

**Antimikrobiyel Ajanların Etkisini Anlamak İçin Sistem
Biyolojisi Yaklaşımı ile Birleştirilmiş OMİK Verilerin Analizi**

Program Kodu: 2527

Proje No: 113M052

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Berna SARIYAR AKBULUT

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Dilek KAZAN

Yard. Doç. Dr. N. Alpagu SAYAR

Bursiyer(ler):

Nilay BÜDEYRİ GÖKGÖZ

Fatma Gizem AVCI

Dilara AYYILDIZ

Ezgi AKAN

İpek KARACAN

Deniz YILMAZ

Eldin KURPEJOVIĆ

EYLÜL 2017

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Antimikrobiyel Ajanların Etkisini Anlamak İçin Sistem Biyolojisi Yaklaşımı ile Birleştirilmiş OMİK Verilerin Analizi başlıklı, 113M052 sayılı bu proje, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Mühendislik Araştırma Grubu ile Marmara Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından sağlanan desteklerle Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü olanakları kullanılarak 1 Şubat 2014 – 1 Ağustos 2017 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Bu projede *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* model bakterileri kullanılarak aporfine sınıfı üç alkaloidin, (-)-römerin, boldin ve bulbokapnin, antimikrobiyel etkileri proteom ve lipidom düzeyinde araştırılmıştır. Yapısal olarak birbirlerine çok benzemelerine rağmen bu üç alkaloidin seçilen bakteriler üzerinde etkisinin çok farklı olduğu bulunmuştur. (-)-Römerin her iki bakteri için de ciddi bir antimikrobiyel olarak düşünülebilecekken boldin ve bulbokapninin *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerine hiç bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu uluslararası proje kapsamında lipidom ve proteom konularında bilgi paylaşımı sağlamak için iki grup arasında karşılıklı ziyaretler gerçekleştirilmiştir. Proje süresince elde edinilen bilgileri paylaşmak ve özellikle OMİK teknolojileri konusunda bilgi birikimi oluşturabilmek için de bir çalıştay düzenlenmiştir. Bilimsel açıdan özgün sonuçlar içeren çalışmalar kapsamında, bir doktora tezi ve bir yüksek lisans tezi tamamlanmış olup bir doktora tezi de tamamlanmak üzeredir. Ayrıca yine bu proje kapsamında uluslararası iki adet makale yayınlanmış ve sekiz adet poster olarak sunulmuş konferans bildirisi bulunmaktadır.

Bu projeye destek sağladığı için Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na teşekkürlerimizi sunarız.

İstanbul, 13 Eylül 2017

Prof.Dr. Berna Sarıyar Akbulut

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Antibakteriyel Direnç ve Antibakteriyel Direnç ile Mücadele.....	3
2.2 Alkaloitler	3
2.2.1 Aporfin Alkaloitler.....	4
2.3 OMİK Teknolojiler ve Antimikrobiyel Direnç.....	6
2.3.1 Proteomik.....	7
2.3.2 Lipidomik.....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3.1 Kullanılan Bakteriyel Suşlar ve Kimyasallar.....	9
3.2 Bakteriyel Gliserol Stoklarının Hazırlanması.....	9
3.3 Bakterilerin Kültürlerinin Büyüme Koşulları.....	9
3.3.1 <i>E. coli</i> Büyümeleri ve Canlı Hücre Sayımları	9
3.3.2 <i>B. subtilis</i> Büyümeleri ve Canlı Hücre Sayımları	10
3.4 Alkaloitler için Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	10
3.5 Tüm Hücre Proteinlerinin Eldesi.....	11
3.5.1 <i>E. coli</i> Proteinlerinin Eldesi ve Temizlenip Hazırlanması	11
3.5.2 <i>B. subtilis</i> Proteinlerinin Eldesi ve Temizlenip Hazırlanması.....	12
3.6. Proteinlerin İki Boyutlu (2D) Jellerde Ayrımı ve Analizi.....	12
3.6.1 Proteinlerin Elektroforetik Ayrımı.....	12
3.6.2 2-D jellerinin Boyanması.....	13
3.6.3 Diferansiyel Olarak İfade Edilmiş Proteinlerin Belirlenmesi ve Analizi.....	14
3.7 Tüm Hücre Lipitlerinin Eldesi	15
3.8 Tüm Hücre Lipitlerinin Analizi	15

3.9 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	16
3.10 Spor Oluşumunun İncelenmesi	19
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	20
4.1 Aporfin Alkaloitlerin <i>E. coli</i> Üzerindeki Etkileri	20
4.1.1 Aporfin Alkaloitlerin <i>E. coli</i> MİK değerleri ve Büyümeye Etkileri.....	20
4.1.2 (-)-Römerin Varlığında <i>E. coli</i> Proteomu.....	23
4.1.3 (-)-Römerin Varlığında <i>E. coli</i> Lipidomu	27
4.1.4 (-)-Römerin Varlığında <i>E. coli</i> 'de qPZR ile Analizler.....	31
4.1.5 (-)-Römerin'nin <i>E. coli</i> 'ye Etkisinin Analizi.....	37
4.2 Aporfin Alkaloitlerin <i>B. subtilis</i> Üzerindeki Etkileri	39
4.2.1 <i>B. subtilis</i> için Büyüme Koşullarının Belirlenmesi.....	39
4.2.2 Aporfin Alkaloitlerin <i>B. subtilis</i> Büyümesine Etkileri	40
4.2.3 (-)-Römerin Varlığında <i>B. subtilis</i> Hücrelerinde Spor Oluşumu	43
4.2.4 (-)-Römerin Çalışma Konsantrasyonunda Canlı Hücre Sayımı	45
4.2.5 Alkaloitler Varlığında <i>B. subtilis</i> Proteomu	46
4.2.6 Alkaloitler Varlığında <i>B. subtilis</i> Lipidomu	59
4.2.7 (-)-Römerin Varlığında <i>B. subtilis</i> 'de qPZR ile Analizler	61
4.2.8 (-)-Römerin'nin <i>B. subtilis</i> 'te Çoklu İlaç Pompalarına Etkisinin Analizi.....	61
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	63
5.1 Sonuçlar.....	63
5.2 Öneriler	63
6. REFERANSLAR.....	65
7. EKLER	68
7.1 Çalıştay	68
7.2 Yayınlar	71
7.2.1 Bilimsel Makaleler	71
7.2.2 Kongrelerde Sunulan Bildiriler	71
7.2.3 Tamamlanan/Devam Eden Tezler.....	72

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Proje kapsamında çalışılan aporphin sınıfı alkaloiterin yapısal özellikleri (fonsiyonel grupların yerleri Şekil 1’de verilmiştir.)	5
Tablo 2. qPCR ile analiz edilmek üzere <i>E. coli</i> için seçilen genlere ait primerler	17
Tablo 3. qPZR ile analiz edilmek üzere <i>B. subtilis</i> için seçilen genlere ait primerler.....	19
Tablo 4. (-)-Römerin muamelesini takiben <i>E. coli</i> ’de ekspresyonu farklılaşan proteinlerin kütle spektrometrisi ile yapılan analiz sonuçları	26
Tablo 5. qPZR ile analiz için <i>E. coli</i> ’den seçilen ilk genler	31
Tablo 6. (-)-Römerin ile muamelenin ardından <i>E. coli</i> hücrelerinden ilk set genin transkriptom seviyelerindeki değişilerin qPZR yöntemi ile hesaplanmaları. Genlerin açıklamaları Pubmed Gen veri tabanından alınmıştır (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).....	33
Tablo 7. <i>E. coli</i> ’de Proteomik ve qPZR analizlerinin ortak sonuçları	34
Tablo 8. qPZR ile analiz için <i>E. coli</i> ’den seçilen ikinci set gen	34
Tablo 9. (-)-Römerin ile muamelenin ardından <i>E. coli</i> hücrelerinden ikinci set genin transkriptom seviyelerindeki değişilerin qPZR yöntemi ile hesaplanmaları. Genlerin açıklamaları Pubmed Gen veri tabanından alınmıştır (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).....	36
Tablo 10. (-)-Römerin muamelesini takiben <i>B. subtilis</i> ’te ekspresyonu farklılaşan proteinlerin kütle spektrometrisi ile yapılan analiz sonuçları	58
Tablo 11. <i>B. subtilis</i> ’te qPZR ile seçili genlerin ekspresyon hesapları	61

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Aporfin alkaloitlerin genel şekli	4
Şekil 2. OD ₆₀₀ değeri 0,5-0,6 değerine ulaştığında artan (-)-römerin konsantrasyonları ile muamele edilmiş <i>E. coli</i> hücrelerinin büyüme grafikleri. (●) kontrol, (■) 25 µg/ml, (▲) 50 µg/ml ve (◆) 100 µg/ml. (-)-Römerin OD _{600nm} 0.5'e ulaştığında ilave edilmiştir.	21
Şekil 3. (-)-Römerin ile muamele edilmiş <i>E. coli</i> hücrelerinde canlı hücre sayımı. Koyu barlar kontrol ile açık barlar (-)-römerin ile muamele edilmiş hücreleri göstermektedir. 3. saat OD ₆₀₀ değerinin 0,5-0,6 aralığında ulaşip ilaç muamelesi yapıldığı anı göstermektedir. 21	
Şekil 4. OD ₆₀₀ değeri 0,5-0,6 değerine ulaştığında 100 µg/ml boldin ve bulbokapnin ile muamele edilmiş <i>E. coli</i> hücrelerinin büyüme grafikleri	22
Şekil 5. Kontrol kültüründeki hücrelerden ekstrakte edilen proteinlerin ZEBA kolonları ile temizlendikten sonra 2-D jeldeki görüntüleri	24
Şekil 6. (-)-Römerin ile muamele edilmiş hücrelerden ekstrakte edilen proteinlerin ZEBA kolonları ile temizlendikten sonra 2-D jeldeki görüntüleri	25
Şekil 7. (-)-Römerin ile muamele edilen ve kontrol <i>E. coli</i> örneklerinin 0, 30 ve 60 dakika sonraki lipitlerinin analizleri	29
Şekil 8. Livak ve Schmittgen (2001)'nin 2 ^{-ΔΔCt} metodunun kullanılabilmesi için <i>acrB</i> ve <i>rrsG</i> genlerinin amplifikasyon verimliliklerinin grafiksel görüntüsü	32
Şekil 9. (-)-Römerin ile muamele edilen <i>E. coli</i> hücrelerinin proteomik ve qPCR analizlerinde elde edilen verilerinin entegre analizi. Hedefler arasındaki farklı renkler STRING 9.1 veritabanının analiz için kullandığı farklı yöntemleri ifade etmektedir. Siyah oklar proteomik analizlerden elde edilen sonuçları, kırmızı oklar ise qPCR analizi ile elde edilen sonuçları göstermektedir	38
Şekil 10. 1 saat (-)-römerin ile muamelesinin ardından <i>E. coli</i> TB1 hücrelerinde farklılaşan tüm protein ve genlerin şekilsel görüntüsü. Kırmızı rengi azalmayı, yeşil rengi artışı, mor ise değişim olmadığını göstermektedir. Laciverte etkilenen sistemlere ait diğer bölümleri göstermektedir	39
Şekil 11. <i>B. subtilis</i> hücrelerinin iki farklı sıcaklıkta zamana karşı OD ₆₀₀ değerleri	40
Şekil 12. Farklı konsantrasyonlardaki (-)-römerin (µg/ml) varlığında <i>B. subtilis</i> büyümesi	41
Şekil 13. Farklı konsantrasyonlardaki boldin (µg/ml) varlığında <i>B. subtilis</i> büyümesi	42
Şekil 14. Farklı konsantrasyonlardaki bulbokapnin (µg/ml) varlığında <i>B. subtilis</i> büyümesi ..	43
Şekil 16. DMSO ve 75 µg mL ⁻¹ roemerine ile muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinin canlı hücre sayımları	45

Şekil 17. DMSO ve 75 µg mL ⁻¹ boldine ile muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinin canlı hücre sayımları.	46
Şekil 18. DMSO ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinden ekstrakte edilmiş proteinlerin gümüş boyaması sonrası elde edilen 2-boyutlu jel görüntüleri. 100 mL besi yerinden büyütülen hücrelerin 500 µL tamponda parçalandıktan sonra elde edilen protein örnekleri hem proteaz inhibitörü karışımı ile hem de nükleaz karışımı ile muamele edilmiş ve daha sonra BIORAD temizleme kiti ile temizlenmiştir (1. Boyutta ayırım için kullanılan şeridin pH aralığı 4-7). Yüklenen toplam protein miktarı: 200 µg. .48	
Şekil 19. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinden ekstrakte edilmiş proteinlerin gümüş boyaması sonrası elde edilen 2-boyutlu jel görüntüleri. 100 mL besi yerinden büyütülen hücrelerin 500 µL tamponda parçalandıktan sonra elde edilen protein örnekleri hem proteaz inhibitörü karışımı ile hem de nükleaz karışımı ile muamele edilmiş ve daha sonra Biorad temizleme kiti ile temizlenmiştir (1. Boyutta ayırım için kullanılan şeridin pH aralığı 4-7). Yüklenen toplam protein miktarı: 200 µg. .49	
Şekil 20. DMSO ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinden elde edilen protein haritalarının Samespots yazılımı ile analiz sonucu elde edilen spotlar	50
Şekil 21. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinden elde edilen protein haritalarının Samespots yazılımı ile analiz sonucu elde edilen spotlar	51
Şekil 22. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.	52
Şekil 23. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.	53
Şekil 24. Boldin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.	54
Şekil 25. Boldin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.	55
Şekil 26. Bulbokapnin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.	56
Şekil 27. Bulbokapnin ile 1 saat muamele edilmiş <i>B. subtilis</i> hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.	57
Şekil 28. (-)-Römerin ve boldine ile muamele edilen ve kontrol <i>E. coli</i> örneklerinin lipidlerinin analizleri	60

