak **Pro185**, **His187**, **Ile191** ile hidrojen bağı oluşturmuştur.



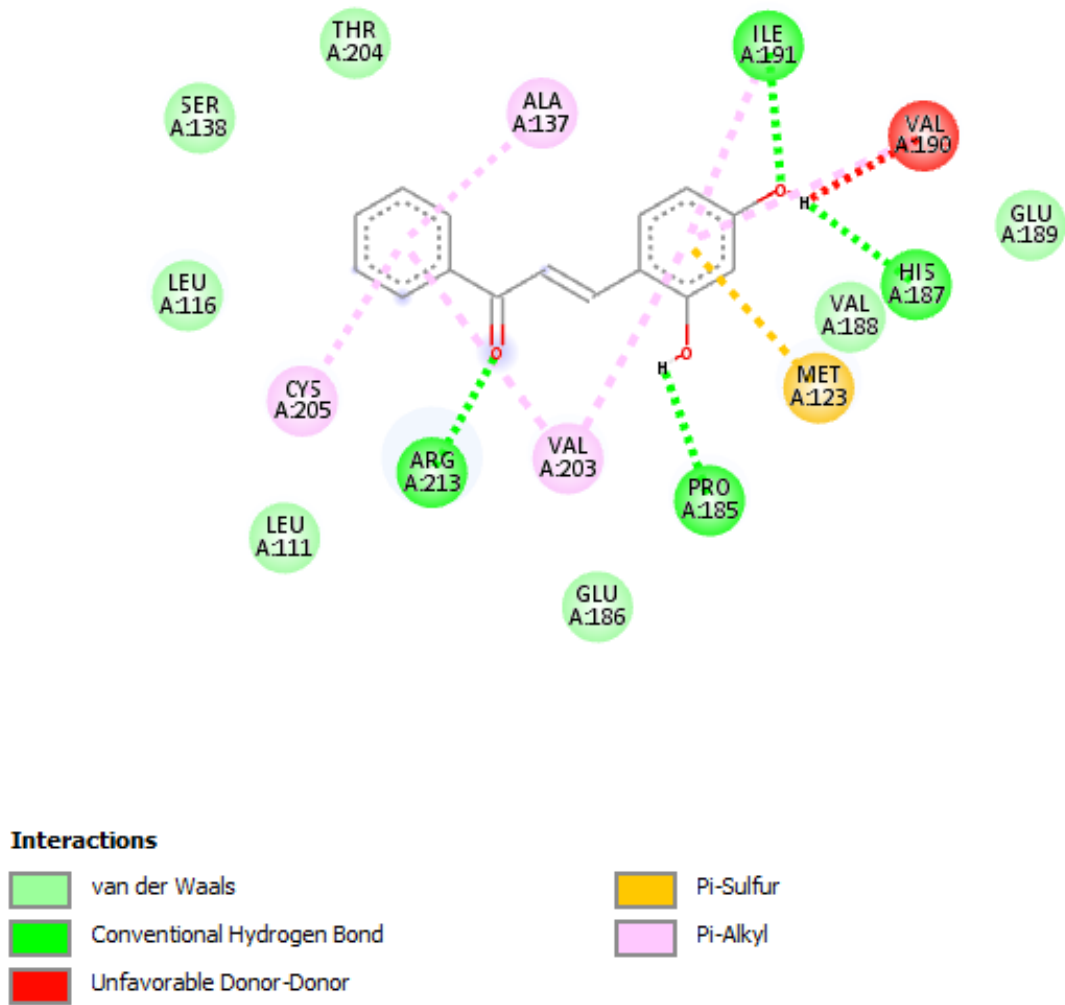
Şekil 14. *S. mutans* SrtA – ChEMBL3335591 (10 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi

- Moleküler docking işlemi sonucunda, 12 numaralı ChEMBL1395334 bileşiği için bağlanma enerjisi **-6.47** kcal/mol, inhibisyon katsayısı **17.98** uM olarak hesaplanmıştır. Bu bileşik, enzim etkinliğinde önemli role sahip olan **Arg213** ile hidrojen bağı ve **Cys205** ile Pi-alkil bağı oluştururken, ek olarak **Pro185**, **His187**, **Ser138** ile hidrojen bağı oluşturmıştır.



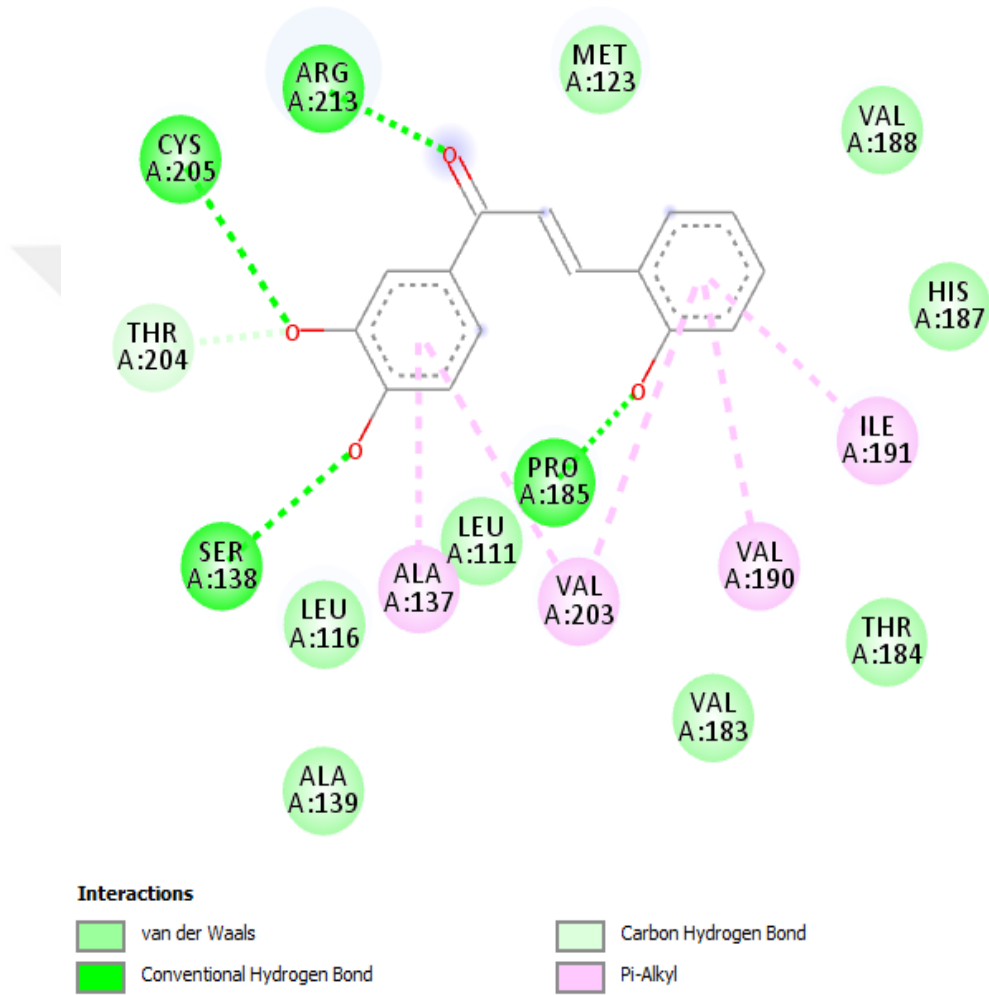
Şekil 15. *S. mutans* SrtA - ChEMBL1395334 (12 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi

- Moleküler docking işlemi sonucunda, 17 numaralı ChEMBL373249 bileşiği için bağlanma enerjisi **-6.43** kcal/mol, inhibisyon katsayısı **19.48** uM olarak hesaplanmıştır. Bu bileşik, enzim etkinliğinde önemli role sahip olan **Arg213** ile hidrojen bağı ve **Cys205** ile Pi-alkil bağı oluştururken, ek olarak **Pro185**, **His18**, **Ile191** ile hidrojen bağı oluşturmuştur.



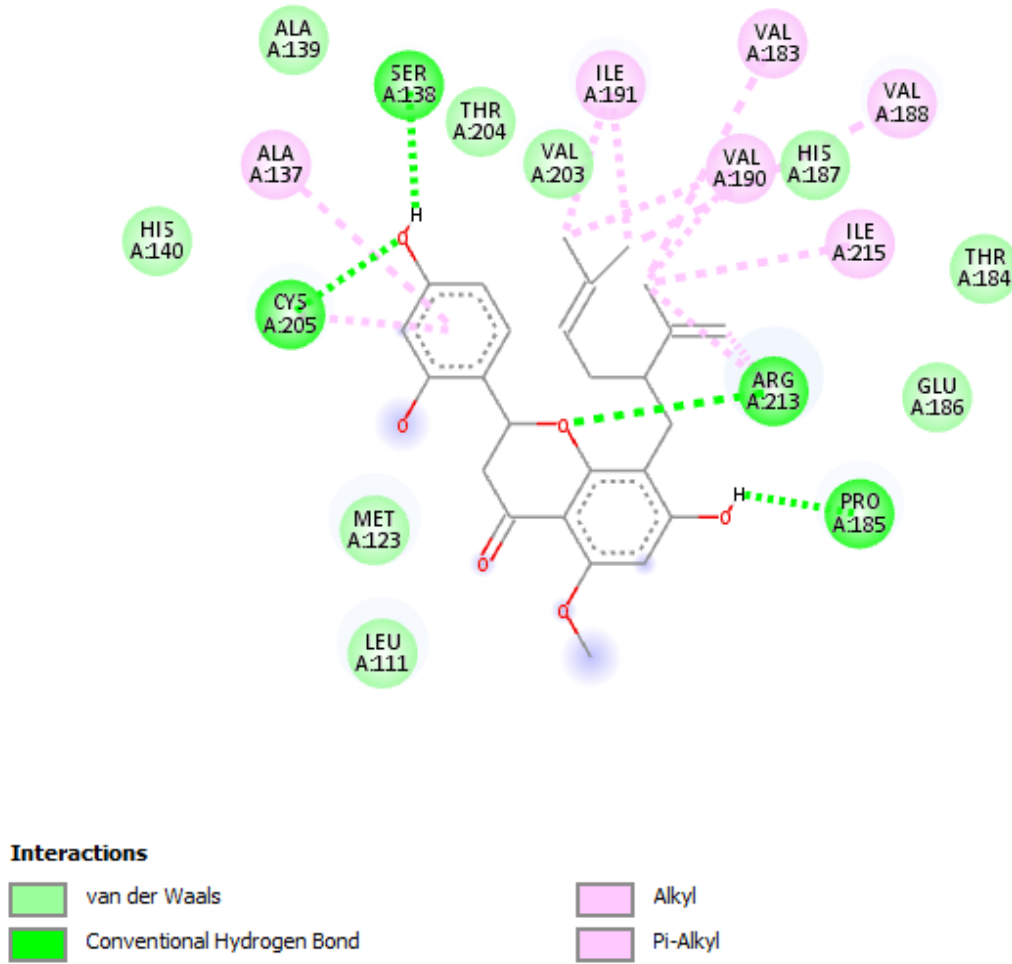
Şekil 16. *S. mutans* SrtA - ChEMBL373249 (17 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi

- Moleküler docking işlemi sonucunda, 75 numaralı ChEMBL2180472 bileşiği için bağlanma enerjisi **-6.59** kcal/mol inhibisyon katsayısı **14.72** uM olarak hesaplanmıştır. Bu bileşik, enzim etkinliğinde önemli role sahip olan **Arg213**, **Cys205** ve **Pro185**, **Ser138** ile hidrojen bağı oluşturmıştır.