Şekil 29. <i>B. subtilis</i> MDR pompalarının ilişkilendirilmesi	62
--	----

ÖZET

Bu proje aporfin sınıfına ait farklı alkaloitlerin antibakteriyel mekanizmalarının proteom ve lipidom çalışmaları ile anlaşılmasını ve yeni ilaç adayları olarak değerlendirilebilmesini hedeflemektedir. Bu hedef doğrultusunda incelenmek üzere (-)-römerin, boldin ve bulbokapnin olmak üzere üç farklı alkaloit belirlenmiş ve model mikroorganizma olarak da *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* seçilmiştir. Bu üç alkaloidin seçilmesinin en önemli nedeni hepsinin aporfine sınıfına ait olmaları ve yapısal olarak birbirlerine yüksek benzerlik göstermeleridir. Alkaloitlerin olası etkilerinin anlaşılması doğrultusunda öncelikle çalışma konsantrasyonunun seçilebilmesi için büyüme eğrileri çıkarılmış ve canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Ayrıca *B. subtilis* stres koşullarında spor oluşturduğu için, çalışılan konsantrasyonda bu bakterinin spor oluşturmamış olmasına dikkat edilmiştir. 100 µg mL⁻¹ (-)-römerin varlığında *E. coli* hücrelerinde genel olarak hücre içi karbonhidrat varlığını kısıtlanmakta ve hücre porinleri azalmaktadır. Ozmotik denge ile ilgili ciddi bir değişiklik olmamıştır. 75 µg mL⁻¹ (-)-römerin varlığında *B. subtilis* hücrelerinde ise yine hücre içi karbon akışı azalırken stres proteinlerinde önemli bir artış kaydedilmiştir. Ayrıca her iki bakteri için de çoklu ilaç direnç pompalarının önemi gözardı edilmemelidir. Bu iki model bakteride (-)-römerin varlığındaki lipidom değişikliklerini bakıldığında ise, lipit dağılımlarında önemli farklılaşmalar kaydedilmiştir. (-)-Römerin varlığında hücre zarındaki taşıyım proteinlerindeki farklılaşma da lipit dağılımındaki farklılaşma ile uyumludur. Diğer taraftan boldine ve bulbokapninin yüksek konsantrasyonlarında bile *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinde belirgin bir aktivite gözlemlenmemiştir. Bu doğrultuda (-)-römerinin yeni bir antibakteriyel ilaç adayı olarak değerlendirilmesi önerilebilir.

Anahtar kelimeler: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, aporfin alkaloitler, antibakteriyel, lipidom, proteom, yolaklar analizi

ABSTRACT

The current project aims to understand the antibacterial mechanism of action of aporphine type alkaloids using proteomic and lipidomic approaches with the ultimate goal of their evaluation as new drug leads. With this objective, three different alkaloids as (-)-roemerine, bulbocapnine, and boldine were selected and *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were selected as model microorganisms. The major reason for selecting these three alkaloids was because they all belonged to the aporphine class thus they shared high structural similarities. The work for understanding the activity of alkaloids was initiated by first determining their working concentrations. For this reason growth curves were constructed and then viable cells were counted. For *B. subtilis* cells, since they form endospores under stress conditions, the working concentration was adjusted to be outside the endospore forming concentration. In the presence of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (-)-roemerine, carbohydrate availability dropped and porins decreased in *E. coli* cells. There was no significant change in the osmotic balance. In the presence of 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (-)-roemerine, carbon flow dropped and the stress proteins were induced in *B. subtilis* cells. Furthermore, in both model bacteria multidrug resistance pumps play an important role. Regarding the lipid distribution, significant changes were recorded for both cells when compared to the control cells. Upon treatment with (-)-roemerine, the changes in the transport proteins located on the cells wall/membranes were consistent with the changes recorded for lipid profiles. On the other hand, even in the presence of high concentrations of bulbocapnine and boldine, no significant activity was detected in *E. coli* and *B. subtilis* cells. In the light of this information, (-)-roemerine could be proposed as a new antibacterial drug lead.

Key words: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, aporphine alkaloids, antibacterial, lipidome, proteome, pathway analysis

1. GİRİŞ

Etkili ve ilk tercih ilaçların sorumsuzca kullanımı bakterilerin hızlı bir şekilde bu antibakteriyel ilaçlara karşı çok çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmelerine neden olmaktadır. Mevcut ilaçların etkisiz hale gelmesine neden olan bu durum 21. yüzyılda ciddi bir sağlık sorunu teşkil etmektedir. Bu sağlık sorunu ile mücadele için gelişen yeni stratejilerin kullanımı şarttır. Yüksek verimli veri analizlerinde sağlanan enstrümantel gelişmeler ile beraber biyoenformatik ve hesapsal yöntemlerdeki kaydedilen ilerlemeler farklı OMİK teknolojilerinin yardımı ile yeni ilaç bulunması ve bunların mekanizmalarının aydınlatılması konusunda ciddi adımlar atılmasına imkan vermiştir. Transkriptomik, proteomik, lipidomik, glikomik gibi farklı OMİK teknolojileri çok ayrı çalışma alanları olarak görünseler de, bunlardan elde edilen sonuçlar beraber değerlendirildiklerinde birbirlerini tamamladıklarından bir biyolojik olay altındaki hikayenin tam olarak aydınlatılması mümkün olmaktadır. İşte bu özelliklerinden dolayı farklı OMİK yaklaşımlarının beraber kullanımı antibiyotik direnci ile mücadelede de umut vadetmektedir.

İçlerinde barındırdıkları çok farklı organik molekülün varlığından dolayı bitkiler günümüzde antibakteriyel direnç ile mücadelede önemli bir yere sahiptir. Bitki kökenli aporfin sınıfına ait (-)-römerin, (+)-anonain, aktinodafnin ve korituberin gibi çeşitli alkaloidlerin çok farklı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyel etki gösterdiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan bu alkaloidlere yapısal olarak büyük benzerlik gösteren glausin, disentrin ve nusiferin gibi tıbbi açıdan öneme sahip ancak antimikrobiyel özellik içermeyen aporfin alkaloidlerin varlığı resmi daha karmaşık bir hale getirmektedir. Yeni antibakteriyel ilaçların geliştirilmesi ve markete çıkması bu moleküllere ait etki mekanizmaları çalışmalarının zamanlı bir şekilde eldesine bağlıdır. OMİK teknolojilerin kullanımı da işte bu alandaki darboğazın aşılmasında ciddiyet taşımaktadır.

Mevcut projenin temel amacı mühendislik prensipleri ile sistem düzeyinde deney tasarlayıp analiz yaparak yapısal olarak birbirine çok benzeyen 3 aporfin türü alkaloidin, (-)-römerin, boldine ve bulbokapnin, bakteriler üzerindeki etkilerini, etkilenen metabolik yolları ve anahtar enzimleri belirleyerek bulmaktır. Bu aporfin alkaloidlerden bulbokapnin ve boldine satın alınabildiği için seçilmiş, (-)-römerine ise proje öneri ile hazırlığı esnasında yüksek antimikrobiyel etkisi nedeniyle seçilmiştir. Bu alkaloid papaver bitkilerinden ekstrakte edilerek tarafımıza sağlanmıştır. Yapısal olarak çok benzer bu alkaloidlerin farklı etkilerinin araştırılması için de genetik açıdan detaylı olarak çalışılmış olan ve hemen hemen tüm metabolik yollarına ayrıntılı bir şekilde kolay ulaşılır internet erişimi olan veri tabanlarında

(KEGG, MetaCyc, EcoCyc, Subtiwiki) bulunan model bakteriler seçilmiştir. Bu doğrultuda Gram(-) bakterilere model olarak *Escherichia coli* ve Gram(+) bakterilere model olarak *Bacillus subtilis* ile çalışılması uygun bulunmuştur.

Genel olarak ilaç adaylarının hedeflerinin bulunması tek tek yapılan biyokimyasal deneylere dayanmaktadır ancak bu deneylerden elde edilen sonuçlar etki mekanizmaları ile ilgili bir resim oluşturulmasına imkan vermemektedir. Diğer taraftan sistem düzeyinde analize imkan veren OMİK teknolojilerinin bu konuda üstünlüğü vardır. Bu nedenle bu projede seçilen model miktoorganizmaların proteom ve lipidom profillerinin çıkarılarak bu 3 aporfin türü alkaloid varlığındaki metabolik değişimlerin izlenerek alkaloidlerin antibakteriyel açıdan etki mekanizmalarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda önce seçilen bakterilerin 3 aporfin türü alkaloidinin varlığında büyüme profilleri çıkarılmış ardından çalışmalar için uygun konsantrasyonlar belirlenmiştir. Daha sonra alkaloidler varlığında büyütülen model bakterilerin OMİK analizleri yapılmış ve (-)-römerinin etki mekanizması hakkında önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Raporun ikinci bölümünde hızla artan antimikrobiyel dirence değinildikten sonra OMİK teknolojilerin kısaca tanıtımı yapılmış ve antimikrobiyeller alanındaki kullanımları hakkında bilgi verilmiştir. Bu bölümde ayrıca alkaloidler, aktiviteleri ve etkileri hakkında özet bilgi verilmiştir. Üçüncü bölümde, yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler ve yöntemler, dördüncü bölümde ise sonuçlar anlatılmış ve tartışılmıştır. Beşinci bölümde bulgular tartışılarak projenin devamında laboratuvarımızda sürdürülmesi planlanan çalışmalar anlatılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Antibakteriyel Direnç ve Antibakteriyel Direnç ile Mücadele

Antibiyotik direnci, ilk antibiyotik penisilinin keşfinden hemen sonra fark edilmiş olan, genelde antibiyotiklerin yanlış veya eksik kullanılması sonucu ortaya çıkmış bir sorundur. Bu direnç genetik ya da kazanılmış olabilmektedir (Bockstael ve Aerschot, 2009). Dirençli bakterilerin sayısındaki hızlı artış ve bunların uluslararası seyahatlerle yayılması sonucu antibiyotik direnci ciddi ve global düzeyde bir sağlık sorunu haline gelmiştir (McKenna, 2013). Antibiyotiklere dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi de oldukça zordur. Bu ciddi sağlık sorunu, farklı etki mekanizmalarına sahip yeni antibakteriyel ilaç öncülleri bulunması ve geliştirilmesi gereksinimini doğurmuştur. Bu ilaç öncüllerinden aynı anda birden çok hedefe bağlanabilenleri direnç gelişimini zorlaştırdığı için daha da çekici olmaktadır (East ve Silver, 2013).

Bitkilerin kendilerini farklı canlılardan korumak için sentezledikleri çeşitli organik moleküllerin antimikrobiyel, antifungal, antimalarial gibi değişik biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır (Cowan, 1999). İçerdikleri moleküllerin kimyasal çeşitliliklerinden ve buna bağlı olarak sahip oldukları biyolojik aktivitelerin çokluğundan dolayı bitkilerin sağlık amaçlı kullanımları çok eski zamanlara dayanmaktadır. Bitkilerdeki doğal ürünlerin saf madde ve hatta bitki ekstraktlarında bulundukları karışımlarda bile antibiyotikler ile beraber kullanıldıklarında sinerjik bir etki yaratarak dirençli bakteriler ile mücadelede umut verici sonuçlar verdikleri rapor edilmiştir (Braga vd., 2005; Sibanda ve Okoh, 2007). Özellikle çoklu-hedefe yönelen yeni aktif molekül arayışında da tıbbi bitkiler dikkat çekmektedirler (Sibanda ve Okoh, 2007; Abreu vd., 2012). Ne yazık ki tıbbi bitkilerin ciddi anlamda kullanımlarını mevcut analitik metotların yetersizliği büyük ölçüde kısıtlamıştır. Biyolojik sistemlerin analizi için yüksek hızda ve yüksek verimde çalışabilen cihazların geliştirilmesi ile antibakteriyel direnç ile mücadele için tıbbi bitkiler tekrar gündeme gelmişlerdir (Sahu vd., 2014). Yeni aktif antibakteriyel molekül arayışında özellikle bitkilerin sentezlediği değişik biyolojik aktivitelere sahip alkaloidler, fenolikler ve polifenoller, kinonlar ve terpenler gibi sekonder metabolitler en yaygın olarak bilinenleridir (Wink ve Schimmer, 2010).

2.2 Alkaloidler

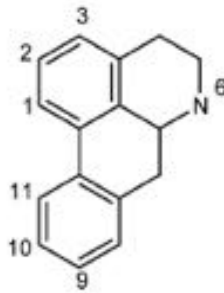
Alkaloidler tirozin, triptofan, fenilalanin, arjinin ve lizin gibi amino asitlerden sentezlenen azot içeren organik moleküller olarak bilinirler (Croteau vd., 2000). Bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak yaygın olarak üretilen alkaloidler, sahip oldukları antikanser, antiviral, antifungal, antibakteriyel gibi biyolojik aktiviteleri sayesinde tıbbi açıdan öneme sahiptirler.

Keşfi bekleyen çok sayıda alkaloid olduğu da düşünülürse, artan antibakteriyel direnç ile de bu alandaki yeni ilaç arayışında ilgi odağı olmuşlardır. Bu moleküller çoğunlukla hedefleri ile H-bağı kurarak etkilerini gösterirler (Kittakoop et al., 2014). Ayrıca morfin, kuinin, etopsit, koşisin ve rezerpin gibi bazı alkaloidler ve alkaloid türevleri de ciddi tıbbi değere sahiptir (Baldwin ve Osheroff, 2005; Croteau vd., 2000; Doyle vd., 1955; Terkeltaub vd., 2010).

Alkaloidlerin antibakteriyel mekanizmaları değerlendirildiğinde, bu moleküller DNA ve RNA'ya bağlanarak (berberin, sanguinarin, palmatin, koralinen ve jatrorrhizine) (Bhadra ve Kumar, 2011) ya da ilaç atım pompalarını (rezerpin) (Neyfakh vd., 1993), tip II izomerazları (kuinolonlar) (Heeb vd., 2011), topoizomera z I ve II'yi (protoberberinler) (Kobayashi vd., 1995), ve bakteriyel bölünme proteini FtsZ'yi (berberine) (Boberek vd., 2010) inhibe ederek etkilerini gösterebilirler. Bu kadar çok farklı moleküle bağlanmaları, bu moleküllerin çok hedefli olduklarını işaret etmektedir. Örneğin temel hedefi olarak DNA'ya bağlandığı rapor edilen berberinin aynı zamanda bakteriyel bölünme proteinini FtsZ'ye bağlanarak onu da inhibe ettiği bulunmuştur (Boberek vd., 2010). Benzer şekilde DNA'ya bağlanan sanguinarinin, tübülün dimerlerine bağlanarak mikrotübüllerin geri dönüşümsüz polimerizasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir. Ne yazık ki alkaloidlerin biyolojik hedeflerinin belirlenmesi oldukça zahmetli bir iştir (Bhadra and Kumar, 2011).

2.2.1 Aporfin Alkaloidler

Aporfinler kuinolin sınıfına ait alkaloid grubu olup çok farklı bitkilerden elde edilmektedirler. Bu alkaloidlerin genel yapısı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Aporfin alkaloidlerin genel şekli

Aporfin sınıfına ait alkaloidlerin tıbbi özellikleri konusunda çeşitli çalışmalar mevcuttur. Jantan vd. (2001) aporfinlerin platelet aktive edici faktörün reseptörüne bağlandığını göstermiştir. Quentin-Leclercq (2004) aporfinlerin DNA'ya bağlandığını göstermiştir. Woo vd. (1999) aporfinlerin için topoizomera zların potansiyel hedef olduğunu ileri sürmüştür. Milian vd.

(2004) aporfine alkaloitlerin reaktif oksiyen türlerinin oluşumunu inhibe ettiğini rapor etmiştir. Mevcut bu projeden önce aporfin alkaloitlerin antimikrobiyel aktiviteleri açısından kayda değer tek çalışma Liu vd. (2006) tarafından rapor edilmiştir. Bu grup aporfinlerin malonil-CoA:Acyl taşıyıcı protein transasilaz (MCAT) inhibitörü olduklarını göstermiştir. Bu enzim yağ asidi sentezinden yer almaktadır. Yağ asitleri hücre duvarlarının vazgeçilmez yapıtaşı olduğundan ve sinyal iletiminde önemli biyolojik işlevi olduğundan, sentezleri de hücre canlılığının sürdürülmesi açısından çok önemlidir. Bu nedenle yağ asidi sentezinde yer alan enzimler antimikrobiyel ilaç keşfinde önemli hedefler olarak değerlendirilirler (Rohini ve Srikumar, 2012; Liu vd., 2006). Mevcut bu bilgilerin tamamı saf enzim ve sübstratlar ile elde edilmiştir. Literatürde bunun dışında aporfin alkaloitlerin etki mekanizmaları hakkında bilgi bulunmamaktadır.

Farklı aporfin alkaloitlerin potansiyel antibakteriyel olabilmelerinden yola çıkarak bu proje kapsamında çalışılmak üzere aporfin sınıfına ait üç alkaloit seçilmiştir. Çok kısıtlı olmakla beraber aporfin alkaloitlerin tek tek proteinlere karşı ilgilerinin olduğuna dair bilgi bulunsa da literatür tarandığında antibakteriyel mekanizmasının anlaşılması için sistem düzeyinde gerekli bilgi akışına da ulaşamamaktadır. Bu mevcut bilgi ile etki mekanizması ile ilgili resmin bütününe ulaşmak mümkün değildir.

Seçilen aporfin türü alkaloitlerine ait yapısal özellikler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Proje kapsamında çalışılan aporphin sınıfı alkaloitlerin yapısal özellikleri (fonksiyonel grupların yerleri Şekil 1’de verilmiştir.)

Name	1	2	3	6	9	10	11
Boldin	OCH ₃	OH	H	CH ₃	OH	OCH ₃	H
(-)-Römerin	-O-CH ₂ -O-		H	CH ₃	H	H	H
Bulbokapnin	-O-CH ₂ -O-		H	CH ₃	H	OCH ₃	OH

Aporfin alkaloitlerinden (-)-römerin proje önerisi hazırlığı esnasında yüksek antibakteriyel etkisi nedeniyle seçilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda da bu alkaloidin *B. cereus*, *E. coli* ve *Salmonella typhimurium*’a karşı antibakteriyel, *Candida* ve *Cryptococcus* suşlarına karşı antifungal etkisi olduğu rapor edilmişti (Tsai vd., 1989; Agnihotri 2008; Rao vd., 2009; Deng vd., 2006). Bu alkaloidin düşük sitotoksitesi onu antibakteriyel ajan olarak daha da çekici kılmaktadır (You vd., 1995). Bu alkaloit *Papaver rhoeas* bitkisinden ekstrakte edilerek

tarafımıza sağlanmıştır. Diğer iki aporfin alkaloit bulbokapnin ve boldin SIGMA'dan temin edilebildiği için seçilmiştir. Bu iki alkaloitten bulbokapninin *E. coli* ve *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Orhan vd., 2007).

2.3 OMİK Teknolojiler ve Antimikrobiyel Direnç

Biyolojik süreçlerin sistem düzeyinde çalışılması yeni bir kavram değildir, temelleri 'homeostasis'i tanımlayan Cannon'a (1932), sibernetik kavramını geliştiren Nobert Weiner (1948)'a ve genel sistem teorisini ortaya atan Bertalanffy (1968)'ye kadar uzanmaktadır. Ancak OMİK teknolojilerine dayalı sistem biyolojisi, çok kısa sürede yüksek sayıda ölçüm yapabilen yüksek çıktılı cihazların ve buna bağlı yazılımlar ile matematiksel analiz yöntemlerinin gelişimi ile ortaya çıkarak önem kazanmışlardır (Ideker vd., 2001). Biyolojik süreçleri, metabolitler ile etkileşimde bulunan dinamik protein yapılarının oluşturduğu karmaşık ağ sistemleri ile daha doğru ve hassas olarak anlamak OMİK teknolojilerin gelişimi ile mümkün olmuştur. OMİK yaklaşımlar ile yapılan analizlerin üstünlüğü, basit moleküler düzeyde yapılan çalışmaların açıklayamadığı soruları cevaplayabilmeleridir.

OM ve OMİK ekleri ilk olarak bir insandaki DNA'nın tamamını kapsayan genom ve genomik kelimelerinden türemiştir. Bunu takiben hücredeki proteinlerin tamamını kapsayan proteom, ve RNAlarının tamamını kapsayan transkriptom kelimeleri türetilmiştir ve ilk çalışmalar bunlar üzerine yoğunlaşarak sistem biyolojisi çalışmaları yapılmıştır (Camacho vd., 2005). Transkriptom hücreye ait potansiyel bilgileri gösterirken proteom ise gerçekleşmiş olayları işaret etmekteydi. OM ve OMİK ekleri ile türetilmiş bu kelimelerin bilim dünyasına kazandırılmasının ardından, farklı sınıf molekülleri ifade eden benzer kelimeler de hızla türetilmiştir. Hücredeki tüm metabolitleri içeren metabolom, lipitleri içeren lipidom, şeker ve türevlerini içeren glikom bunlardan bazılarıdır. Glikom ve lipidom aynı proteomda olduğu gibi son ürünleri içerdiğinden hücrede gerçekleşen olayları işaret etmektedir. Farklı OMİK yaklaşımlar çok değişik alanları içerseler de, bunlardan gelen bilgilerin beraber değerlendirilmesi hücrede gerçekleşen olayların detaylı bir şekilde anlaşılmasına imkan vermektedir (Silvestri et al., 2011). OMİK yaklaşımların kullanımı ile sistem düzeyinde hücresel olayların anlaşılabilmesi, antibakteriyel ilaç arayışına da önemli bir yol açmıştır (Reddy vd., 2015). Özellikle de birden çok OMİK yaklaşımın beraber kullanıldığı çalışmalar yeni ilaç adaylarının etkilerinin tam ve zamanlı olarak anlaşılmasını sağlamakta ve sistemin dinamizmi görüntülenebilmektedir (Karaosmanoglu vd., 2014).

2.3.1 Proteomik

Proteom kelimesi ilk olarak Mark Wilkins tarafından 1994 yılında İtalya'nın Siena kentinde düzenlenen '2D Electrophoresis: from protein maps to genomes' isimli sempozyumda ortaya atılmış ve 1995 yılında tezinin bir parçası olarak yayınlanmıştır. Biyolojik sistemlerin araştırılmasında proteomik genomikten bir sonra gelen aşama olarak düşünülmektedir. Bir organizmanın genomu aşağı yukarı sabit olmasına rağmen proteom bir hücreden diğer hücreye, hatta belirli bir zamandan başka bir zamana büyük ölçüde farklılık gösterebilir. Proteomik çalışmalar proteinlerin hem varlığını hem de miktarını gösterebilmektedir.

Proteomikte protein analizi hızlı ve seri bir şekilde yapılır. Protein örneği hazırlandıktan sonra, iki boyutlu elektroforez jellerde proteinler molekül ağırlıkları ve yüklerine göre ayrılırlar, ayrılan proteinler bir proteaz ile kesilirler (bu çoğunlukla tripsin enzimidir) ve oluşan peptitler de kütle spektroskopisinde analiz edilirler. Kütle spektrometresi her bir peptidin kütlesini hesaplar ve bir proteinin triptik kesiminden oluşan peptitlerin ağırlıkları veri bankasındaki bilinen peptit ağırlıkları ile karşılaştırılarak peptitlerin hangi proteine ait olduğu bulunur. Peptit ağırlıklarının aranıp karşılaştırıldığı teknoloji proteomik kalbini oluşturmaktadır. Bu amaçla geliştirilmiş ticari ve kullanıma açık çok sayıda algoritmalar mevcuttur. Proteomik çalışmalara kütle spektrometri tekniklerinde ve veri tabanlı yapılan peptit taramalarında kaydedilen gelişmeler proteomik çalışmalarına önemli ölçüde ivme kazandırmıştır.

Proteomik yöntemlerin önemi ve olası rolleri biyolojik alanlardaki tüm çalışmalarda artmaktadır. Özellikle de birçok ilaç hedefi proteinler olduğundan proteomik yeni moleküler tıp için çok önemli bir unsurdur. Bir hücrede bulunan tüm proteinlerin ve bunların modifiye formlarının hassas ölçümleri, hücre sinyal yollarını ve ağlarını, hücre döngüsünü, hücre farklılaşmasını ve insan sağlığı ile çeşitli hastalıkların ilerlemelerini anlamaya yarayacak olaylar hakkında önemli bilgiler verebilmektedir (Lieber, 2002).

Yeni ilaçların tasarımlarında proteinler önemli bir başlangıç noktası teşkil etmektedirler. Bu anlamda ilaç uygulamasını takiben mikrobiyal sistemlerdeki proteinler arası dinamik ilişkinin takibine izin veren proteomik yeni ilaç bulma ve geliştirme programlarında çok yaygın yere sahip olmaya başlamıştır.