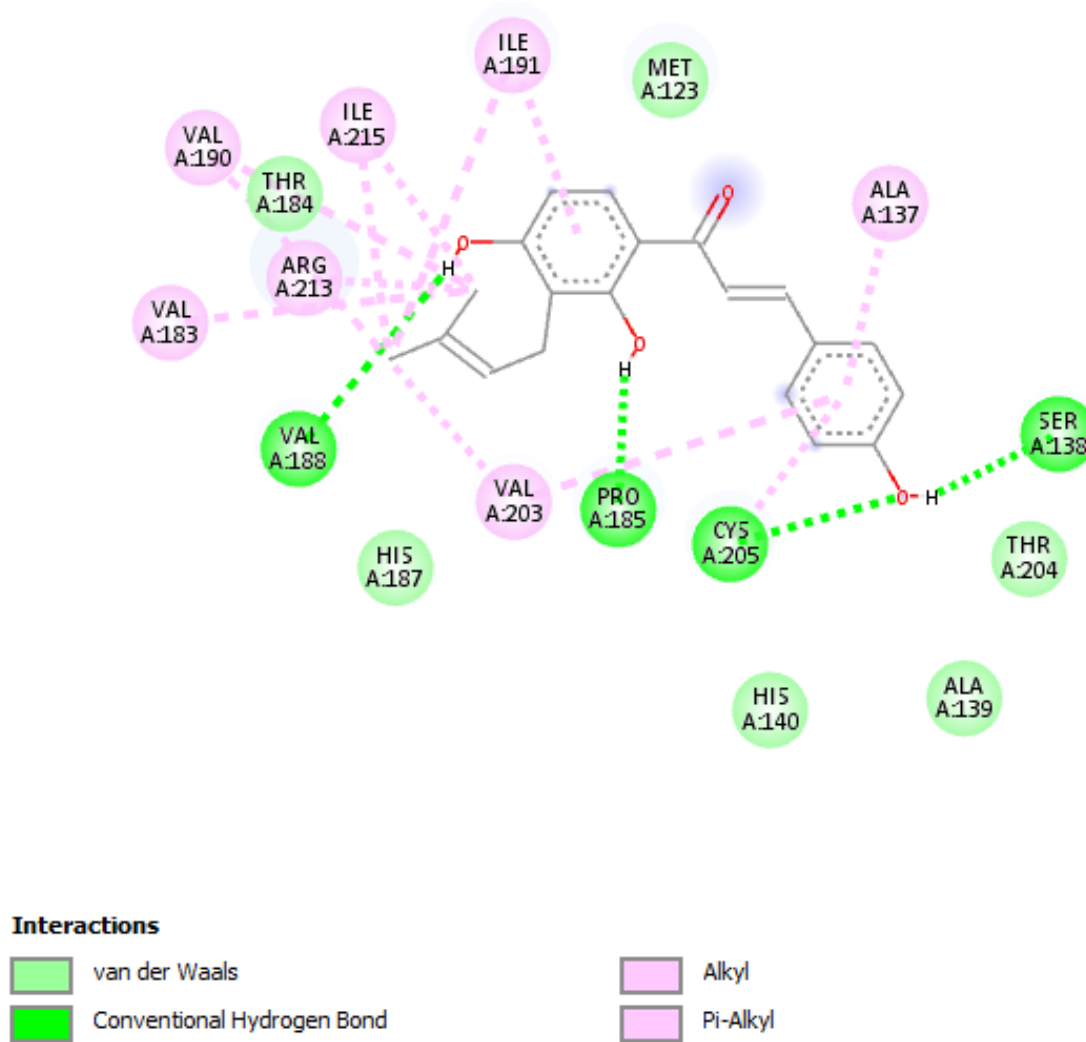
Şekil 17. *S. mutans* SrtA - ChEMBL2180472 (75 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi

- Moleküler docking işlemi sonucunda, 78 numaralı Kurarinon bileşiği için bağlanma enerjisi **-7.18** kcal/mol inhibisyon katsayısı **5.47** uM olarak hesaplanmıştır. Bu bileşik, enzim etkinliğinde önemli role sahip olan **Arg213** ve **Cys205** ile hem hidrojen bağı hem de Pi-alkil bağı oluşturmuştur.



Şekil 18. *S. mutans* SrtA – Kurarinon (78 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi.

- Moleküler docking işlemi sonucunda, 97 numaralı İzobavakalkon bileşiği için **6.39** kcal/mol inhibisyon katsayısı **20.79** uM olarak hesaplanmıştır. Bu bileşik, enzim etkinliğinde önemli role sahip olan **Arg213** ile Pi-alkil bağı ve **Cys205** ile hidrojen bağı ve Pi-alkil bağı oluştururken oluştururken, ek olarak **Pro185**, **Ser138**, **Val188** ile hidrojen bağı oluşturmuştur.



Şekil 19. *S. mutans* SrtA – İzobavakalkon (97 numaralı ligand) bileşiğinin 2B etkileşim analizinin gösterimi.

4.4 Klorheksidin ve Potansiyel İnhibitör Bileşiklerin ADMET Analizinin Sonuçları

Deneyssel ve klinik çalışmalarda uzun süre kullanımı sonucunda toksik ve yan etkileri görülen klorheksidin, yapılan hesaplamalı ADMET analizinde de beklenen sonucu göstermiş ve yüksek molekül ağırlığı ve yaptığı bağ sayıları sonucunda Lipinski kurallarına göre farmokinetik açıdan uygun bulunamamıştır.

Yapılan moleküler docking analizine göre belirlenen SrtA enzimine karşı en etkin altı bileşik (10,12,17,75,78,97) ADMET analizine göre farmakokinetik olarak uygun bulunmuştur. Bu bileşiklerin hepsinin molekül ağırlığı 500 g/mol'ün altında olup, mLogP değerleri sırasıyla 1.58, 1.58, 2.17, 1.58, 2.48, 2.70 şeklindedir. Lipinskinin beş kuralına göre ideal aralıkta değer gösteren bileşiklerin bu değerlere göre sudaki çözünürlükleri oldukça yüksektir.

İnhibitörler stabilite göstermesi açısından, düşük moleküler esnekliğe sahip olmalıdır. Döndürülebilir bağlar, moleküler esnekliğin bir ölçüsünü temsil eder. Çalışmamızdaki potansiyel inhibitör bileşiklerin 78 numaralı bileşik dışında ortalama döndürülebilir bağ sayıları 3.5'e yakındır ve katı moleküler yapı iskelesine uygunluğu gösterir. Bileşiklerin inhibisyon etkinliği için sahip olması gereken hidrofilik ve hidrofobik özellikler hidrojen bağı alıcı ve verici sayılarına bakarak yorumlanabilir. Potansiyel inhibitör bileşiklerimiz için bu değerler Lipinski kurallarına göre uygun referans aralığına sahiptir. Sortaz A enzimine karşı belirlenen potansiyel inhibitörlerin ve pozitif kontrol klorheksidinin ADMET analizleri detaylı olarak **Tablo 6'** da özetlenmiştir.

Tablo 6. CHX ve altı potansiyel inhibitör bileşiğin ADMET analizi

Ligand No Özellikler	1 (CHX)	10	12	17	75	78	97	Referans Aralığı
Moleküler ağırlık	506.45	256.25	256.25	240.25	256.25	438.51	324.37	50-500 g/mol
Döndürülebilir bağ sayısı	13	3	3	3	3	7	5	0-5
H-bağı alıcıları	3	4	4	3	4	6	4	0-10
H-bağı vericileri	7	3	3	2	3	3	3	0-5
mLogP (Lipofilite katsayısı)	2.64	1.58	1.58	2.17	1.58	2.48	2.70	0-5
iLogP	0.00	1.70	2.02	1.95	1.75	3.08	3.02	-2- 10
Kutuplaşmış Yüzey Alanı	164.89	77.76	77.76	57.53	77.76	96.22	77.76	20-130 Å ²
Molar Refraktiviti	143.51	72.32	72.32	70.29	72.32	125.34	96.04	40-130
Lipinski Kuralı	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet

Yapılan ADMET çalışma sonuçlarına göre, bu potansiyel inhibitör bileşiklerin, dış çürüğü tedavisinde kullanılmasının güvenli olabileceği ileri sürülebilir. **Tablo 6'**da gösterildiği gibi etkin SrtA-ligand komplekleri, göstermiş oldukları benzer hidrojen bağlama modelleri ve hidrofobik etkileşimler ile uygun ADMET özellikleri sergileyerek farmakokinetik açıdan klorheksidinden üstün özellikler sergilemişlerdir. Bu sonuçlar, doğal bileşiklerin oral biyofilm oluşumunu inhibe etmek için yeni inhibitör ajanlar olarak CHX'e göre klinik açıdan daha güvenilir olabileceğini göstermiştir.

5.TARTIŞMA

Diş çürüğü, tüm yaş gruplarında kaygı, ağrı, diş kaybı, yetersiz beslenmeye neden olmasıyla dünya çapında önemli halk sağlığı sorunları haline gelmiştir (43). Günümüzde diş çürüğü dünya genelinde milyonlarca çocuk için ağız sağlığı ile ilgili yaşam kalitesi açısından sorun oluşturan önemli bir konudur (1, 147). Ayrıca insan vücudunu kapsayan birçok enfeksiyon ve hastalık, oral patojenlerle ilişkilendirilmiştir. Diş çürüğünün küresel olarak genel sağlıkta oynadığı rol, bunu acil bir konu haline getirmektedir (148).

Diş çürüklerinin pato-biyolojisi karmaşık olsa da, diş plağı ve biyofilm oluşumunun diş çürüğünün önemli nedenlerinden olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (5, 18). Temel virülans özelliklerinden en önemlisi diş yüzeyine yapışıp biyofilm tabakası oluşturmak olan *S. mutans*, diş çürüklerinin birincil etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir (8, 54, 62, 67).

Yeni nesil antimikrobiyal terapötikleri geliştirmek için yeni stratejiler geliştirilmektedir ve bunlardan biri spesifik olarak büyüme için gerekli olmayan ve bu nedenle dirençli bakteri oluşumunun önüne geçen virülans yollarının hedeflenmesidir (97). Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin patojenik virülansında temel ve ortak bir adım, bakteriyel yüzey molekülleri ile konakçı dokuya yapışmasıdır. Bu etkileşimin sonucu olarak bakteriler, konakçıdan mekanik olarak uzaklaştırılamamaktadır. Bu sebeple konakçı dokuya yapışmanın engellenmesi, bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi için etkili bir strateji sağlamaktadır (56).