Protein profillemesi belirli bir dürtü sonucunda ifadeleri değişen proteinlerin gruplanıp birbirleri ile ilişkilendirilmesine yardımcı olmaktadır. Protein profillemenin tek başına kullanıldığındaki önemli dezavantajı, bu yöntem ile miktarları çok az olan proteinlerin belirlenememesi ve inaktif enzimleri ayırt edilememesidir.

Farklı amaçlar ile *E. coli*'nin protein profiline odaklanan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Molly vd. (2000) *E. coli*'nin dış zarında bulunan proteinleri çalışmıştır. Fountoulakis ve

Gasser (2003) hücre zarına odaklanmıştır. Ayudha vd. (2009) ağır metal stresine karşı *E. coli*'de protein profili çıkarmıştır. Santos vd. (2010) *E. coli*'nin piperacillin/tazobaktam kombinasyonlarına direncini proteomik araçlar ile çalışmıştır. Ozbalcı vd. (2010) berberinin *E. coli* üzerindeki etkisini proteomik yöntemler ile incelemiştir.

2.3.2 Lipidomik

Lipitler genel olarak biyolojik sistemlerin analizlerinde DNA, RNA ve proteinlerin arkasında yer almışlardır. Bunun en önemli nedeni ise bu moleküllerin lipitlere göre hücrelerin mekanistik açısından anlaşılması için kısa yol sağlamalarıdır. Çok az sayıda farklı yapı taşından oluşan lipitler yakın zamana kadar çok ilgi çekici moleküller olamamışlardır. Diğer taraftan bakıldığında lipitler büyük çeşitliliğe sahip olup genomun önemli bir kısmı bu lipitlerin sentezi ve metabolize edilmeleri ve çeşitliliklerinin kontrolüne ayrılmıştır (Shevchenko and Simons, 2010).

Lipit analizleri için kütle spektrometrisi ile yapılan ilk çalışmalar lipit profillerindeki değişimlerin hücresel süreçleri nasıl etkilediğine odaklanmaktaydı. Lipidomik alanında kaydedilen gelişmeler ile bu odak haberci görevi gören, metabolik süreçlerde bulunan veya sinyal iletişim ağlarında yer alan lipitlere dönmüştür. Lipit molekülleri ilk bakışta büyük önem taşıyor gibi görünseler de hücresel açıdan çok kritik yollarda yer alıp hücrelerin anlık tepki vermelerinde kritik yere sahiptirler (Ivanova vd., 2009). Buna ek olarak birçok antibakteriyel ilacın hedefi, fosfolipitlerden yapılmış olan hücre duvarıdır. Kısaca lipidomik hem lipit çeşitliliğini hem de lipitler tarafından düzenlenen fonksiyonların anlaşılmasına imkan vermektedir.

Lipit membranlar hücrelerin bütünlüğünü sağlamak ve mebrandaki hareketlilik ile sinyal iletişimini düzenlemenin de içinde yer aldığı birçok önemli role sahip olduğu için çok sayıda antibakteriyel madde için önemli bir hedef teşkil etmektedir. Buna ek olarak, bakteriyel ve insan lipidomu arasında ciddi farklar vardır. Bu farklardan dolayı bakteriyel membranı hedef alan ilaçlar insan membranını hedef almayabileceğinden sadece bakterileri öldürecektir.

Oursel vd. (2007) *E. coli* lipitleri için yağ asillerinin de tam yerlerini içerecek şekilde tam bir tanılama yapmışlardır. Buna ek olarak fosfolipitler de birbirlerine göre iç standart kullanılarak kantifiye edilmişlerdir. Gidden vd. (2009) ise *E. coli* ve *B. subtilis*'in MALDI-TOF ile lipit yapılarını incelemiş ve bakterilerin farklı büyüme evrelerinden elde edilen sonuçları karşılaştırmışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Bakteriyel Suşlar ve Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan model bakterilerden *Escherichia coli* TB1 hücreleri laboratuvar stoklarımızda bulunmaktadır. Projede çalışılan diğer model bakteri *Bacillus subtilis* 168 (DSM 402) ise bu proje kapsamında DSMZ'den satın alınmıştır.

Bu proje kapsamında kullanılan tüm kimyasallar ve solüsyonlar MERCK (Almanya), Applichem (Almanya), SIGMA (ABD), Molekula (Almanya), ROCHE (Almanya), BIORAD (Hercules, CA)'dan alınmıştır. DNA/RNA işlemlerinde kullanılan kitler Invitrogen (ABD) ve QIAGEN(Almanya)'den satın alınmıştır. Enzimler ile DNA ve protein standartları Fermentas (ABD) ve New England Biolabs (ABD)'den satın alınmıştır. (-)-Römerin alkaloidi G. Sariyar'ın hediyesidir (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi).

3.2 Bakteriyel Gliserol Stoklarının Hazırlanması

E. coli TB1 tek bakteriyel kolonisi Luria Bertani (LB) besi yeri içeren agar petrisinden alınıp 5 ml LB besiyerine ekilir. Hücreler bir gece boyunca 37°C derece, 180 rpm'de çalkalanarak büyütülür. Bir gece boyunca büyütülmüş hücreler, %50 oranında gliserol (OmniLife) ile nazıkçe karıştırılıp -80°C derecede muhafaza edilir. *B. subtilis* 168 (DSM 402) tek bakteriyel kolonisi nütrient besi yeri içeren agar petrisinden alınıp 5 ml nütrient besiyerine ekilir. Hücreler bir gece boyunca 37°C derece, 180 rpm'de çalkalanarak büyütülür. Bir gece boyunca büyütülmüş hücreler, %50 oranında gliserol (OmniLife) ile nazıkçe karıştırılıp -80°C derecede muhafaza edilir.

3.3 Bakterilerin Kültürlerinin Büyüme Koşulları

3.3.1 *E. coli* Büyümeleri ve Canlı Hücre Sayımları

E. coli ile labotaruvarımızda rutin olarak çalışıldığı için 37°C ve 180 rpm'de büyüme sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Kontrollü büyüme sağlanabilmesi için gerekli durumlarda iki ardışık önkültür kullanılmıştır. İlk önkültür *E. coli* TB1 gliserol stoğu kullanılarak 5 ml'lik LB besiyeri içinde hazırlanarak 37°C ve 180 rpm'de üretilmiş ardından üretilen bu hücreler kullanılarak hazırlanan ikinci önkültür ile hücreler 600 nm'de OD 0.7'ye gelene kadar büyütülmüştür. İkinci önkültür %1 inokülasyon hacmi ile ana bakteri kültürünü başlatmak için kullanılmıştır. Bakteriyel büyüme 50 ml'lik LB besiyeri içerisinde 250 ml erlen ya da 100 ml'lik LB besiyeri içerisinde 500 ml erlen kullanılarak yapılmıştır (Gerekli havalandırma için erlen hacmi ile besi yeri ortamının birbirlerine oranları 5:1 (v/v) olarak tutulmuştur). 600 nm'de kültürün OD

değeri 0.5-0.6 aralığına ulaştığında hücreler seçilen alkaloitlerin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Alkaloid DMSO (Duchefa Biochemie) içerisinde çözöldüğünden, kontrol hücreleri DMSO ile muamele edilmiştir. Büyütme spektrofotometrede OD₆₀₀ ölçümleri ile takip edilmiştir. Elde edilen büyüme grafiklerine göre çalışılacak alkaloit konsantrasyonları belirlenmiştir.

Canlı hücre sayımlarının (CFU) eldesi belirli aralıklarda alınan 1 mL örnekler seri seyreltme ile katı LB besiyerlerine yayılmıştır. Bu petrilere oluşan koloniler 37°C'de bir gece inkübasyonun ardından sayılmışlar ve canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

3.3.2 *B. subtilis* Büyümeleri ve Canlı Hücre Sayımları

B. subtilis 168 mikroorganizması ile ilk çalışma büyüme sıcaklığının belirlenmesi için olmuştur. Bu doğrultuda büyüme 30 ve 37°C'de nütrient besiyerindeki büyümesi spektrofotometrik olarak OD₆₀₀ takip edilerek izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 8'de özetlenmiştir. *B. subtilis* büyümesi incelendiğinde, her iki sıcaklıkta da hücrelerin büyüdüğü, düşük sıcaklıkta büyümenin biraz daha yavaş olduğu gözlenmiştir. 37°C'de büyümenin biraz daha hızlı olması nedeniyle, bundan sonraki çalışmaların bu sıcaklıkta yürütölmesine karar verilmiştir.

B. subtilis hücreleri için tekrarlı yapılan deneylerde aynı büyüme profili elde edildiğinden bu hücreler ile tek önkültür ile çalışılmıştır. 5 mL önkültür gliserol stoğu kullanılarak nütrient besiyeri içinde hazırlanmış ve 37°C ve 180 rpm'de 16 saat büyümeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 50 mL nütrient besi yeri içeren 250 mL erlen veya 100 mL nütrient besi yeri içeren 500 mL erlene %1 oranında ekim yapılmıştır (Gerekli havalandırma için erlen hacmi ile besi yeri ortamının birbirlerine oranları 5:1 (v/v) olarak tutulmuştur). 600 nm'de kültürün OD değeri 0.5-0.6 aralığına ulaştığında hücreler seçilen alkaloitlerin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Alkaloitler DMSO (Duchefa Biochemie) içerisinde çözöldüğünden, kontrol hücreleri DMSO ile muamele edilmiştir. Büyütme spektrofotometrede OD₆₀₀ ölçümleri ile takip edilmiştir. Elde edilen büyüme grafiklerine göre çalışılacak alkaloit konsantrasyonları belirlenmiştir.

Canlı hücre sayımlarının (CFU) eldesi belirli aralıklarda alınan 1 mL örnekler seri seyreltme ile katı nütrient besi yerlerine yayılmıştır. Bu petrilere oluşan koloniler 37°C'de bir gece inkübasyonun ardından sayılmışlar ve canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

3.4 Alkaloitler için Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bir antimikrobiyal maddenin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri, 37°C'de 18 saat veya 30°C'de 24 saat süresince bu maddenin hücre büyümesini tamamen durduran

konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. Seçilen aporfin alkaloitlerin *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerine karşı MİK değeri mikro-dilüsyon metodu kullanılarak belirlenmiştir (Wu vd., 1997). Bu yöntemde LB besi yerinde 180 rpm çalkalama hızında 37°C'de bir gece boyunca büyütülerek hazırlanan önkültür kullanılmıştır. Ertesi gün büyüyen hücrelerinin konsantrasyonu 1 mL'de 10^6 hücre olacak şekilde ayarlanmış ve DMSO içinde hazırlanan 0,5 g/L'lık antimikrobiyal madde solüsyonlarının azalan konsantrasyonlarının ilavesi ardından, hücreler 96 kuyuluk eliza petrilinde bir gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 18 saat sonunda büyümeyi engelleyen berberin konsantrasyonu belirlenmiştir. DMSO'nun da hücrelere toksik etkisi olduğundan MİK değeri DMSO'ya göre bağıl olarak ölçülmüştür.

3.5 Tüm Hücre Proteinlerinin Eldesi

3.5.1 *E. coli* Proteinlerinin Eldesi ve Temizlenip Hazırlanması

İlaç muamelesinden bir saat sonra, çalışılacak *E. coli* model hücreleri 20 dakika 6,000 g, 4°C santifüj edilmiştir. Hücre pelletleri 50 Mm Tris tampon çözeltisiyle (pH 7.8) yıkanmıştır. Bu hücrelerinin total proteinlerinin ekstraksiyonu için ProtoPrep Sample Extraction kiti (Sigma) kullanılmıştır. Kısaca, 150-250 mg hücre pelleti 1.5 ml protein ekstraksiyon reaktifi tip-4 ile homojenize edilmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sıvı azot kullanılarak yapılan tekrarlı dondur-çöz tekniği ile hücre lizisi yapılmıştır. Süspansiyon 10 dakika 15,000 g, 4°C derecede santrifüj edilip ve protein içeren üst-faz, yeni tüplere (LoBind) transfer edilmiştir. İndirgeyici madde tributyl phosphine (TBP) protein karışımına 5mM konsantrasyonda eklenmiş ve karışım bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra, karışım iodoacetamide ile 1.5 saat oda sıcaklığında alkilenmiştir. Son olarak, protein karışımı oda sıcaklığında 25,000 g'de 5 dakika çözünmemiş madde kontaminsayonunu elemek için santrifüj edilmiştir. Elde edilen protein karışımı alikotlanarak sonraki analizler için -20°C saklanmıştır.

Çalışılacak proteinlerin tuzlarından ayrılması için Zeba Spin Desalting kolonları, 7K MWCO (ThermoScientific), kullanılmıştır. Proteinler üretici protokolü kullanılarak temizlenmiştir. Kolonun materyali, saklama solüsyonundan 1,500 g'de 1 dakika santrifüj edilerek ayrılmıştır. 300 µl Tris tamponu (pH 7.8) resin üstüne pipetlenerek resin yatağı tekrar 1 dakika 1,500 g'de santrifüj edilmiştir. Bu aşama iki defa tekrar edilmiştir. 30-130 µl protein örneği kolona yüklenerek, resin yatağı tarafından emilmesi sağlanmıştır. 1,500 g'de 2 dakika santrifügasyondan sonra protein örnekleri sonraki analizler için toplanmıştır. Proteinlerin konsantrasyonunu belirlenmesi için Bradford protokolü kullanılmıştır (Bradford, 1976). Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır.

3.5.2 *B. subtilis* Proteinlerinin Eldesi ve Temizlenip Hazırlanması

İlaç muamelesinden bir saat sonra, *B. subtilis* hücreleri 15 dakika 4,000 g, 4°C'de santifüj edilmiştir. Hücre pelleti iki defa 50 Mm Tris tampon çözeltisiyle (pH 7.8) yıkanmış ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. *B. subtilis* 168 hücreleri gram (+) oldukları için *E. coli* için geliştirilen protein ekstraksiyon protokolü yeterli olmamıştır ve protein elde verimi çok düşük kalmıştır. Proteom analizi için yeterli yüksekliğe sahip konsantrasyonda protein eldesi için hücreler farklı parçalama yöntemlerine (sonikasyon ve boncuklar ile parçalama) ve tamponlarına maruz bırakılmıştır.

B. subtilis hücrelerinin parçalanması için önce sonikasyon denenmiştir. Hücrelerin tamamen parçalanmasını sağlayacak 30 saniyelik döngü sayısını bulabilmek için yapılan deneyler sonucunda toplam 540 (18 x 30) saniyelik sonikasyon süresinin yeterli olduğunu göstermiş ve sonikasyonun kullanıldığı deneylerde bu süre dikkate alınmıştır.

Boncuklu parçalama sisteminde ise MPBIO marka FastPrep cihazı kullanılarak hücreler parçalanmıştır. Bunun için de 2 farklı boncuk boyutu ve 3 (4 m/s - 20 s, 4 m/s - 40 s, 6 m/s - 20 s) farklı koşul kullanılmıştır. Kullanılan boncuklardan bir tanesi FastPROTEIN™ Blue Matrix (B1) diğeri ise FastPROTEIN™ Red Matrix (B2)'tir. Kullanılan boncuklardan ilki özellikle bakteriler için tasarlanmış olduğundan dolayı tercih edilse de, laboratuvar stoklarımızda bulunmasından dolayı ikinci tip boncuklar ile de yöntemin basit olması nedeniyle karşılaştırma amaçlı çalışılmıştır. Boncukların kullanıldığı yöntemde kısaca şöyledir: 150-250 mg hücre pelleti 5 mL optimize edilmiş tamponda çözölmüştür (8 M üre, 2M tioüre, 4 % CHAPS, 50 mM DTT). Daha sonra MPBIO marka FastPrep cihazında hücreler değişen sürelerde boncuklar ile muamele edilmiş ve proteinler santifüj sonrası elde edilmiştir. Proteom analizi için ürün kalitesini arttırmak için *B. subtilis*'ten elde edilen örnekler proteaz inhibitörü (PMSF) ve nükleaz karışımı ile ekstraksiyonun ardından muamele edilmiştir. Elde edilen protein tüm karışımları alikotlanarak sonraki analizler için -20°C saklanmıştır.

B. subtilis örneklerinden başta tuzlar olmak üzere kirletici unsurların ayrılması için ZEBA (7K MWCO, ThermoScientific) kolonları ve ya BIORAD ReadyPrep 2-D Clean-up Kit kullanılmıştır.

3.6. Proteinlerin İki Boyutlu (2D) Jellerde Ayrımı ve Analizi

3.6.1 Proteinlerin Elektroforetik Ayrımı

Üç biyolojik replikasyondan ekstrakte edilen proteinler iki boyutlu (2D) elektroforez ile birinci boyutta izoelektrik noktalarına göre, ikinci boyutta moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Bu

amaçla, ilk boyutta sabitlenmiş IPG strip (immobilize pH gradienti) ve ikinci boyutta SDS-PAGE uygulanmıştır.

İlk boyut ayırımından önce, gümüş boyama için 60-300 µg, colloidal coomasie brilliant blue (CBB)-G250 ile boyama için 800-1000 µg temizlenmiş protein örnekleri eser miktarda bromfenol mavisi içeren optimize edilmiş tampon da çözölmüştür. Bu proteinler rehidrasyon dengeleme tepsinine yüklenmiş ve her örneğin üzerine dikkatlice 17 cm IPG stripleri yerleştirilmiştir. IPG stripleri protein örneklerini tamamen emince proteinler 2-3 ml mineral yağı ile kaplanmıştır.

Protein örneklerini emmiş 17 cm IPG striplerindeki rehidre proteinler ilk boyut ayrıştırması için PROTEAN IEF odaklı tepsinin üzerine yerleştirilmiştir. Striplerin yürütölme koşulları 20°C; 250 V'da 20 dakika (lineer), 10000 V'da 3 saat (lineer) ve 10000 V'da 45000 V-h (hızlı) şeklindedir. İzoelektrik odaklanmayı takiben, IPG stripleri dengeleyici tampon çözeltileri I ve II'ye (ReadyPrep™ 2-D Starter Kit tarafından temin edilen) 10 dakika daldırılmıştır.

Daha sonra IPG stripleri moleköler ağırlığına göre ayrıştırmak üzere SDS poliakrilamit jelinin üzerine yerleştirilmiştir. SDS poliakrilamit jel, %15 akrilamit ve %0.2 bisakrilamit karışırılıp 10 dakika degaz edilerek hazırlanmıştır. Daha sonra %1.28 APS bu solösyonla iyice karışırılmıştır. Jel solösyonu direkt olarak iki cam tabakanın arasındaki boşluğa dökölmüş ve üzeri izopropanol ile örtölüp ve jelin polimerize olması sağlanmıştır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra izopropanol jelin HPLC seviyeli suyla yıkanması ile temizlenmiştir. Daha sonra, stripler jellerin zerine hava kabarcığı oluşturmamasına dikkat edilerek yerleştirilmiş ve striplerin üzerine agaroz solösyonu eklenerek sabitlenmiştir. Agaroz çözeltisi katılaştığında jel kalıbı elektroforez tankına yerleştirilerek yürütme tamponu ile doldurulmuştur. SDS poliakrilamit jeline 30 mA akım 15 dakika ve 120 mA akım 215 dakika uygulanmıştır.

3.6.2 2-D jellerinin Boyanması

Elektroforez sisteminden çıkan jeller proteinlerin görüntölünebilmesi ve analizleri için iki farklı yöntem uygulanmıştır.

Daha hassas olan ve çok sayıda proteinin görüntölünebilmesini sağlayabilen gümüş boyama metodu için jeller 2 saat boyunca gümüş boyama için özel sabitleyici solösyonda (toplam 500 mL içerisinde 60 mL asetik asit, 250 mL etanol, 250 µL % 37'lik formaldehit) bekletilmişlerdir. Bunu takiben jeller yıkama solösyonuna (% 20'lik etanol) alınıp 20 dakika boyunca bu solösyon içerisinde çalkalanmışlardır. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra jeller 2 dakika hassaslaştırma çözeltisinde (500 mL suda 157 mg sodyumtiyosölfat.pentahidrat) bekletilmişlerdir. Daha sonra jeller HPLC suda 20 dakika çalkalanmışlardır. Bu işlem de 3

kez tekrarlanmıştır. Su ile yıkanan jeller 20 dakika gümüş içeren boyama çözeltisinde (500 mL su içerisinde 1 g gümüş nitrat, 280 µL % 37'lik formaldehit) bekletilmişlerdir. Boyamayı takiben jeller tekrardan 3 kez 20'şer saniye süresince HPLC suda çalkalanmışlardır. Gümüş ile boyama işlemi jellerin 5 dakika banyo solüsyonu (500 ml su içerisinde 3,17 mg Sodyumtiyosülfat.pentahidrat, 30 g Sodyum karbonat, 250 µl % 37'lik formaldehit) içinde çalkalanması ile tamamlanıp ve protein spotları jel üzerinde belirginleşmişlerdir. Boyama süresinin uzaması proteinlerin daha çok boyanmasını ve belirginleşmesini sağlamaktadır. Ancak süre çok uzun tutulursa jelin tamamı boyanır ve proteinler seçilemez. Bu nedenle jel boyama süresi çok hassastır. Boyama tamamlandığında jeller yaklaşık 10 dakika stop1 solüsyonunda (% 12'lik asetik asit) bekletilerek boyama durdurulmuştur. Daha sonra jeller stop2 solüsyonuna (% 1'lik asetik asit) alınıp ve en az 15 dakika bekletilmişlerdir.

Jellerdeki proteinler analiz için ise kollaidal boyama ile görüntülenmişlerdir. Bu metot ile jeller bir gece boyunca kollaidal boyama için özel sabitleyici solüsyonda (% 50 etanol; % 2 fosforik asit) bırakılmışlardır. Kollaidal boyama için özel sabitleyici solüsyonu jelden ayırdıktan sonra, jel hafif çalkalamalı ortamda iki saat boyunca % 34 metanol, % 17 amonyum sülfat, % 2 fosforik asit çözeltisinde inkübe edilmişlerdir. İki saatin sonunda bu solüsyondan ayrılan jeller boyama çözeltisine (% 34 metanol, % 17 amonyum sülfat, % 2 fosforik asit içinde 100 ml 66 mg/100'lık CBB-G250) alınıp ve üç gün boyunca hafif çalkalamalı ortamda boyanmışlardır. Boyama kalıntıları jelin HPLC seviyeli su ile yıkanması ile temizlenmiştir.

3.6.3 Diferansiyel Olarak İfade Edilmiş Proteinlerin Belirlenmesi ve Analizi

Alkaloit muamelesi karşısında diferansiyel olarak ekspres edilmiş proteinlerin belirlenmesi için, bütün boyanmış 2-D jeller GE HEALTHCARE veya BIORAD görüntü tarama sistemlerinden birisi ile görüntülenmiştir. *E. coli* proteinleri ile elde edilen jel görüntüleri REDFIN yazılımı (Bio-Rad) ile analiz edilmiştir. *B. subtilis* proteinleri ile elde edilen jel görüntüleri ise PDQuest (Bio-Rad) yazılımı ile edilmiştir. Bu yazılımlar ile kontrol grubu ve alkaloit ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen jel görüntüleri karşılaştırılarak her bir protein ekspresyonundaki farklılaşma hesaplanmıştır. 1.8-2.0 kat artışın üzerindeki değerler önemli kabul edilmiştir.

Belirlenen protein spotları 2-D jelden falçata veya robot yardımıyla kesilerek düşük bağlanımlı protein mikrosantrifüj tüplerine (Eppendorf® protein lobind) aktarılmıştır. *E. coli*'de belirlenen proteinlerin kütle spektrometrisi ile tayinleri York Üniversitesi, İngiltere (Biyoloji bölümü, proteomiks laboratuvarı) tarafından, *B. subtilis*'te belirlenen proteinlerin kütle spektrometrisi ile tayinleri Kocaeli Üniversitesi (Tıbbi-Biyoloji bölümü, proteomiks

laboratuvarı) tarafından yapılmıştır. Peptit tayini sadece 0.05 ve daha altı skor taşıyan peptitleri kabul etmesi için filtre edilmiş MS/MS parçalama datasına dayandırılarak yapılmıştır. Elde edilen spektral datanın taraması da *E. coli* ve *B. subtilis* için uygun veri tabanlarına karşılık yapılmıştır.

3.7 Tüm Hücre Lipitlerinin Eldesi

Kontrol ve alkaloitler ile muamele edilmiş *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinden 500 µL alınarak 4°C'ta 2 dakika süresince 9500 rpm hızında çöktürülmüştür. Üst sıvı atıldıktan sonra hücre pelleti 500 µL 155 mM amonyum karbonat (pH 8.0) içinde çözülmüşlerdir. Bu yıkama aşaması 3 kez tekrarlandıktan sonra pellet son olarak 200 µL hacimde 155 mM amonyum karbonat (pH 8.0) içinde çözülmüştür.