Streptococcus mutans, virülansla ilişkili çok sayıda yüzey proteininin hücre duvarına adezyonu için SrtA enzimini kullanır (70, 149). Sortaz A enzimi, *S.mutans* 'ın sebep olduğu diş çürüğünün engellenmesi için bakteriyel adezyona müdahale eden antibakteriyel ajanların keşfinde iyi bir hedef olarak kabul edilir. Sortaz A, gram-pozitif bakteriyel virülansda oynadığı kilit rolün yanı sıra, ayrıca insanlarda spesifik toksisiteye yol açabilecek hiçbir sortaz homologunun bulunmaması avantajına da sahiptir (86). Bu nedenle, SrtA'nın bakteriyel patogeneze ile ilişkisi birçok çalışmada detaylı bir şekilde incelenmiştir (62, 78, 149-152).

Chen ve ark. (150) SrtA eksikliğinin *S. mutans*'ın fizyolojisi, genetiği ve virülans mekanizmaları üzerindeki etkisinin incelediği bir çalışmada, SrtA eksikliğinin *S. mutans* transkriptomunu (moleküldeki gen dizisi) büyük ölçüde değiştirdiğini ve bunun

sonucunda, *S. mutans*'ın asit toleransının ve ekstrasellüler polisakkarit sentezinin önemli oranda azaldığını gözlemlemiştir.

Benzer şekilde Lee ve ark (83) yaptığı bir çalışmada, SrtA enzimi eksik *S. mutans* suşunda, yüzey proteinlerinin bakteri hücre duvarına bağlanma aktivitesinin kaybolduğu ve bunun sonucunda bakteriyel virülansın zayıflaması ile biyofilm kütlesinin azalarak çürük oluşumunu azalttığı raporlanmıştır. Sortaz A' nın virülansa olan etkileri çeşitli hayvan enfeksiyon modellerinde yürütülen çalışmalarla da doğrulanmıştır (153). 2018 yılında yapılan bir çalışma SrtA'nın *Streptococcus mutans* ve diğer oral bakteriler arasındaki yapışma veya bağlanmaya aracılık etmeye yardımcı olup olmadığını incelemiştir (154). Çalışma sonucunda SrtA'nın eksikliğinin, *S. mutans*' ın *Fusobacterium nucleatum*' a bağlanma yeteneğini azalttığı, ancak diğer tükürük bakterilerine bağlanma profilini önemli ölçüde etkilemediği gösterilmiştir.

Bu bilgilerden yola çıkarak son yıllarda SrtA enzimine karşı inhibitör geliştirilmesi konusunda birçok çalışma gerçekleştirilmiş olup kimyasal peptit yapısında çeşitli inhibitörler geliştirilmiştir (70, 85, 88). Ancak, SrtA'ya karşı yüksek afiniteye sahip ve daha seçici inhibitör geliştirilmesi hala önemini koruyan bir çalışma konusudur.

Günümüzde bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı bakterilerin çeşitli yollarla direnç mekanizması geliştirmesi başka önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu durum bulaşıcı hastalıklara karşı mevcut tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır (155). Bu bağlamda bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmak için bakteri büyümesinden ziyade virülans faktörlerinin inhibisyonuna dayalı olan yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Virülans özelliklerinin çoğu, bakteriyel sağkalım için gerekli olmadığından, bu strateji düşük evrimsel baskı uygulayarak dirençli bakteri suşlarının gelişmesine neden olmamaktadır. Sortaz A'nın bakteriyel büyüme ve canlılık ile değil, virülans ile ilişkili bir hedef olduğu literatürde birçok çalışma ile doğrulanmıştır (70, 75, 149, 150). Bu nedenle çalışmamızda *S. mutans* SrtA enziminin aktivitesinin inhibisyonuna yönelik bir yaklaşım benimsenmiştir.

Wang ve ark (84) yaptığı bir çalışmada, SrtA inhibisyonu yapan Astilbin'in *S. mutans* büyümesini inhibe edip etmediğinin belirlenmesi için, minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) değeri belirlenmiştir. Sonuçlar, astilbin SrtA inhibisyonunun *S. mutans* proliferasyonunu etkilemediğini ve bakteriyel ilaç direncinin gelişmesine yol açmayacağını göstermiştir. Ancak, klorheksidin ve doğal bir bileşik olan kurkuminin *S.*

mutans SrtA üzerindeki antibakteriyel etkisinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise, CHX'e göre daha az bir düşüşe neden olmakla beraber kurkuminin de bakteri sayısında azalmaya sebep olduğu görülmüştür (93). Bu nedenle bu konunun aydınlatılması için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Günümüzde birçok doğal ürün özellikle botanik olarak türetilen moleküller, doğal evrimleri ve daha az direnç geliştirmeleri nedeniyle sentetik türevlere göre avantajlar sunan, alternatif veya yardımcı ilaç tedavileri olarak kabul edilmiştir (115). Diş hekimliğinde sıklıkla kullanılan ve antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış olan klorheksidinin (pozitif kontrol), uzun süre kullanımda oral dokularda ve dişlerde renklenme yapması, tat alma bozukluğuna neden olması gibi yan etkilerinin bulunması, doğal ürünlerden türetilen ve potansiyel olarak terapötik kullanımlara sahip olabilecek bileşiklere artan bir ilgiye sebep olmuştur (156-158).

Flavonoidler ve kalkanlar çoğunlukla bitkilerden elde edilen, geniş bir biyolojik aktiviteye sahip antimikrobiyal doğal bileşiklerdir (95, 100). Çeşitli doğal bitki özlerinin belirgin yapışma önleyici etkisi ve anti-biyofilm özelliklerine sahip olma eğilimiyle beraber genel antimikrobiyal etkisi birçok çalışmada raporlanarak kanıtlanmıştır (90, 91, 96, 114, 115, 156, 159). Diş çürükleriyle mücadelede doğal ürünlerin nasıl kullanılacağına odaklanan çok sayıda makale olmasına rağmen, bakteri inhibisyonunu ölçmek için deneylerde kullanılan yöntemlerin çeşitli sınırlamaları nedeniyle (örneğin; IC₅₀, MIC) bileşiklerin etki mekanizmaları ve kimyasal karakterizasyonu gibi kritik bilgiler, doğal ürünlerin çoğu için hala belirsizdir (156, 157). Ayrıca ağız boşluğundaki çeşitli mikroflora ve sürekli değişen ortam (tükürük, gıda alımı vb.), bakterinin patojenitesini incelemeyi ve tam olarak anlaşılmasını engellemektedir.

Bu nedenle tez çalışmamızda, doğal kaynaklardan yeni SrtA inhibitörleri bulmaya odaklanmanın yanı sıra, enzimin temel yapısal özelliklerini ortaya çıkararak inhibisyon mekanizmasını daha iyi anlamak ve inhibitör ajanları diş çürükleri üzerinde daha güçlü önleyici etkilere sahip olacak şekilde modifiye etmek için moleküler modelleme ve yapı-aktivite ilişkileri analizleri kullanılmıştır.

Yeni bir teknoloji olan moleküler modelleme çalışmaları, mevcut ilaçlara ve hastalıklara ait birikmiş bilgileri diğer sahalardaki disiplinler arası girdilerle birlikte kullanarak ilaç araştırma ve geliştirme sürecini hızlandırmaktadır (10). Bilgisayar destekli

ilaç tasarımı, ilaçların yüksek verimli sanal taramasını gerçekleştirmek için popüler bir yöntem olup yapılacak deneysel çalışmaların zaman kaybını ve maliyet harcamalarını azaltmaktadır (9, 10, 62, 85, 118).

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, SrtA enzimine yönelik özellikle flavonoid ve kalkon türevli bileşikler mevcut veri bankalarından taranarak, bu bileşiklerin *S. mutans* SrtA enziminin biyofilm oluşumu üzerindeki etki mekanizmalarının moleküler modelleme yöntemleriyle incelenmesi ve sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız sonuçlarına göre, literatürde *S. mutans* SrtA enzimine karşı antibakteriyel özelliği birçok çalışma ile kanıtlanmış olan CHX pozitif kontrol olarak kabul edilmiş ve inhibisyon kat sayısı (K_i) 24.45 uM olarak hesaplanmıştır (103-107). Ancak CHX'nin uzun süre kullanımda gösterdiği yan etkiler (99-101) nedeniyle alternatif antibakteriyel bileşik arayışına girilmiştir. Bu sebeple CHX 'e göre daha düşük K_i değeriyle (5.47, 14.72, 16.48, 17.98, 19.48, 20.79 uM) etkin inhibisyon gösteren flavonoid ve kalkon türevli doğal altı bileşik (sırasıyla 78, 10, 75, 12, 17, 97 numaralı bileşikler) potansiyel inhibitör bileşikler olarak belirlenmiştir (**Tablo 4**). Bu bileşiklerin *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel etkisi literatürdeki çalışmalarla uyum göstermiştir (79, 92, 160-163). 2020 yılında Son ve ark. (160) yaptığı antibakteriyel ajanların *S. mutans* üzerindeki inhibitör etkisinin florür vernikle karşılaştırıldığı deneysel bir çalışmada, İzobavakalkon (97 numaralı bileşik) bileşiğinin en yüksek inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, kalkon bleşiklerinin diş çürüğünü önlemede *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel etkisinin yanı sıra kemik rejenerasyonunu da stimule ettiği gösterilmiştir (163).

Çalışmamızda moleküler docking analizi sonucunda Kurarinon (78 numaralı bileşik) bileşiği -7.18 kcal/mol bağlanma enerjisi, 5.47 uM inhibisyon katsayısı ile CHX'e (-6.29 kcal/mol - 24.45 uM) göre oldukça iyi bir inhibisyon sergilemiştir. Flavonoid türevli bir bileşik olan Kurarinon'un, antimikrobiyal etkisi literatürdeki çalışmalarda gösterilse bile, çalışmamız sonucunda aydınlatılan SrtA etki mekanizması da göz önüne alınarak daha fazla deneysel çalışmayla desteklenmelidir (92, 164).

Gram-pozitif bakterilerde bulunan Sortaz enzimlerinde aktif bölgede yer alan arjinin, sistein, histidin (*Arg*, *Cys*, *His*) aminoasitleri yüksek oranda korunmuştur. Wallock-Richards ve ark. diğer SrtA enzimlerine benzer şekilde *S. mutans*'ın SrtA kristal yapısında, üç bitişik β iplikçiğinde bulunan hidrofobik bir cep içinde Cys205 ve Arg213 aminoasitlerinin

bulunduğunu göstermiştir (79). Çalışmamızın enzim-ligand yapısının bağlanma analizi sonuçlarına göre SrtA enzimi ile potansiyel inhibitör bileşikler arasındaki etkileşim mekanizmasında görev alan bölgeler ve aminoasitler belirlenmiştir. Pozitif kontrole göre etkin bulunan potansiyel inhibitör bileşikler, *S. mutans* SrtA enziminin aktif bölgesindeki Arg213, Cys205, His187 ve diğer bölgelerindeki Thr204, Val203, Met123, Leu111, Ser128, Pro185, Ile191, Val190, Ile215, Val188 aminoasitleri ile etkileşimler oluşturmuştur (Tablo 5).