Lipit ekstraksiyonu için önce standartlar Wheaton tüplerine pipet yardımı ile konulmuştur. Standart miktarı 25 ile 100 pmol arasında değişmektedir. Tüm lipit standartları Avanti Polar Lipids'ten temin edilmiştir. 50 pmol PE lipit karışımında PE-28:2, PE-40:2 ve PE-44:2, 10 pmol PG lipit karışımında PG-28:2, PG-40:2 ve PG-44:2 bulunmaktadır. Lipit ekstraksiyonu 3 aşamadan oluşmaktadır. En son elde edilen kloroform fazı MS analizleri için kullanılmaktadır. İlk aşama 1.9 mL hacminde 10:5:0.15 oranlarında MeOH/kloroform/HCl (%37) çözeltisinin standartlara ilavesidir. Daha sonra 15 µL örnek ilave edilmiştir. Son olarak bu örnek üzerine 485 µL su (HPLC) ilave edilmiştir. Bu karışım vortekslenip sonra üzerine 500 µL of kloroform ve 500 µL of su ilave edilip ve karışım tekrardan iyice vortekslenmiştir. Faz ayrımını elde etmek için karışım 2000 rpm 2 dakika 4°C'de santrifüjlenmiştir. Alttaki kloroform fazı yeni bir Wheaton tüpe (x^{II}) geçirilmiştir. 500 µL of kloroform hem 1. aşamadan gelen Wheaton tübe, hem de Wheaton x^{II} tübe ilave edilmiştir. Ayrıca Wheaton x^{II} tübe 500 µL su ilave edilmiştir. Her iki Wheaton tüpleri iyice vortekslenip santrifüjlenmişlerdir. Wheaton x^{II} tüpteki kloroform fazı yeni bir Wheaton tübe ve birinci ekstraksiyondan gelen kloroform fazı da x^{II} tüpüne aktarılmıştır. x^{II} tübündeki karışım tekrar santrifüjlenip ve kloroform fazı son Wheaton tübüne aktarılmıştır. Kloroform fazı azot gazı altında kurutulup, MS analizine kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.8 Tüm Hücre Lipitlerinin Analizi

MS analizi için, kurutulmuş lipit örnekleri MeOH içerisindeki 10 mM'lık amonyum asetatın 50 µL'sinde çözünmüştür. Karışımın 10 µL'si Triversa Nanomate (Advion) ile direkt-infüzyon denemesi için kullanılmıştır. MS analizi, Özbalci vd. (2013) tarafından tarif edilen parametrelere göre Qtrap 550 (Applied Biosciences) ile gerçekleştirilmiştir. Lipitler Neutral tarama kaybı kullanılarak (Neutral loss PE of 141 u, Neutral loss PG of 189 u) analiz edilmiştir.

Lipitler LipidView yazılımı vasıtasıyla tanımlanmıştır. Sonuçların istatistiksel analizi R yazılımı ile yapılmıştır. Biyolojik kopyalama sayısı $n=10$ 'dur. Hata çubukları için ortalamanın standart hatası (SEM) kullanılmıştır. Veri kümesindeki istatistiksel farklılığın değerlendirilmesi için anlamlılık düzeyi $p=0,95$ olarak uygulanmıştır.

3.9 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

OMİK verilerin validasyonu için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) metodu kullanılmıştır. RNA ile DNA izolasyonu ve cDNA sentezi için Qiagen ve Roche kitleri kullanılmıştır. Gerekli primerlerin tasarımı için literatürden faydalanılmış ve PrimerPremier 6.0 yazılımı kullanılmıştır. Primer tasarımı yaparken aşağıdaki özellikler göz önünde bulundurulmuştur:

- Erime sıcaklığı (T_m) 55 ile 65°C arasında
- G+C miktarı % 45-55
- 18-24 bp uzunluğunda primer
- 80-150 bp ampikon uzunluğu

Bunlara ek olarak alternatif primerler arasından seçim yaparken şu özelliklere de dikkat edilmiştir.

- Dimerizasyon olmamalı
- Hairpin oluşturmamalı (çoğunlukla >3bp)
- Self-dimer yapmamalı

Daha sonra tasarlanan bu primerler sentezletilmiş ve uygunlukları template olarak genomik DNA kullanılarak teyit edilmiştir. Bunun için aşağıdaki program kullanılmıştır.

Kullanılan qPZR protokolü şöyledir: 95°C'de 3 dakikayı takiben, 35 döngü olarak 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 60 saniyedir.

Daha sonra belirlenmiş gen bölgeleri LightCycler 1.5 cihazı (Roche) kullanılarak qPZR analizi için çoğaltılmıştır. qPCR ile analiz için LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) kiti kullanılmıştır. Amplifikasyon toplam 20 µl reaksiyon hacminde 2 ng cDNA, 4 µl SYBR Green I karışımı, her bir primerden 0.25 µl (125 nM) ve 13.5 µl PCR kalite su ile gerçekleştirilmiştir.

Genel olarak kullanılan qPZR protokolü şöyledir: 95°C'de 10 dakikayı takiben, 40 döngü olarak 95°C'de 10 saniye, 57°C'de 10 saniye ve 72°C'de 45 saniye. Ancak tasarlanan primerlerin erime noktalarına göre yapışma sıcaklığı değiştirilmiştir.

Erime eğrisi analizi yapılarak da her bir primer çifti için tek bir PCR ürünü elde edildiği teyit edilmiştir. Negatif kontrol reaksiyonlarına cDNA ilave edilmemiştir. Farklı cDNA seyreltmeleri

ile yapılan reaksiyonlar ile de amplifikasyon verimliliği belirlenerek transkriptom da seviyesi değişmeyen gene (housekeeping gene) karar verilmiştir. Bunun için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Öncelikle ΔC_t ($C_{t, \text{ hedef gen}} - C_{t, \text{ housekeeping gen}}$) ye karşı log(cDNA dilüsyon) grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafikteki eğimin sıfıra yakın olması benzer gen verimlilikleri işaret edip $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodunun geçerliliğini göstermektedir. Daha sonra bu metot ile genlerdeki ifade farklılığı hesaplanmıştır.

Seçilen genlerin primer tasarımı için literatürden faydalanılmış ve PrimerPremier 6.0 yazılımı kullanılmıştır. *E. coli* ve *B. subtilis* için tasarlanan primerler Tablo 2 ve

Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 2. qPCR ile analiz edilmek üzere *E. coli* için seçilen genlere ait primerler

Primer	Dizi (5'-3')*	Amplikon Uzunluğu (bp)	Referans
<i>rrsG</i> -F	CTAATACCGCATAATGTCTCGCAAGA	164	Bu çalışma
<i>rrsG</i> -R	CCGTGTCTCAGTTCCAGTGT		Bu çalışma
<i>rpsL</i> -F	GCAAAAACGTGGCGTATGTACTC	104	Swick vd., 2011
<i>rpsL</i> -R	TTCGAAACCGTTAGTCAGACGAA		Swick vd., 2011
<i>envZ</i> -F	TTCCGTTACCCGTGCCTTTA	150	Bu çalışma
<i>envZ</i> -R	CCATCCTGCTCGCTCATCA		Bu çalışma
<i>ompR</i> -F	GCCTGCTGACTCGTGAATC	107	Bu çalışma
<i>ompR</i> -R	CATCGGGTTGCTCTGACTAC		Bu çalışma
<i>ompF</i> -F	CCTATCGTAACTCCAATTCT	142	Bu çalışma
<i>ompF</i> -R	AAGCCTTCGTATTCGTAGC		Bu çalışma
<i>ompC</i> -F	GTGCTACCTACTACTTCAAC	115	Bu çalışma
<i>ompC</i> -R	GCTACGATGTTATCAGTGTT		Bu çalışma
<i>ompX</i> -F	CGACTACGGTTTCTCCTAC	94	Bu çalışma
<i>ompX</i> -R	GCTACGAATACGGCTCTG		Bu çalışma
<i>tolB</i> -F	GCAGGCATTACGAGTAGC	119	Bu çalışma
<i>tolB</i> -R	AAGGAACAACACCAATAGGA		Bu çalışma
<i>pal</i> -F	AAGTGCTGAAAGGGCTGATG	81	Bu çalışma
<i>pal</i> -R	CGTCATTGCTGGCGTTCTT		Bu çalışma
<i>otsA</i> -F	TCTCCAATGCCGTTCTCT	146	Bu çalışma
<i>otsA</i> -R	CCAGATAATGTCATCGTCTTG		Bu çalışma
<i>otsB</i> -F	TGGGCGGAATGTCAGTAA	112	Bu çalışma
<i>otsB</i> -R	TGTTGTAATGCGGTGGTTAT		Bu çalışma
<i>malE</i> -F	AACTATCTGCTGACTGATGA	92	Bu çalışma
<i>malE</i> -R	GCCAACTCTTCCTCGTAA		Bu çalışma
<i>mdtA</i> -F	TACCGCCGCTAATACCGTTA	98	Bu çalışma
<i>mdtA</i> -R	GTAAATCGCCTGTTTGACCT		Bu çalışma
<i>glk</i> -F	GGTAAGCCTATTGCGGTT	134	Bu çalışma
<i>glk</i> -R	GCCTCTTCTTCACTATTCG		Bu çalışma
<i>msbA</i> -F	GGTCAGCGTCAGCGTATTG	90	Bu çalışma
<i>msbA</i> -R	GGTATCCAGAGCCGAGGTAG		Bu çalışma

<i>tufA</i> -F	GTGTTCTGCGTGGTATC	87	Bu çalışma
<i>tufA</i> -R	ACTTTGTGTGCGGCTTGA		Bu çalışma
<i>lamB</i> -F	CGGCGACAAGAACAATCA	94	Bu çalışma
<i>lamB</i> -R	TGCGAAGACACGAATAGC		Bu çalışma
<i>treA</i> -F	TCGCAACCGCCCTTCTTT	122	Bu çalışma
<i>treA</i> -R	TCAACACCGTCCATCCAGTAA		Bu çalışma
<i>ptsI</i> -F	TCATCTCTGTTGAAGAAGTG	188	Bu çalışma
<i>ptsI</i> -R	ATCATTGGTGCCGATACTA		Bu çalışma
<i>ptsH</i> -F	CCAGCAAGAAGTTACCATTAC	188	Bu çalışma
<i>ptsH</i> -R	CGGAGATAGTCACAACGG		Bu çalışma
<i>crr</i> -F	CCGACGACAAGAAGGATACC	122	Bu çalışma
<i>crr</i> -R	AGCAATACCATCACCAACGATT		Bu çalışma
<i>mglB</i> -F	TACTGAACGATGCTAACAAC	138	Bu çalışma
<i>mglB</i> -R	TATCTACGCCAACATAAGGT		Bu çalışma
<i>acrE</i> -F	TCCAACCTGACGCAATTCTT	136	Bu çalışma
<i>acrE</i> -R	TTATCGCCAATCGCCTGACT		Bu çalışma
<i>acrF</i> -F	TCTGTTCTGGTGGCATTGATTC	152	Bu çalışma
<i>acrF</i> -R	CCGACGCTGTTGGTGTAGT		Bu çalışma
<i>phoE</i> -F	GGAAGCCTGGACCGATAT	125	Bu çalışma
<i>phoE</i> -R	CGATAACGCCGAAGAAGT		Bu çalışma

* *F*, İleri primer; *R*, Geri primer.

Tablo 3. qPZR ile analiz edilmek üzere *B. subtilis* için seçilen genlere ait primerler

Primer	Dizi (5'-3')*	Amplikon Uzunluğu (bp)	Referans
<i>bmr-F</i>	ATTCCAGTAACGCCGACCAT	244	Bu çalışma
<i>bmr-R</i>	TGATACCGCCCAGCATACG		Bu çalışma
<i>gyrA-F</i>	TGGTCAGAAATGGCTCAGGATT	77	Bu çalışma
<i>gyrA-R</i>	TCCGTCAACAGAACCGAAGT		Bu çalışma
<i>gyrB-F</i>	GTAGGTGCGTCGGTCGTAA		Bu çalışma
<i>gyrB-R</i>	TGTGTCGTCGTTCTGTATGA	152	Bu çalışma
<i>16s rRNA-F</i>	TGCGTAGAGATGTGGAGGAA		Bu çalışma
<i>16s rRNA-R</i>	GCGGAGTGCTTAATGCGTTA	187	Bu çalışma

**F*, İleri primer; *R*, Geri primer.

3.10 Spor Oluşumunun İncelenmesi

Bacillus subtilis stres koşulları altında endospor oluşturan bir bakteridir. Bu bakteride farklı aporfin alkaloidlerin varlığında endospor oluşumunu incelemek amacıyla değişen konsantrasyonlarda alkaloidlere maruz bırakılan hücrelere endospor boyama yöntemi uygulanmıştır. Endospor boyama için modifiye edilmiş Schaeffer-Fulton endospor boyama yöntemi kullanılmıştır (Schaeffer ve Fulton, 1933). Endospor oluşumu incelenecek olan bakteri kültürü lam üzerine damlatılmıştır ve ısı ile fikse edilmiştir. Sonrasında endospor duvarına penetre olarak endosporları yeşile boyayan malaşit yeşili damlatılmış ve 5 dakika bekletilmiştir. Preparatlar su ile yıkanarak 3 dakika boyunca safranin ile boyanmıştır. Su ile tekrar yıkanan preparatlar kurutularak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Proje kapsamında *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri üzerinden etki mekanizmalarının anlaşılması için aporfin sınıfına ait 3 alkaloid belirlenmişti. Bunlar *Papaver rhoeas* bitkisinden ekstrakte edilmiş olan (-)-römerin ile SIGMA'dan temin edilmiş olan boldin ve bulbokapnindir. Bu üç alkaloid yapı olarak birbirlerine çok benzeseler de aynı bakteriler üzerinde çok farklı etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak mekanistik olarak 2 model bakteri üzerindeki etkilerinin anlaşılması için önce minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) incelenmiş ve daha sonra bu değerlere bağlı kalınarak her iki bakteri için de sıvı ortamda büyüme grafikleri çıkarılmıştır. Büyüme eğrileri ve MİK değerleri kullanılarak incelenecek konsantrasyonun belirlenmesini takiben lipidom ve proteom analizleri yapılmıştır.