Wang ve ark. yaptıkları bir çalışmada, SrtA-Arg213 mutasyonunun transpeptidaz aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olduğunu ve bu sebeple Arg213' ün SrtA'da çok önemli bir aminoasit kalıntısı olduğunu göstermiştir (84). Aynı zamanda aynı çalışmada Leu111 ve Leu116' nın SrtA'nın flavonoid bileşiklerle bağlanma mekanizmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. *S. mutans* SrtA enzimini hedefleyen potansiyel inhibitörlerin *in siliko* olarak incelendiği başka bir çalışmada, enerji katkıları büyük ölçüde aktif merkezdeki Val203, Thr204, Cys205 ve Arg213'e atfedilmiştir (8).

75 (kalkon) ve 78 (Kurarinon) numaralı bileşikler SrtA enzim bağlanma bölgesinde bulunan ve inhibisyon mekanizmasında oldukça önemli rol oynayan olan Arg213, Cys205 ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Kurarinon'un yüksek bağlanma enerjisinin (-7.18 kcal/mol) bu güçlü hidrojen bağı etkileşimlerinden kaynaklandığı savunulabilir.

İzobavakalkon haricindeki tüm etkin bileşikler Arg213 ile hidrojen bağı oluşumuna katılırken ayrıca tüm bileşikler Pro185 aminoasiti ile hidrojen bağı oluşturmuşlardır. Potansiyel inhibitörlerin Arg213 ile güçlü etkileşimi, SrtA enziminin katalitik aktivitesine müdahale eder ve hücre yüzeyi proteinlerinin daha az bağlanmasına neden olur. Klorheksidin ile karşılaştırıldığında potansiyel bileşiklerin, enzim aktivitesinde önemli olan aminoasitlerle daha güçlü bağlar oluşturması yüksek bağlanma afinitesini açıklamaktadır. Sonuç olarak bu çalışma, hidrojen bağı ile etkileşime giren aminoasitlerin özellikle Arg213, Cys205'ün enzimin etkinliğinde ve yüzey proteinlerine bağlanmada önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Farmakokinetik özelliklerin değerlendirilmesi ilaç geliştirme, ilaç modifikasyonu ve ilaç keşfinde vazgeçilmezdir. Bu özellikler, ilaç adayının ilerlemeye değer olup olmadığını belirler ve ADMET terimi hem *in siliko* hem de *in vitro* ilaç taramasında kullanılır (9, 136). Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yapılan katı talimatlar ve düzenlemeler nedeniyle ve Avrupa Tıbbi Ürünleri Değerlendirme Ajansı (EMA) ilaç toksisitesi ile ilgili olarak, ilaç

araştırmasının önceliğini *in siliko* çalışmalara vermiştir. Çünkü bu kuruluşlar, hayvanların ilaç değerlendirmesine dahil edilmesine şiddetle karşı çıkmaktadırlar (165). Bununla birlikte *in vitro* olarak yapılan ADMET tahmininin, yüksek maliyet ve uzun süre gerektirmesi, önceliği *in siliko* modellemeye vermenin bir başka nedenidir.

Bir bileşiğin ilaç benzerliği, Lipinski'nin beş kuralına göre filtreleyerek kolayca tahmin edilebilmektedir (132, 144). Geleneksel olarak, bu özellikler ilaç üretiminin sonunda tahmin edilebiliyorken, *in siliko* yöntemlerin gelişmesiyle erken aşamada tahmin edilebilir hale gelmiştir (118, 130). Bu özelliklerin erken tahmin edilebilmesi, geleneksel *in vitro*, *in vivo* deneyleri azaltarak ilaç araştırması alanında önemli bir maliyet düşüşüne yol açmıştır.

Çalışmamızda tarama yoluyla elde edilen 102 bileşiğe, ilaç benzerliğinin tahmini için ADMET analizi uygulanmıştır. Bu çalışmadaki mevcut analize bağlı olarak, belirlenen potansiyel inhibitör bileşikler, ADMET tahmin testini geçerek farmokinetik açıdan umut verici adaylar olarak kabul edilmiştir.

Potansiyel inhibitör bileşiklerin çoğu, SrtA enzim kompleksi ile uygun ADMET özellikleri göstermiş ve klorheksidinden daha üstün özellikler ortaya koymuştur (**Tablo 3**). Sonuçlar, bu potansiyel inhibitörlerin, biyofilm oluşumunu inhibe etmek için yeni inhibitör ajanlar olarak güvenle kullanılabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı antimikrobiyal ajanların, *Streptococcus mutans* ' ın Sortaz A enzimi üzerindeki etkinliklerinin moleküler modelleme yöntemleri ile incelendiği çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlar şu şekildedir;

- *S.mutans* SrtA yönelik yeni inhibitör ajanlar geliştirilmesi için moleküler modelleme yöntemleri kullanarak (moleküler docking, ADMET) SrtA enziminin yapı ve etkinlik mekanizmaları moleküler seviyede daha iyi aydınlatılarak ve temel yapısal özellikleri ortaya çıkartılmıştır.

- Bu bilgiler doğrultusunda *S.mutans* SrtA enzim hedefine yönelik taranan 102 adet bileşikten moleküler kenetlenme sonucu belirlenen en etkin doğal altı bileşik (sırasıyla 78, 10, 75, 12, 17, 97 numaralı bileşikler) potansiyel inhibitör bileşikler olarak belirlenmiştir.

- Diş hekimliği pratiğinde uzun zaman alan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalara alternatif olarak moleküler modelleme yöntemlerinin kullanılması, en etkin çıkan bileşiğin ileri ki çalışmalarda kullanılması hedeflenerek çok sayıda inhibitör ajanın daha hızlı bir şekilde test edilmesini, bu sayede gereksiz uygulamalardan etik problemlerden kaçınılmasını ve daha da önemlisi zaman, emek ve maliyet açısından büyük bir avantaj elde edilmesini sağlamıştır.

- *S.mutans* 'ın SrtA enzimine yönelik olarak diş çürüğünü önlemek ve tedavi etmek amacıyla yeni, spesifik ve etkin antimikrobiyal inhibitörlerin moleküler modelleme ile geliştirilerek incelenmesi, gelecekteki diş çürüğü tedavilerinde SrtA' nın inhibitör mekanizmasının daha iyi anlaşılması için önemli bir ölçüm ve bakış açısı sağlayacaktır.

- Şu ana kadar elde edilen sortaz inhibitörlerinin çoğu *S. aureus* inhibisyonu üzerine odaklandığından, *S. mutans* karşı aktif bileşiklerin elde edilmesi diş hekimliği açısından önemli bir gelişme sağlamıştır.

Yeni bir terapötik ajan olarak geliştirilmeye değer umut verici SrtA enzimine yönelik inhibitörlerinin etkinliği, her bir inhibitör için bir anti-virülan rolü kabul edilmeden önce *in-vitro* deneyler ve ileri moleküler simülasyon çalışmaları ile kapsamlı bir şekilde değerlendirilmeli ve desteklenmelidir.

Doğal ürünlerin çoğunun geleneksel tıpta uzun süredir kullanıldığı iddia edilmekle birlikte, klinikte kullanılması planlanıyorsa daha detaylı sitotoksiste testlerine hala ihtiyaç vardır. Ayrıca, doğal ürünlerin çürük önleyici etkileri ile ilgili çalışmalar, antibakteriyel

etkilerin yanı sıra remineralizasyon/demineralizasyon dengesinin sağlanmasına yönelik çalışmalara da odaklanmalıdır.

Sonuçlarımıza göre belirlenen etkin inhibitör bileşikler, enzim inhibisyonunda önemli aminoasit kalıntıları ile etkileşime girerek SrtA'nın aktivitesini inhibe edebileceğini ve *S. mutans* nedenli biyofilm oluşumunu bozabileceğini gösterdi. Bu bileşiklerin ağız çalkalama suları veya diş macunları gibi ağız bakım ürünlerine dahil edilerek, oral hijyen uygulamalarında kullanılabilecek daha efektif ürünlerin geliştirilmesine olanak sağlayacağını düşünmekteyiz.

Özetle bu tez çalışmasının, *S. mutans* SrtA enziminin yapısal özelliklerini ortaya çıkararak inhibisyon mekanizmasının daha iyi anlaşılması ile diş çürüğü tedavisine yönelik yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi için önemli bilimsel katkılar sağlayacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Bachtiar EW, Gultom FP, Rahmasari A, Bachtiar BM (2018). Mutans Streptococci counts from saliva and its protein profile in early childhood caries. *Interventional Medicine and Applied Science* 10(4): 222-225.
2. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007). Dental caries. *The Lancet* 369(9555): 51-59.
3. Clarke JK (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British journal of experimental pathology* 5(3): 141.
4. Bowden G (2000). The microbial ecology of dental caries. *Microbial ecology in health and disease* 12(3): 138-148.
5. Marsh PD (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clinics* 54(3): 441-454.
6. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A (2017). Dental caries. *Nature reviews Disease primers* 3(1): 1-16.
7. Hamada S, Slade HD (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews* 44(2): 331.
8. Luo H, Liang D-F, Bao M-Y, Sun R, Li Y-Y, Li J-Z, Wang X, Lu K-M, Bao J-K (2017). In silico identification of potential inhibitors targeting *Streptococcus mutans* sortase A. *International journal of oral science* 9(1): 53-62.
9. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery* 3(11): 935-949.
10. Lengauer T, Rarey M (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology* 6(3): 402-406.
11. Fejerskov O, Kidd E (2008). Dental caries: the disease and its clinical management 2nd, editor Wiley-Blackwell, Oxford, 3-6.

12. American Academy Of Pediatric Dentistry (2015). Guideline on Caries-risk assessment and management for infants, children, and adolescents. 2014. Clinical Practice Guidelines: 37,132-139.
13. American Academy Of Pediatric Dentistry (2019). Policy on Oral Health Care Programs for Infants, Children, and Adolescents. The Reference Manual of Pediatric Dentistry: 32-33
14. Kagihara LE, Niederhauser VP, Stark M (2009). Assessment, management, and prevention of early childhood caries. Journal of the American Academy of Nurse Practitioners 21(1): 1-10.
15. Mathur VP, Dhillon JK (2018). Dental caries: a disease which needs attention. The Indian Journal of Pediatrics 85(3): 202-206.
16. Mukai Y, Kamijo K, Fujino F, Hirata Y, Teranaka T, Ten Cate JM (2009). Effect of denture base-resin with prereacted glass-ionomer filler on dentin demineralization. European journal of oral sciences 117(6): 750-754.
17. Pinkham J, Casamassimo P, Fields H, Mc Tighe D, Nowak A (2009). Çocuk diş hekimliği. 4.baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara, 199-205.
18. Scheie AA, Petersen FC (2004). The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 15(1): 4-12.
19. Shah S (2018). Paediatric dentistry-novel evolvement. Annals of medicine and surgery 25: 21-29.
20. Samaranayake L, Matsubara VH (2017). Normal oral flora and the oral ecosystem. Dental Clinics 61(2): 199-215.
21. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. Journal of clinical microbiology 43(11): 5721-5732.
22. Hardie J (1992). Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. British Dental Journal 172(7): 271-278.
23. Ding T, Schloss PD (2014). Dynamics and associations of microbial community types across the human body. Nature 509(7500): 357-360.