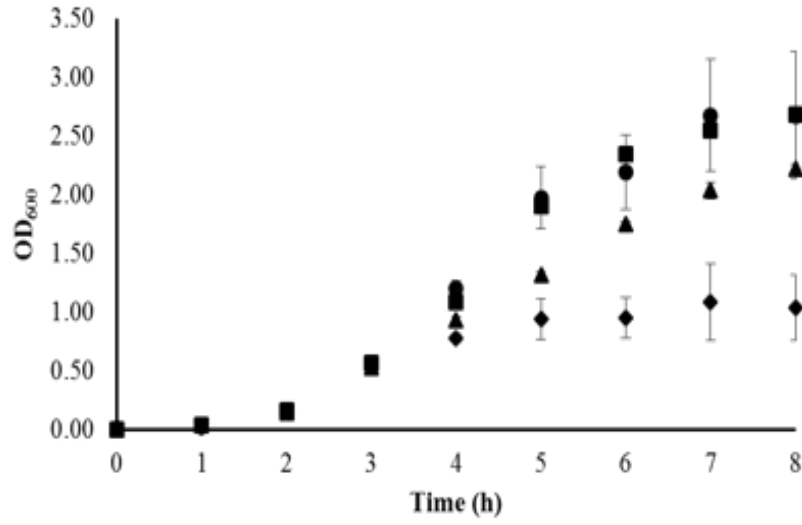
4.1 Aporfin Alkaloidlerin *E. coli* Üzerindeki Etkileri

4.1.1 Aporfin Alkaloidlerin *E. coli* MİK değerleri ve Büyümeye Etkileri

(-)-Römerin methin alkaloidinin *E. coli* bakterisi üzerindeki MİK değeri 300 µg/ml olarak bildirmiştir (Tsai vd., 1989). Bu bulgudan yola çıkarak 400 µg/ml ve bundan düşük (-)-römerin konsantrasyonları ile *E. coli* TB1 suşu için mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değeri belirlenmesi için çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar (-)-römerinin *E. coli* TB1 suşu için MİK değerinin 100 µg/ml olduğunu göstermiştir. Benzer mikrodilüsyon deneyleri boldine ve bulbokapnin için de MİK değerinin belirlenmesine yönelik yapılmıştır ancak sonuçlar *E. coli* TB1 suşu için bu değerlerin ≥ 400 µg/ml olduğunu göstermiştir. Bu elde edildikten MİK değerleri (-)-römerinin *E. coli* için potansiyel bir antimikrobiyel olasılığı üzerinde durulması gerektiğini göstermiştir.

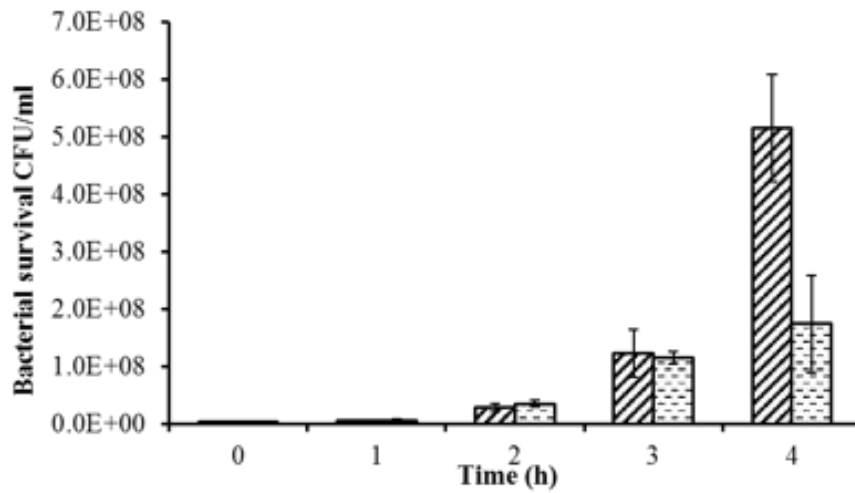
Belirlenen MİK değerleri kullanılarak 0, 25, 50 ve 100 µg/ml (-)-römerin konsantrasyonları varlığında LB besi yerinde *E. coli* ile büyüme eğrileri çıkarılmıştır (Şekil 2).

Hücrelerin (-)-römerin alkaloidine maruz bırakıldıktan bir saat sonra büyüme hızlarında önemli düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Spesifik büyüme oranı en düşük olan hücre grubu 100 µg/ml (-)-römerine maruz bırakılan hücreler olduğu açıkça görülmüştür. (-)-Römerin DMSO içinde çözüldüğü için kontrol kültüründeki hücreler de DMSO'ya maruz bırakılmıştır. 100 µg/ml (-)-römerin ilavesinin ardından hücrelerin 1 saat için ölmeye başlamaları nedeni ile bu koşullar altındaki protein ve lipid haritalarının çıkarılması uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil 2. OD₆₀₀ değeri 0,5-0,6 değerine ulaştığında artan (-)-römerin konsantrasyonları ile muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinin büyüme grafikleri. (●) kontrol, (■) 25 µg/ml, (▲) 50 µg/ml ve (◆) 100 µg/ml. (-)-Römerin OD_{600nm} 0.5'e ulaştığında ilave edilmiştir.

E. coli hücrelerinin (-)-römerin ilavesini takiben proteom ve transkriptom analizlerinin yapılabilmesi için ortamda yeteri kadar canlı hücre bulunması gerekmektedir. Bu amaçla 100 µg/mL (-)-römerin ilavesinin ardından *E. coli* hücrelerinde canlı hücre sayımı (CFU) gerçekleştirilmiştir. Canlı hücre sayımı için yapılmış olan analiz Şekil 3'te grafiksel olarak verilmiştir.

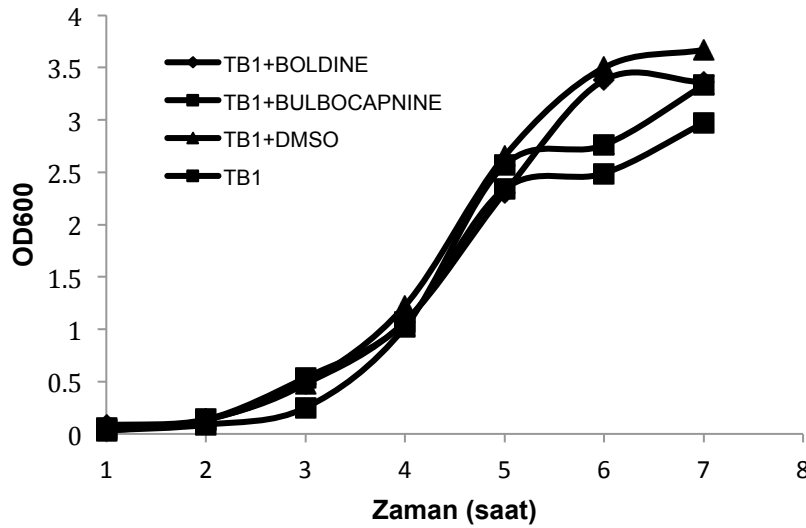


Şekil 3. (-)-Römerin ile muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinde canlı hücre sayımı. Koyu barlar kontrol ile açık barlar (-)-römerin ile muamelere edilmiş hücreleri göstermektedir. 3. saat

OD₆₀₀ değerinin 0,5-0,6 aralığında ulaşip ilaç muamelesi yapıldığı anı göstermektedir.

Şekil 3'te görüldüğü gibi DMSO ile muamele edilmiş kontrol *E. coli* hücreleri ile (-)-römerin ile muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinin canlı hücre sayımları ilaç muamelesinin yapıldığı 3 saate kadar aynıdır. 3 saatten sonra (-)-römerin ile muamele edilen hücrelerdeki canlı hücre sayısında ciddi oranda düşmüş ancak daha ileri analizlerin yapılmasına imkan verecek sayıda da canlı hücre ortamda bulunmaktadır. Elde edilen bu analzi sonuçları doğrultusunda 100 µg/ml (-)-römerin ilavesinin ardından 1 saat sonra hücre analizlerinin yapılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Daha sonra boldin ve bulbokapnin için bulunan MİK değerleri çok yüksek olduğu için, karşılaştırma amacıyla (-)-römerin için belirlenmiş 100 µg/ml konsantrasyonunda bu alkaloidleri ile *E. coli* hücreleri için büyüme grafikleri çıkarılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. OD₆₀₀ değeri 0,5-0,6 değerine ulaştığında 100 µg/ml boldin ve bulbokapnin ile muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinin büyüme grafikleri

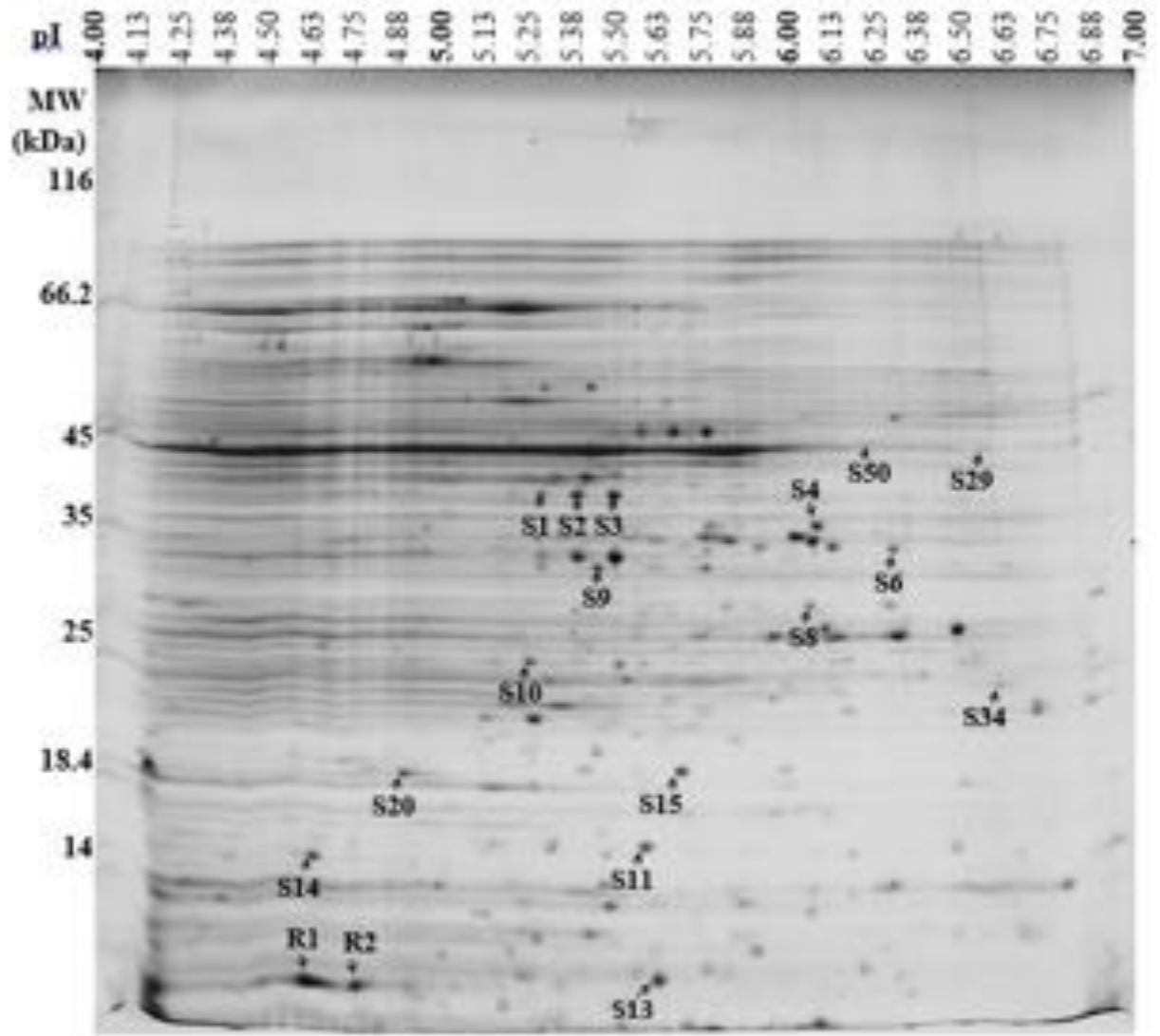
Boldin ve bulbokapnin aynı (-)-römerine gibi aporfin sınıfına ait 2 alkaloid olup yapı olarak (-)-römerine çok benzemelerine rağmen Şekil 3'te görüldüğü gibi *E. coli* üzerinde hemen hemen hiç etkileri olmamıştır. Kontrol hücreleri yine DMSO ile muamele edilmişlerdir. Tek tekrarlı yapılan bu deneyde önemli sonuç alınmadığı için tekrarları yapılmamıştır.