24. Gest H (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. Notes and records of the Royal Society of London 58(2): 187-201.
25. Marsh PD (1999). Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. Dental clinics of north America 43(4): 599-614, v.
26. Fitzgerald R (1968). Dental caries research in gnotobiotic animals. Caries Research 2(2): 139-146.
27. Keyes P (1960). The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. Archives of oral biology 1(4): 304-IN304.
28. Edgar WM (1990). Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. British dental journal 169(4): 96-98.
29. Loesche WJ (1979). Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. Journal of Dental Research 58(12): 2404-2412.
30. Marsh PD (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Advances in dental research 8(2): 263-271.
31. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? Frontiers in cellular and infection microbiology 4: 92.
32. Banas JA, Drake DR (2018). Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? BMC oral health 18(1): 129.
33. Motisuki C, Lima LM, Spolidorio DMP, Santos-Pinto L (2005). Influence of sample type and collection method on Streptococcus mutans and Lactobacillus spp. counts in the oral cavity. Archives of Oral Biology 50(3): 341-345.
34. Çakır FY, Gürkan S, Attar N (2010). Çürük mikrobiyolojisi. Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 34(3): 78-91.
35. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A (2014). The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 33(4): 499-515.

36. Coykendall AL (1989). Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical Microbiology Reviews* 2(3): 315-328.
37. Whiley R, Beighton D (1998). Current classification of the oral streptococci. *Oral microbiology and immunology* 13(4): 195-216.
38. Larsen T, Fiehn NE (2017). Dental biofilm infections—an update. *Apmis* 125(4): 376-384.
39. Edwardsson S (1968). Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Archives of oral biology* 13(6): 637-646.
40. Lindquist B, Emilson C (1990). Distribution and prevalence of mutans streptococci in the human dentition. *Journal of dental research* 69(5): 1160-1166.
41. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA (2013). *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS pathog* 9(10): e1003616.
42. Peker MS (2007). *Streptococcus mutans*' in anne çocuk geçişinin ap-pcr metoduyla saptanması ve diş çürüğü ile ilişkisi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
43. Loesche WJ (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews* 50(4): 353.
44. Jing C, Lei C, Xuedong Z, Xian P (2018). Recent achievements in the microbiological etiology of dental caries. *West China journal of stomatology* 36(1): 104-108.
45. Krasse B, Jordan H, Edwardsson S, Svensson I, Trell L (1968). The occurrence of certain “caries-inducing” streptococci in human dental plaque material: With special reference to frequency and activity of caries. *Archives of Oral Biology* 13(8): 911-918.
46. Loesche W, Rowan J, Straffon L, Loos P (1975). Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infection and immunity* 11(6): 1252-1260.
47. Littleton N, Kakehashi S, Fitzgerald R (1970). Recovery of specific “caries-inducing” streptococci from carious lesions in the teeth of children. *Archives of oral biology* 15(5): 461-463.

48. Roberson T, Heymann HO, Swift Jr EJ (2010). In: Sturdevant's art and science of operative dentistry Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 67- 134.
49. Caufield P, Cutter G, Dasanayake A (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Journal of dental research* 72(1): 37-45.
50. Rosenblatt R, Steinberg D, Mankuta D, Zini A (2015). Acquired oral microflora of newborns during the first 48 hours of life. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 39(5): 442-446.
51. Tanner A, Milgrom P, Kent Jr R, Mokeem S, Page R, Riedy C, Weinstein P, Bruss J (2002). The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *Journal of dental research* 81(1): 53-57.
52. Koçanalı B, Ak AT, Coğulu D (2014). Çocuklarda diş çürüğüne neden olan faktörlerin incelenmesi. *Pediatric Research* 1(2): 76-79.
53. Tenovuo J, Häkkinen P, Paunio P, Emilson C (1992). Effects of chlorhexidine-fluoride gel treatments in mothers on the establishment of mutans streptococci in primary teeth and the development of dental caries in children. *Caries research* 26(4): 275-280.
54. Köhler B, Andréen I (2012). Mutans streptococci and caries prevalence in children after early maternal caries prevention: a follow-up at 19 years of age. *Caries research* 46(5): 474-480.
55. Nitulescu G, Zanfirescu A, Olaru OT, Nicorescu IM, Nitulescu GM, Margina D (2016). Structural analysis of sortase A inhibitors. *Molecules* 21(11): 1591.
56. Cascioferro S, Cusimano MG, Schillaci D (2014). Antiadhesion agents against Gram-positive pathogens. *Future microbiology* 9(10): 1209-1220.
57. Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB (2005). Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *Journal of oral science* 47(2): 59-64.
58. Koo H, Xiao J, Klein MI (2009). Extracellular polysaccharides matrix—an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *International journal of oral science* 1(4): 229.

59. Jensen M, Wefel J (1989). Human plaque pH responses to meals and the effects of chewing gum. *British dental journal* 167(6): 204-208.
60. Banas JA (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci* 9(10): 1267-1277.
61. Gibbons R (1996). Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *Journal of dental research* 75(3): 866-870.
62. Scharnow AM, Solinski AE, Wuest WM (2019). Targeting *S. mutans* biofilms: a perspective on preventing dental caries. *MedChemComm* 10(7): 1057-1067.
63. Wan A, Seow W, Purdie D, Bird P, Walsh L, Tudehope D (2003). A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. *Journal of dental research* 82(7): 504-508.
64. Schilling KM, Bowen WH (1992). Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* 60(1): 284-295.
65. Munro C, Michalek SM, Macrina FL (1991). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. *Infection and immunity* 59(7): 2316-2323.
66. Kuramitsu HK (1993). Virulence factors of *mutans streptococci*: role of molecular genetics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 4(2): 159-176.
67. Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen Z, Kajfasz J, Freires I, Abranches J, Brady L (2019). The biology of *Streptococcus mutans*. *Gram-Positive Pathogens*: 435-448.
68. Rolla G, Waaler S, Kjaerheim V (1998). Concepts in dental plaque formation. *Oral biofilms and plaque control* Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 1-18.
69. Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T (2001). Contributions of three glucosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of dental research* 80(7): 1672-1677.
70. Cascioferro S, Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, Schillaci D, Daidone G (2015). 2015/12/10. Sortase A Inhibitors: Recent Advances and Future Perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry* 58(23): 9108-9123. 10.1021/acs.jmedchem.5b00779.

71. Vengadesan K, Narayana SV (2011). Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins. *Protein science* 20(5): 759-772.
72. Avilés-Reyes A, Miller JH, Lemos JA, Abranches J (2017). Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci. *Molecular oral microbiology* 32(2): 89-106.
73. Dramsi S, Trieu-Cuot P, Bierne H (2005). Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Research in microbiology* 156(3): 289-297.
74. Clancy KW, Melvin JA, McCafferty DG (2010). Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. *Peptide Science* 94(4): 385-396.
75. Spirig T, Weiner EM, Clubb RT (2011). Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology* 82(5): 1044-1059.
76. Frankel BA, Bentley M, Kruger RG, McCafferty DG (2004). Vinyl sulfones: inhibitors of SrtA, a transpeptidase required for cell wall protein anchoring and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Chemical Society* 126(11): 3404-3405.
77. Race PR, Bentley ML, Melvin JA, Crow A, Hughes RK, Smith WD, Sessions RB, Kehoe MA, McCafferty DG, Banfield MJ (2009). Crystal structure of *Streptococcus pyogenes* Sortase A implications for sortase mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 284(11): 6924-6933.
78. Lévesque CM, Voronejskaia E, Huang Y-CC, Mair RW, Ellen RP, Cvitkovitch DG (2005). Involvement of sortase anchoring of cell wall proteins in biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* 73(6): 3773-3777.
79. Wallock-Richards DJ, Marles-Wright J, Clarke DJ, Maitra A, Dodds M, Hanley B, Campopiano DJ (2015). Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone. *Chemical communications* 51(52): 10483-10485.
80. Ilangovan U, Ton-That H, Iwahara J, Schneewind O, Clubb RT (2001). Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(11): 6056-6061.

81. Köksal M (2017). Sortaz A Enzimine Karşı İnhibitör Peptitlerin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
82. Igarashi T, Asaga E, Goto N (2003). The sortase of *Streptococcus mutans* mediates cell wall anchoring of a surface protein antigen. *Oral microbiology and immunology* 18(4): 266-269.
83. Lee SF, Boran TL (2003). Roles of sortase in surface expression of the major protein adhesin P1, saliva-induced aggregation and adherence, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* 71(2): 676-681.
84. Wang J, Shi Y, Jing S, Dong H, Wang D, Wang T (2019). Astilbin inhibits the activity of Sortase A from *Streptococcus mutans*. *Molecules* 24(3): 465.
85. Guo Y, Cai S, Gu G, Guo Z, Long Z (2015). Recent progress in the development of sortase A inhibitors as novel anti-bacterial virulence agents. *Rsc Advances* 5(62): 49880-49889.
86. Oniga SD, Araniciu C, Palage MD, Popa M, Chifiriuc M-C, Marc G, Pirnau A, Stoica CI, Lagoudis I, Dragoumis T (2017). New 2-phenylthiazoles as potential sortase a inhibitors: Synthesis, biological evaluation and molecular docking. *Molecules* 22(11): 1827.
87. Maresso AW, Wu R, Kern JW, Zhang R, Janik D, Missiakas DM, Duban M-E, Joachimiak A, Schneewind O (2007). Activation of inhibitors by sortase triggers irreversible modification of the active site. *Journal of Biological Chemistry* 282(32): 23129-23139.
88. Oh K-B, Kim S-H, Lee J, Cho W-J, Lee T, Kim S (2004). Discovery of diarylacrylonitriles as a novel series of small molecule sortase A inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 47(10): 2418-2421.
89. Scott CJ, McDowell A, Martin SL, Lynas JF, Vandenbroeck K, Walker B (2002). Irreversible inhibition of the bacterial cysteine protease-transpeptidase sortase (SrtA) by substrate-derived affinity labels. *Biochemical Journal* 366(3): 953-958.
90. Huang P, Hu P, Zhou SY, Li Q, Chen WM (2014). Morin inhibits sortase A and subsequent biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Current microbiology* 68(1): 47-52.
91. Yang W-Y, Kim C-K, Ahn C-H, Kim H, Shin J, Oh K-B (2016). Flavonoid glycosides inhibit sortase A and sortase A-mediated aggregation of *Streptococcus mutans*,

an oral bacterium responsible for human dental caries. *J Microbiol Biotechnol* 26(9): 1566-1569.

92. Yang W-Y, Won TH, Ahn C-H, Lee S-H, Yang H-C, Shin J, Oh K-B (2015). Streptococcus mutans sortase A inhibitory metabolites from the flowers of *Sophora japonica*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25(7): 1394-1397.

93. Li B, Li X, Lin H, Zhou Y (2018). Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans*. *BioMed research international* 2018.

94. Walsh T, Oliveira-Neto JM, Moore D (2015). Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (4).

95. Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological research* 165(6): 496-504.

96. Park W, Ahn C-H, Cho H, Kim C-K, Shin J, Oh K-B (2017). Inhibitory effects of flavonoids from *Spatholobus suberectus* on sortase A and sortase A-mediated aggregation of *Streptococcus mutans*. *J Microbiol Biotechnol* 27(8): 1457-1460.

97. Nitulescu G, Nicorescu IM, Olaru OT, Ungurianu A, Mihai DP, Zangfirescu A, Nitulescu GM, Margina D (2017). Molecular docking and screening studies of new natural sortase A inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 18(10): 2217.

98. Denton GW (1991). Chlorhexidine: Disinfection, sterilization and preservation Lea and Febiger, 4th ed Philadelphia, 89-274.

99. Karpiński T, Szkaradkiewicz A (2015). Chlorhexidine–pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19(7): 1321-1326.

100. Slot D, Vaandrager N, Van Loveren C, Helderma WVP, Van der Weijden G (2011). The effect of chlorhexidine varnish on root caries: a systematic review. *Caries research* 45(2): 162-173.

101. Manipal S, Hussain S, Wadgave U, Duraiswamy P, Ravi K (2016). The mouthwash war-chlorhexidine vs. herbal mouth rinses: A meta-analysis. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 10(5): ZC81.

102. Russell A, Day M (1993). Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection* 25(4): 229-238.
103. Asokan S, Rathan J, Muthu M, Rathna PV, Emmadi P (2008). Effect of oil pulling on *Streptococcus mutans* count in plaque and saliva using Dentocult SM Strip mutans test: A randomized, controlled, triple-blind study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 26(1): 12.
104. Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B (2011). Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 23(1): 46-55.
105. Grossman E, Reiter G, Sturzenberger O, De La Rosa M, Dickinson T, Flrretti G, Ludlam G, Meckel A (1986). Six-month study of the effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. *Journal of Periodontal Research* 21: 33-43.
106. Nadkerny PV, Ravishankar PL, Pramod V, Agarwal LA, Bhandari S (2015). A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology* 19(6): 633.
107. Tüzüner T, Ulusoy AT, Baygin O, Yahyaoglu G, Yalcin I, Buruk K, Nicholson J (2013). Direct and transdental (indirect) antibacterial activity of commercially available dental gel formulations against *Streptococcus mutans*. *Medical Principles and Practice* 22(4): 397-401.
108. Flötra L, Gjermo P, RÖLLA G, WAERHAUG J (1971). Side effects of chlorhexidine mouth washes. *European Journal of Oral Sciences* 79(2): 119-125.
109. Elias D, Beazely M, Kandepu N (1999). Bioactivities of chalcones. *Current medicinal chemistry* 6(12): 1125.
110. Singh P, Anand A, Kumar V (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *European journal of medicinal chemistry* 85: 758-777.
111. Bandgar BP, Gawande SS, Bodade RG, Gawande NM, Khobragade CN (2009). Synthesis and biological evaluation of a novel series of pyrazole chalcones as anti-

inflammatory, antioxidant and antimicrobial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17(24): 8168-8173.

112. Cassidy A, Minihane A-M (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American journal of clinical nutrition* 105(1): 10-22.

113. Panche A, Diwan A, Chandra S (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science* 5.

114. Banavar Ravi S, Nirupad S, Chippagiri P, Pandurangappa R (2017). Antibacterial effects of natural herbal extracts on streptococcus mutans: can they be potential additives in dentifrices? *International journal of dentistry* 2017.

115. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL (2016). Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Frontiers in Microbiology* 6: 1529.

116. Bayel Secinti B, Tatar G, Taskin Tok T (2019). Determination of potential selective inhibitors for ROCKI and ROCKII isoforms with molecular modeling techniques: structure based docking, ADMET and molecular dynamics simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 37(9): 2457-2463.

117. Cohen NC (1996). The molecular modeling perspective in drug design. *Guidebook on molecular modeling in drug design*. Elsevier, 1-17.

118. Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, Dzobo K (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *International journal of molecular sciences* 19(6): 1578.

119. Dixon SL, Smondyrev AM, Rao SN (2006). PHASE: a novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching. *Chemical biology & drug design* 67(5): 370-372.

120. Tatar G, Taskin Tok T (2016). Clarification of interaction mechanism of mouse hepatitis virus (MHV) N and nsp3 protein with homology modeling and protein-protein docking analysis. *Current computer-aided drug design* 12(2): 98-106.

121. Coleman RG, Carchia M, Sterling T, Irwin JJ, Shoichet BK (2013). Ligand pose and orientational sampling in molecular docking. *PloS one* 8(10): e75992.
122. Kramer B, Rarey M, Lengauer T (1999). Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 37(2): 228-241.
123. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of molecular biology* 267(3): 727-748.
124. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK (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.
125. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* 30(16): 2785-2791.
126. 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.
127. Molecular Operating Environment IC-AMD. [online]. Available from: [Http://www.chemcomp.com](http://www.chemcomp.com) (2019)
128. Puri M, Pathak Y, Sutariya VK, Tipparaju S, Moreno W (2016). Artificial neural network for drug design, delivery and disposition Elsevier Inc Amsterdam TN, editor Elsevier Inc Amsterdam, The Netherlands, Netherlands, 123-139 123-139.
129. Van De Waterbeemd H, Gifford E (2003). ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nature reviews Drug discovery* 2(3): 192-204.
130. Ferreira LL, Andricopulo AD (2019). ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug discovery today* 24(5): 1157-1165.
131. Gleeson MP (2008). Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *Journal of medicinal chemistry* 51(4): 817-834.

132. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews* 23(1-3): 3-25.
133. Karakuş S, Tok F, Türk S, Salva E, Tatar G, Taskın-Tok T, Kocyigit-Kaymakcıoğlu B (2018). Synthesis, anticancer activity and ADMET studies of N-(5-methyl-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl)-4-[(3-substituted) ureido/thioureido] benzenesulfonamide derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 193(8): 528-534.
134. Systèmes D (2016). Biovia, discovery studio modeling environment. Dassault Systèmes Biovia: San Diego, CA, USA.
135. Release S (2019-3). 4: QikProp. Schrödinger, LLC, New York, NY.
136. Daina A, Michielin O, Zoete V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017; 7: 42717.
137. Cruciani G, Crivori P, Carrupt P-A, Testa B (2000). Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 503(1-2): 17-30.
138. Gola J, Obrezanova O, Champness E, Segall M (2006). ADMET property prediction: the state of the art and current challenges. *QSAR & Combinatorial Science* 25(12): 1172-1180.
139. Ekins S, Bugrim A, Brovold L, Kirillov E, Nikolsky Y, Rakhmatulin E, Sorokina S, Ryabov A, Serebryiskaya T, Melnikov A (2006). Algorithms for network analysis in systems-ADME/Tox using the MetaCore and MetaDrug platforms. *Xenobiotica* 36(10-11): 877-901.
140. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research* 32(suppl_2): W665-W667.
141. Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, Light Y, McGlinchey S, Michalovich D, Al-Lazikani B (2012). ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic acids research* 40(D1): D1100-D1107.

142. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research* 47(D1): D1102-D1109.
143. Irwin JJ, Shoichet BK (2005). ZINC— a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling* 45(1): 177-182.
144. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry* 45(12): 2615-2623.
145. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25(13): 1605-1612.
146. Ravindranath PA, Forli S, Goodsell DS, Olson AJ, Sanner MF (2015). AutoDockFR: advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. *PLoS computational biology* 11(12): e1004586.
147. European Academy of Pediatric Dentistry (2008). Guidelines on Prevention of Early Childhood Caries: An EAPD Policy Document
148. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdela J, Abdelalim A (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 392(10159): 1789-1858.
149. Cascioferro S, Totsika M, Schillaci D (2014). Sortase A: an ideal target for anti-virulence drug development. *Microbial pathogenesis* 77: 105-112.
150. Chen X, Liu C, Peng X, He Y, Liu H, Song Y, Xiong K, Zou L (2019). Sortase A-mediated modification of the *Streptococcus mutans* transcriptome and virulence traits. *Molecular oral microbiology* 34(5): 219-233.
151. Igarashi T, Asaga E, Goto N (2004). Roles of *Streptococcus mutans* dextranase anchored to the cell wall by sortase. *Oral microbiology and immunology* 19(2): 102-105.

152. Ahn S-J, Ahn S-J, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA (2008). Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infection and immunity* 76(9): 4259-4268.
153. Weiss WJ, Lenoy E, Murphy T, Tardio L, Burgio P, Projan SJ, Schneewind O, Alksne L (2004). Effect of *srtA* and *srtB* gene expression on the virulence of *Staphylococcus aureus* in animal models of infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(3): 480-486.
154. Song Y, He J-z, Wang R-k, Ma J-z, Zou L (2018). Effect of SrtA on interspecies adherence of oral bacteria. *Current Medical Science* 38(1): 160-166.
155. Ruer S, Pinotsis N, Steadman D, Waksman G, Remaut H (2015). Virulence-targeted antibacterials: Concept, promise, and susceptibility to resistance mechanisms. *Chemical Biology & Drug Design* 86(4): 379-399.
156. Cheng L, Li J, He L, Zhou X (2015). Natural products and caries prevention. *Caries Research* 49(Suppl. 1): 38-45.
157. Jeon J-G, Rosalen P, Falsetta M, Koo H (2011). Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries research* 45(3): 243-263.
158. Taheri Jb AS, Rafieian N, Zanjani Ha (2011). Herbs in dentistry. *International dental journal* 61(6): 287-296.
159. Hu P, Huang P, Chen WM (2013). Curcumin inhibits the Sortase A activity of the *Streptococcus mutans* UA159. *Applied biochemistry and biotechnology* 171(2): 396-402.
160. Son JL, Kim AJ, Oh S, BAE JM (2020). Inhibitory effects on *Streptococcus mutans* of antibacterial agents mixed with experimental fluoride varnish. *Dental Materials Journal* 39(4): 690-695.
161. Zhou B, Xing C (2015). Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. *Medicinal chemistry* 5(8): 388.
162. Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahy M (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research* 33(1): 13-40.

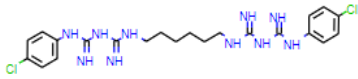
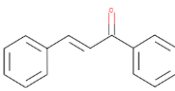
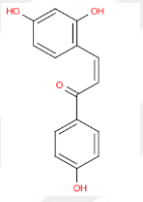
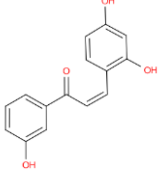
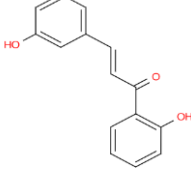
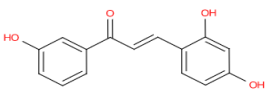
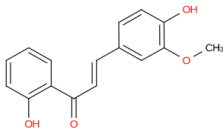
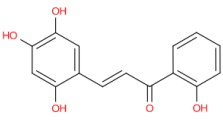
163. Choi D, Park JC, Lee HN, Moon J-H, Ahn H-w, Park K, Hong J (2018). In Vitro Osteogenic Differentiation and Antibacterial Potentials of Chalcone Derivatives. *Molecular pharmaceutics* 15(8): 3197-3204.
164. Chen L, Cheng X, Shi W, Lu Q, Go VL, Heber D, Ma L (2005). Inhibition of growth of *Streptococcus mutans*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and vancomycin-resistant enterococci by kurarinone, a bioactive flavonoid isolated from *Sophora flavescens*. *Journal of clinical microbiology* 43(7): 3574-3575.
165. Benz RD (2007). Toxicological and clinical computational analysis and the US FDA/CDER. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 3(1): 109-124.

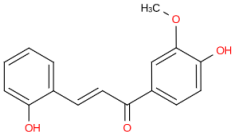
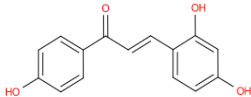
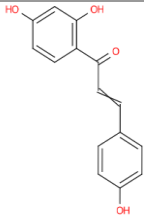
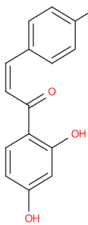
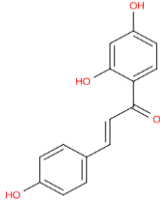
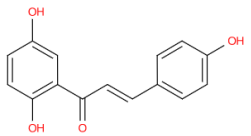
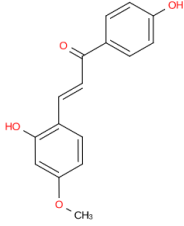


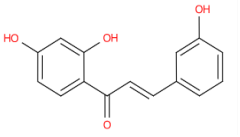
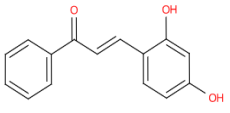
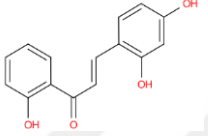
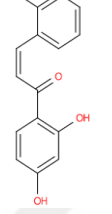
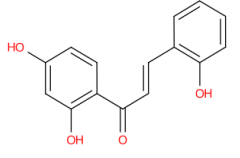
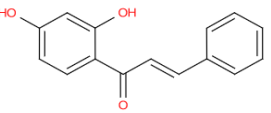
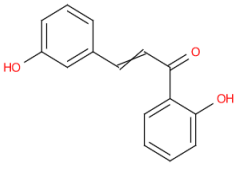
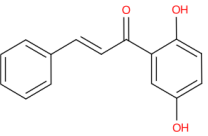


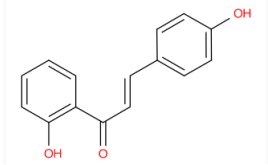
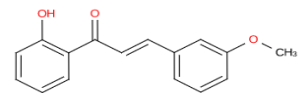
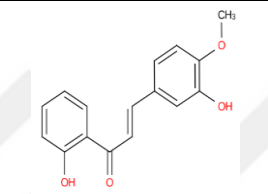
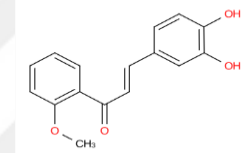
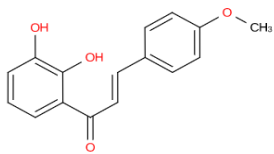
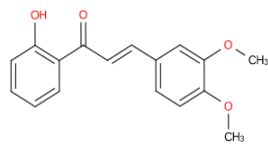
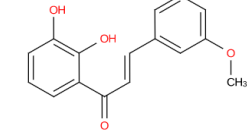
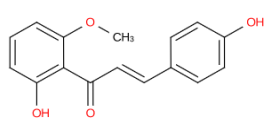
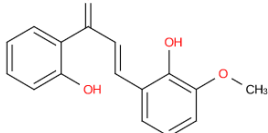
EKLER

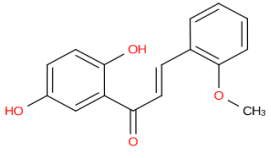
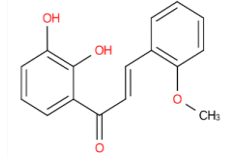
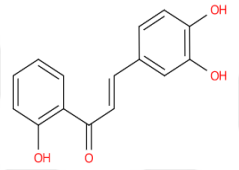
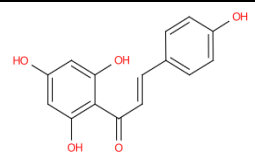
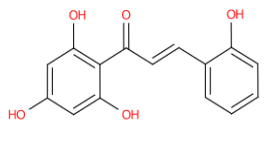
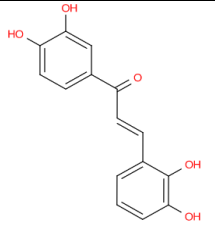
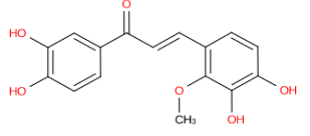
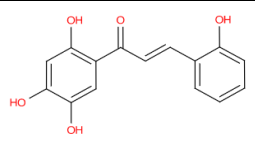
EK Tablo 1. *S. mutans* SrtA enziminin inhibisyonuna yönelik literatür ve veri tabanlarından elde edilen 102 ligandın, 2B kimyasal yapısı, bağlanma enerjisi ve K_i değerleri

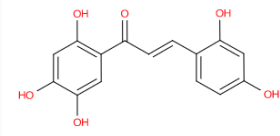
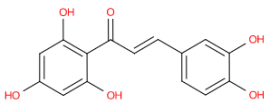
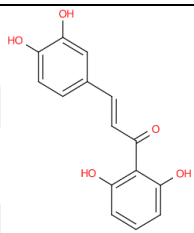
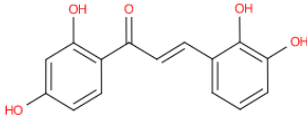
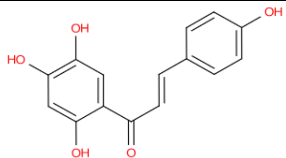
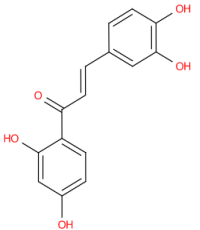
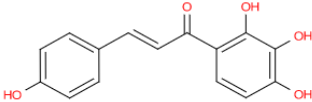
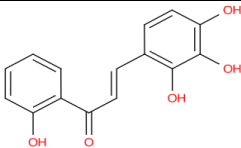
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K_i (μ M)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
f1	Klorheksidin		24.45	-6.29
2	Trans-kalkon		61.22	-5.75
3	CHEMBL3823460		35.40	-6.07
4	CHEMBL3335595		33.80	-6.10
5	CHEMBL3823220		42.05	-5.97
6	CHEMBL3335590		27.64	-6.22
7	CHEMBL130640		43.19	-5.95
8	CHEMBL3824127		120	-5.35

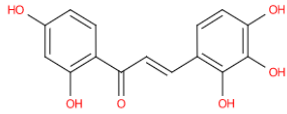
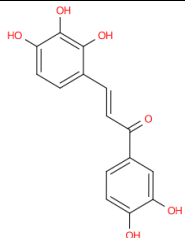
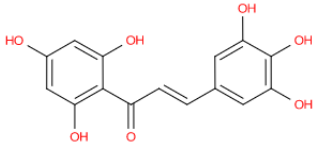
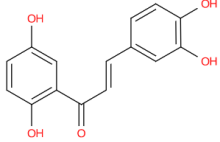
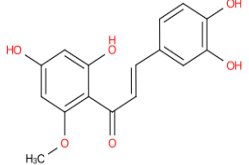
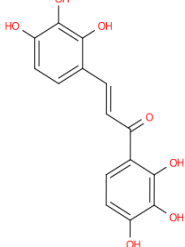
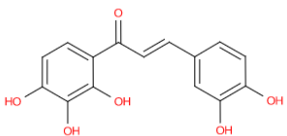
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
9	CHEMBL3823901		47.43	-5.90
10	CHEMBL3335591		16.48	-6.53
11	CHEMBL3183256		46.69	-5.91
12	CHEMBL1395334		17.98	-6.47
13	CHEMBL129795		47.47	-5.90
14	CHEMBL2297684		40.56	-5.99
15	CHEMBL3814168		59.28	-5.77

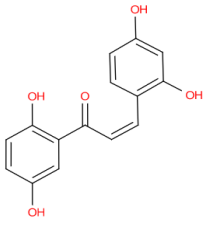
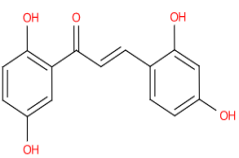
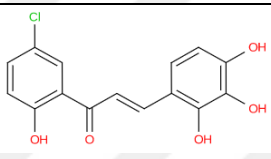
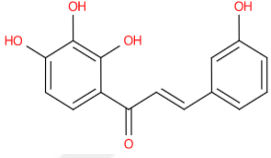
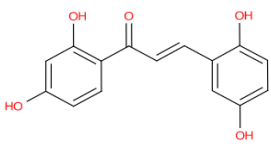
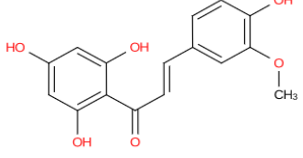
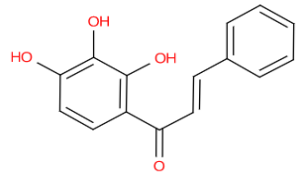
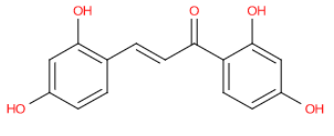
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
16	CHEMBL1083821		30.13	-6.17
17	CHEMBL373249		19.48	-6.43
18	CHEMBL1256531		34.49	-6.09
19	CHEMBL1976915		56.17	-5.80
20	CHEMBL148472		46.35	-5.91
21	CHEMBL105310		37.41	-6.17
22	CHEMBL1703955		34,72	-6.04
23	CHEMBL1255773		43.34	-5.95

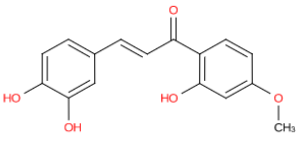
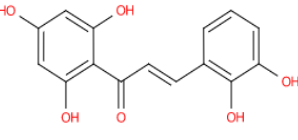
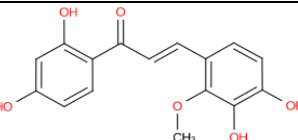
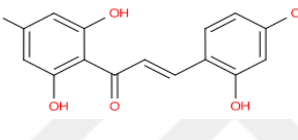
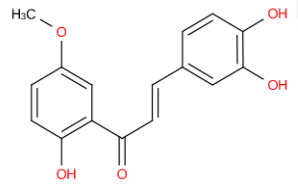
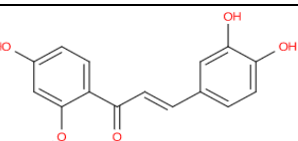
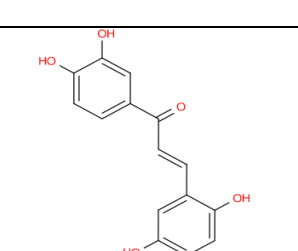
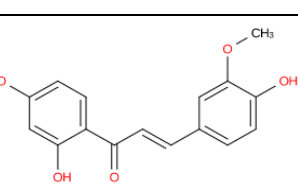
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
24	CHEMBL126804		59.01	-5.77
25	CHEMBL594853		39.30	-6.01
26	CHEMBL340067		55.12	-5.81
27	CHEMBL125854		30.98	-6.15
28	CHEMBL4087168		90.99	-5.51
29	CHEMBL389328		67.22	-5.69
30	CHEMBL4067328		70.11	-5.67
31	CHEMBL2297687		84.42	-5.56
32	CHEMBL2403799		60.29	-5.76

Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
33	CHEMBL4070048		33.35	-6.11
34	CHEMBL4083985		54.57	-5.82
35	CHEMBL339587		58.00	-5.78
36	CHEMBL338066		100.83	-5.45
37	CHEMBL2180474		89,07	-5.53
38	CHEMBL3753041		55.41	-5.81
39	CHEMBL3099519		49.85	-5.87
40	CHEMBL3335593		70.83	-5.66

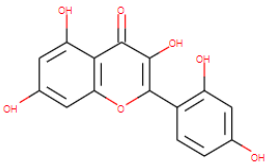
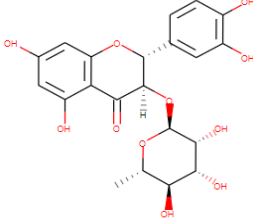
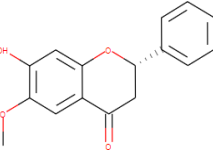
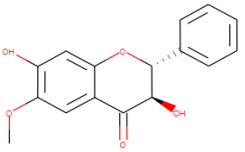
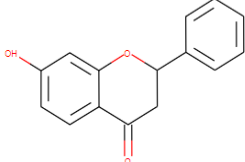
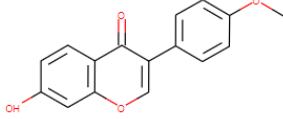
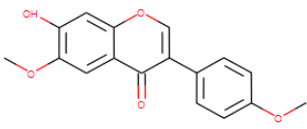
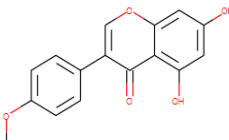
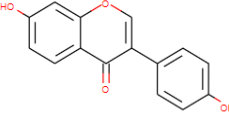
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
41	CHEMBL3335594		46.36	-5.91
42	CHEMBL127409		164.07	-5.16
43	CHEMBL3752751		167.94	-5.15
44	CHEMBL2180475		45.61	-5.92
45	CHEMBL3931659		52.09	-5.84
46	CHEMBL128000		54.78	-5.81
47	CHEMBL3780469		71.57	-5.66
48	CHEMBL1256533		55.10	-5.81

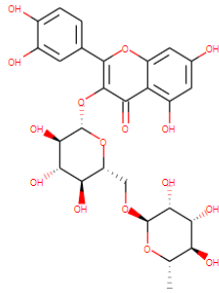
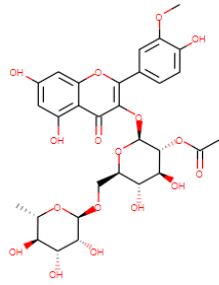
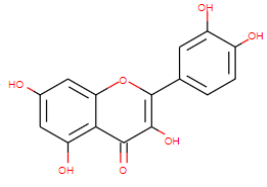
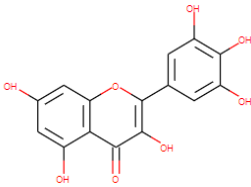
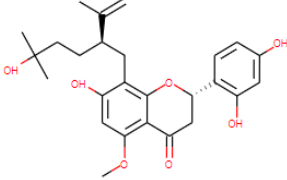
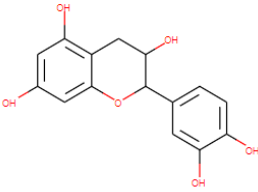
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
49	CHEMBL2297672		45.26	-5.93
50	CHEMBL3754732		37.18	-6.04
51	CHEMBL429284		289.18	-4.83
52	CHEMBL125800		51,01	-5.86
53	CHEMBL494612		82.55	-5.57
54	CHEMBL3754082		88.08	-5.53
55	CHEMBL222557		112.38	-5.39

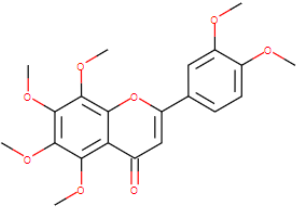
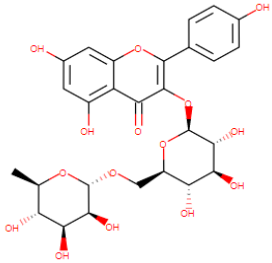
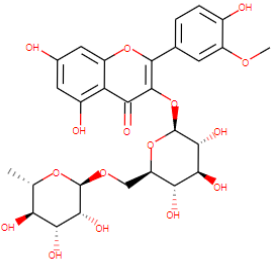
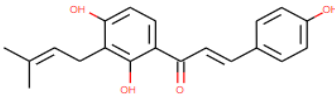
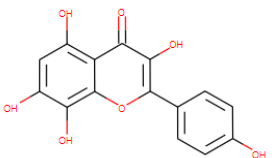
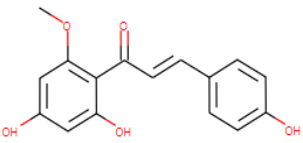
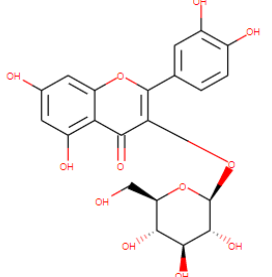
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
56	CHEMBL3335596		53.00	-5.83
57	CHEMBL3335592		51.50	-5.85
58	CHEMBL2297683		47.33	-5.90
59	CHEMBL1082538		73.25	-5.64
60	CHEMBL2180476		735.86	-4.27
61	CHEMBL2235294		91.16	-5.51
62	CHEMBL319918		410.62	-4.62
63	CHEMBL394855		27.98	-6.21

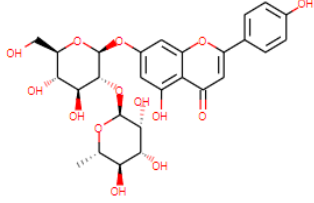
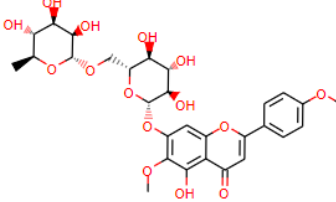
Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
64	CHEMBL340244		256.58	-4.90
65	CHEMBL243619		108.00	-5.41
66	CHEMBL3099518		60.18	-5.76
67	CHEMBL244249		93.28	-5.50
68	CHEMBL126621		77.64	-5.61
69	CHEMBL476986		38.47	-6.02
70	CHEMBL3754006		43.45	-5.95
71	CHEMBL144686		38.90	-6.02

Ligand Numara	Ligand İsim	Ligand Kimyasal Yapısı	K _i (uM)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
72	CHEMBL3799023		62.09	-5.74
73	CHEMBL2437372		34.96	-6.08
74	CHEMBL513784		59.75	-5.76
75	CHEMBL2180472		14.72	-6.59
76	CHEMBL228205		24.52	-6.29
77	CHEMBL2263299		30.66	-6.16
78	Kurarinone		5.47	-7.18

79	Morin		84,23	-5.56
80	Astilbin		— *	— *
81	7-Hydroxy-6-methoxyflavanone		63.51	-5.73
82	(2S,3R)-3,7-dihydroxy-6-methoxyflavanone		48.56	-5.88
83	7-hydroxyflavanone		26.22	-6.25
84	Formononetin		148.16	-5.22
85	Afromosin (Castanin)		112.33	-5.39
86	5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone (Biochanin)		291.74	-4.82
87	Daidzein		243.59	-4.93

88	Rutin (Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside)		—	—
89	Quercetin-3'-O-methyl-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside		—	—
90	Quercetin		90.37	-5.52
91	Myricetin		155.95	-5.19
92	Kurarinol		69.27	-5.67
93	Catechin (Yeşil çay ekstratı)		81.79	-5.58

94	Citrus sinensis L. (Nobiletin) (Narenciye özü)		190.19	-5.08
95	Kaempferol-3-rutinoside		—	—
96	İsorhamnetin 3-O- β -d-rutinoside (Narcissin)		—	—
97	Isobavachalcone ChEMBL253467		20.79	-6.39
98	Herbacetin		226.47	-4.97
99	Helichrysetin		81.13	-5.58
100	Quercetin 3-beta-D-glucoside (Isoquarcetin)		—	—

101	Rhoifolin		—	—
102	Pectolinarin		—	—

*: Farmakokinetik açıdan uygun bulunmayan bileşiklerin docking analizi yapılmadığı için, bu bileşiklerin K_i ve enerji değerleri “-” şeklinde belirtilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik No : 63343343920
Soyadı, Adı : Salmanlı, Merve
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.07.1993 - Ankara
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 (462) 377 4771 / 4808
E-posta : mervesalmanli@outlook.com
Yazışma Adresi : K.T.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti A.B.D Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans/Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2016
Lise	Kayseri Fen Lisesi	2011

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	K.T.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi	2017-

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR / BİLDİRİLER

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN BİLDİRİLER

- 1) Salmanlı, M., Kurt A., Altıntaş N., Tüzüner T. Pulpa Kanal Obliterasyonu Görülen Dişde Endodontik Ve Cerrahi Tedvi Yaklaşımı: Olgu Sunumu. İZDO 25. Uluslararası Bilimsel Kongre ve Sergisi, İzmir, Türkiye, 9-11 Kasım 2018 (Poster Sunumu)
- 2) Salmanlı, M., Yılmaz N., Tüzüner T., Baygın Ö. ‘Farklı Eğitim Dönemlerinde Bulunan Bir Grup Dişhekimliği Öğrencisinde Sterilizasyon Ve Çapraz Enfeksiyon İle İlgili Bilgi, Tutum Ve Uygulama Düzeylerinin Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi’. TDB 25. Uluslararası Dişhekimliği Kongresi, İstanbul, Türkiye 4 -7 Eylül 2019 (Sözlü Bildiri)
- 3) Salmanlı, M., Tatar G., Tuzuner T., Yılmaz N., Baygın O. Evaluation Of Two Different Antibacterial Agents For Inhibition Of Streptococcus Mutans-Sortase A Enzyme Structure By Molecular Docking Method. 26. International Congress of Turkish Society of Pediatric Dentistry, Antalya, Türkiye, 10-13 October 2019 (Poster Sunumu- En İyi Poster 1.lik Ödülü)

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

- 1) Sortaz A enzimine yönelik yeni antimikrobiyal inhibitörlerin moleküler modelleme yöntemleri ile geliştirilmesi (3662) Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) Hesaplamalı Yapısal Biyoloji Projesi- 2019 (Araştırmacı).