Literatürde boldin ve bulbokapninin *E. coli* üzerindeki etkisine dair hiçbir bilgi bulunmadığından ve bu proje kapsamında yapılan denemelerde de farklı bir sonuca ulaşamadığından ve bu deneyleri takip eden qPZR analizleri için RNA izolasyonunda sorun

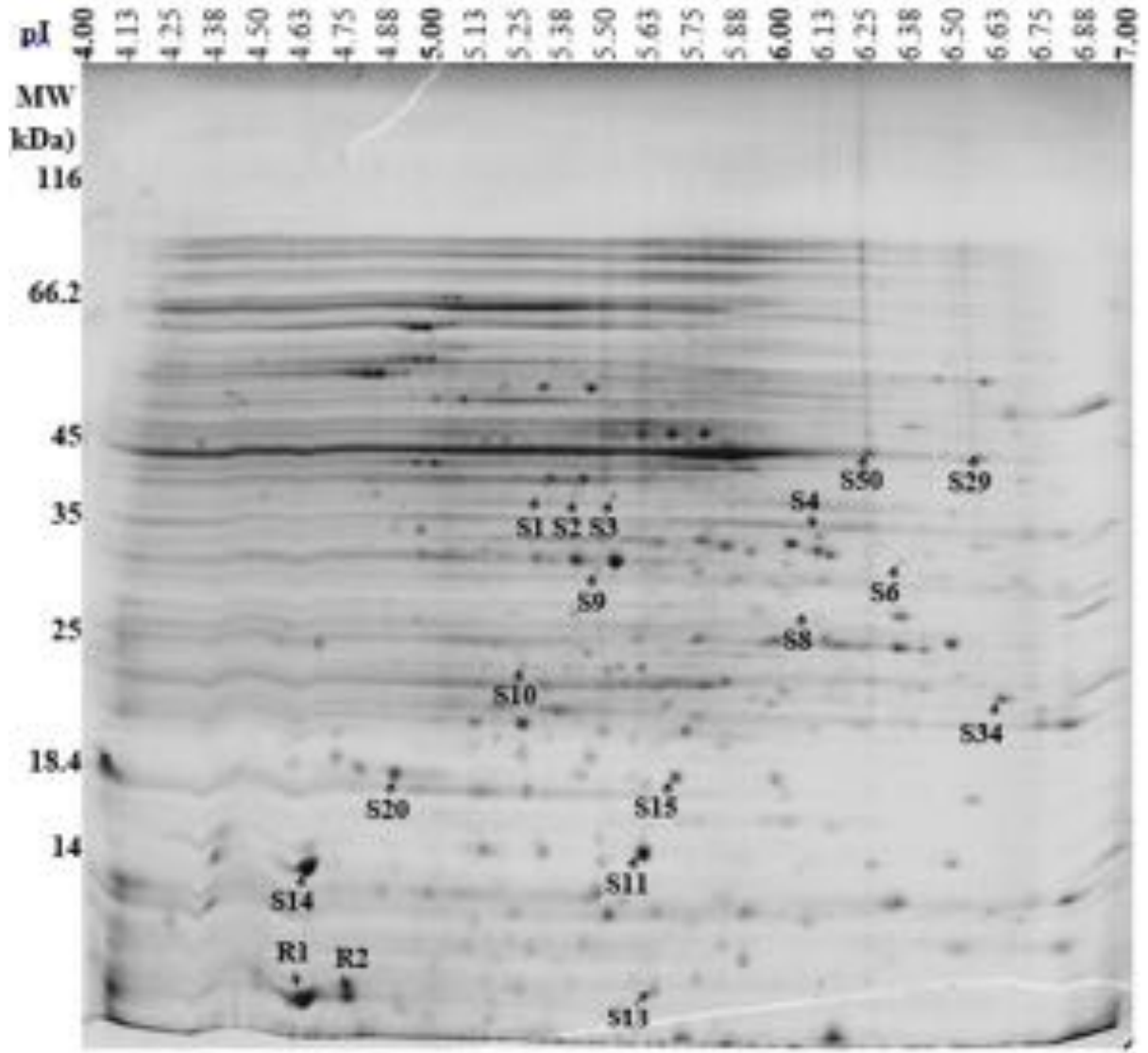
çıkıldığından bu aşamadan sonra *E. coli* ile yapılan çalışmalara sadece (-)-römerin ile devam edilmiştir.

4.1.2 (-)-Römerin Varlığında *E. coli* Proteomu

1 saat (-)-römerin ile muamelinin ardından analiz edilmek üzere *E. coli*'den ilk olarak proteinleri ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen proteinler önce Gereç ve Yöntem bölümünde detaylı olarak anlatılan şekilde iki boyutlu jel elektroforozu yöntemi ile ayrılmışlardır. Sadece Sigma-PROT-TOT (ProteoPrep Sample Extraction) kiti ile izole edilen proteinlerin 2. boyut ayırımından sonraki jellerinde yatay çizgilenmeler oluşmuştur. Tekrarlı yapılan deneylerde sonuç değişmemiştir. Bunun üzerine protein örneklerinin yeterince temiz olmadığına karar verilip protein ekstraksiyonunu takiben örnekler BIORAD marka temizleme kiti (Bio-Rad, ReadyPrep 2-D Cleanup) olası kirliliklerden uzaklaştırılmıştır. Ancak iki boyutlu elektroforetik analiz sonucunda herhangi bir iyileşme görülmemiştir. Daha sonra protein örneklerini temizlemek için BIORAD marka temizleme kiti yerine ZEBA tuzlardan arındırıcı kolonları (Zeba Spin Desalting columns, 7K MWCO, ThermoScientific) kullanılmıştır. Bu kolonlar ile örnekler temizlendiğinde iki boyutlu elektroforetik jellerde büyük ölçüde iyileşme olmuştur. Kontrol ve (-)-römerin ile muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinden elde edilen proteinlerin ZEBA kolonları ile temizlendikten sonra 2-D jeldeki görüntüleri için örnek görüntüler Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 5. Kontrol kültüründeki hücrelerden ekstrakte edilen proteinlerin ZEBA kolonları ile temizlendikten sonra 2-D jeldeki görüntüleri



Şekil 6. (-)-Römerin ile muamele edilmiş hücrelerden ekstrakte edilen proteinlerin ZEBA kolonları ile temizlendikten sonra 2-D jeldeki görüntüleri

Ekspresyonunda farklılaşma meydana gelen proteinler Ludesi REDFIN yazılımı (BioRad) ile analiz edilmiş ve karşılaştırmalı analizde bu program toplam 174 tane protein spotunun ekspresyonunda farklılaşma belirlemiştir. Bu spotlardan 48 tanesindeki değişimin değişim faktörüne göre önemli olduğuna karar verilmiştir (cut-off ≥ 1.8 fold). Bunların içinden 16 tanesi kesilebilir konsantrasyona sahip olduklarından temiz bir falçata yardımı ile en az 3 biyolojik replika jelden kesilerek kütle spektrometrisi ile tanılanmak üzere -80°C 'ta saklanmıştır. Tanılamanın doğruluğundan emin olmak için iki tane de belirgin kontrol spotu bütün jellerden kesilmiştir. Bu protein spotları R1 ve R2 olarak adlandırılmıştır. Ludesi REDFIN yazılımından elde edilen sonuçlar (-)-römerin varlığında seçilmiş bu 16 proteinden 9

tanenin azaldığını, geri kalanlarının ise arttığını göstermiştir. Kesilen protein spotlarının York Üniversitesinin Proteomik Laboratuvarında (Proteomics Laboratory, Dept. of Biology, University of York, UK) yapılan analiz sonuçları Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. (-)-Römerin muamelesini takiben *E. coli*'de ekspresyonu farklılaşan proteinlerin kütle spektrometrisi ile yapılan analiz sonuçları

Protein Spot No	Gen adı	Protein adı	Regülasyon	MS/MS skoru	Kapsanan dizi (%)	Kat değişim
S1	<i>malE</i>	Maltose binding periplasmic protein	azaldı	598	23	5.33
S2	<i>malE</i>	Maltose binding periplasmic protein	azaldı	673	23	8.68
S3	<i>malE</i>	Maltose binding periplasmic protein	azaldı	658	23	8.61
S4	<i>ansB</i>	L-Asparaginase II	azaldı	452	23	4.11
S6	<i>malM</i>	Maltose operon periplasmic protein	azaldı	380	20	4.06
S8	<i>garR</i>	Tartronate semialdehyde reductase	azaldı	538	27	2.57
S9	<i>mgIB</i>	D-galactose, D-glucose binding protein	azaldı	665	29	6.72
S10	<i>tsf</i>	EF-Ts	azaldı	734	35	2.76
S11	<i>ompX</i>	Outer membrane protein X	arttı	537	33	2.09
S13	<i>yigF</i>	Enamine/imine deaminase	azaldı	441	37	4.41
S14	<i>fimA</i>	Type-1 fimbrial protein, A chain	arttı	840	61	3.78
S15	<i>dsbA</i>	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	arttı	377	22	3.58
S20	<i>crr</i>	EIIA-Glc	arttı	666	52	1.88

S50	<i>tolB</i>	TolB	arttı	462	20	4.06
S29				489	19	
S50	<i>tufA/B</i>	EF-Tu	arttı	376	20	2.31
S34	<i>glnH</i>	Glutamine binding protein	arttı	659	35	2.45
R1	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	Kontrol	607	43	1.11
R2	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	Kontrol	607	43	1.03

Protein analiz sonuçlarından gelen bilgiler doğrultusunda, (-)-römerin'in *E. coli* üzerindeki etkisi konusunda iki temel hipotez ile ortaya çıkmıştır. Bunlardan bir tanesi büyüme ortamının ozmolaritesindeki değişim diğeri ise hücre zarının bütünlüğü ile ilgili olmuştur. Proteom datalarının qPZR metodu ile validasyonu kaçınılmazdır. Hem bu validasyon hem de ortaya atılan test edilmesi için qPZR işlemi yapılmıştır.

4.1.3 (-)-Römerin Varlığında *E. coli* Lipidomu

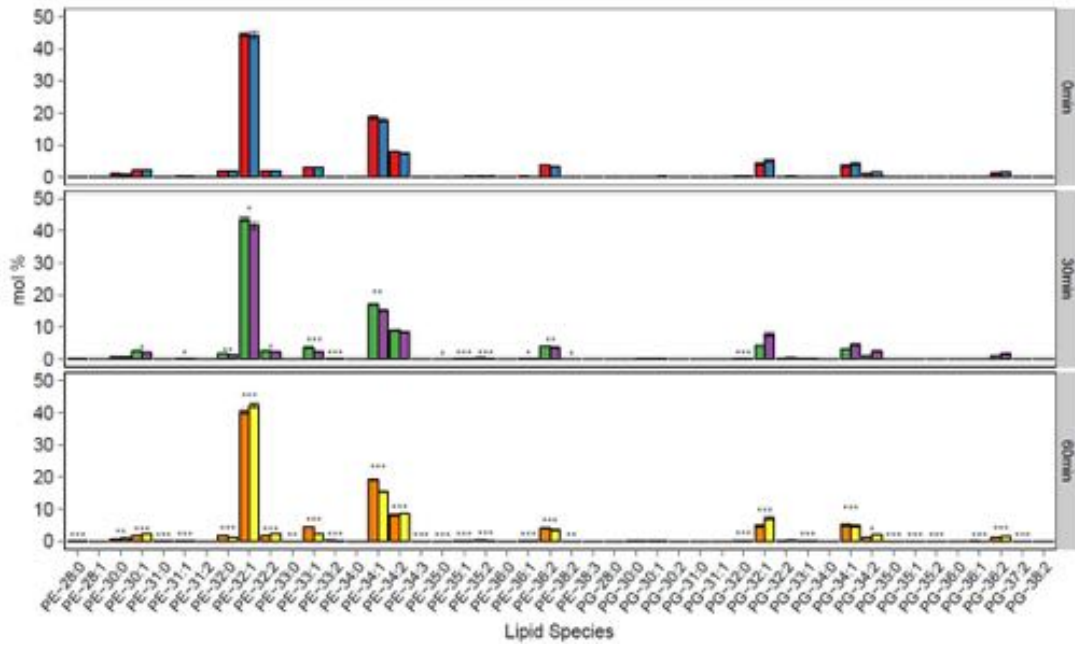
Literatürde çeşitli lipit ekstraksiyon metodu bulunmaktadır. Bunlardan, MTBE (Metil-tertiyer-bütileter) ekstaksiyonu ve asidik Bligh&Dyer ekstraksiyonu, temel bakteriyel lipit türleri olan PE, PG ve CL nin ekstraksiyon verimiyle ilgili olduğundan bu ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. MTBE ekstraksiyonu için kullanılan çözelti MTBE, ABD ekstraksiyonu için kullanılan çözelti MeOH/CHCl₃/HCL(2:1:0.0075 v/v/v) dir. Sonuçlar, CL ve PG türleri için her iki metodunun ekstraksiyon veriminin benzer olduğunu göstermiştir. PE türü için ABD metodu MTBE ye göre daha yüksek ekstraksiyon verimi sağlamıştır.

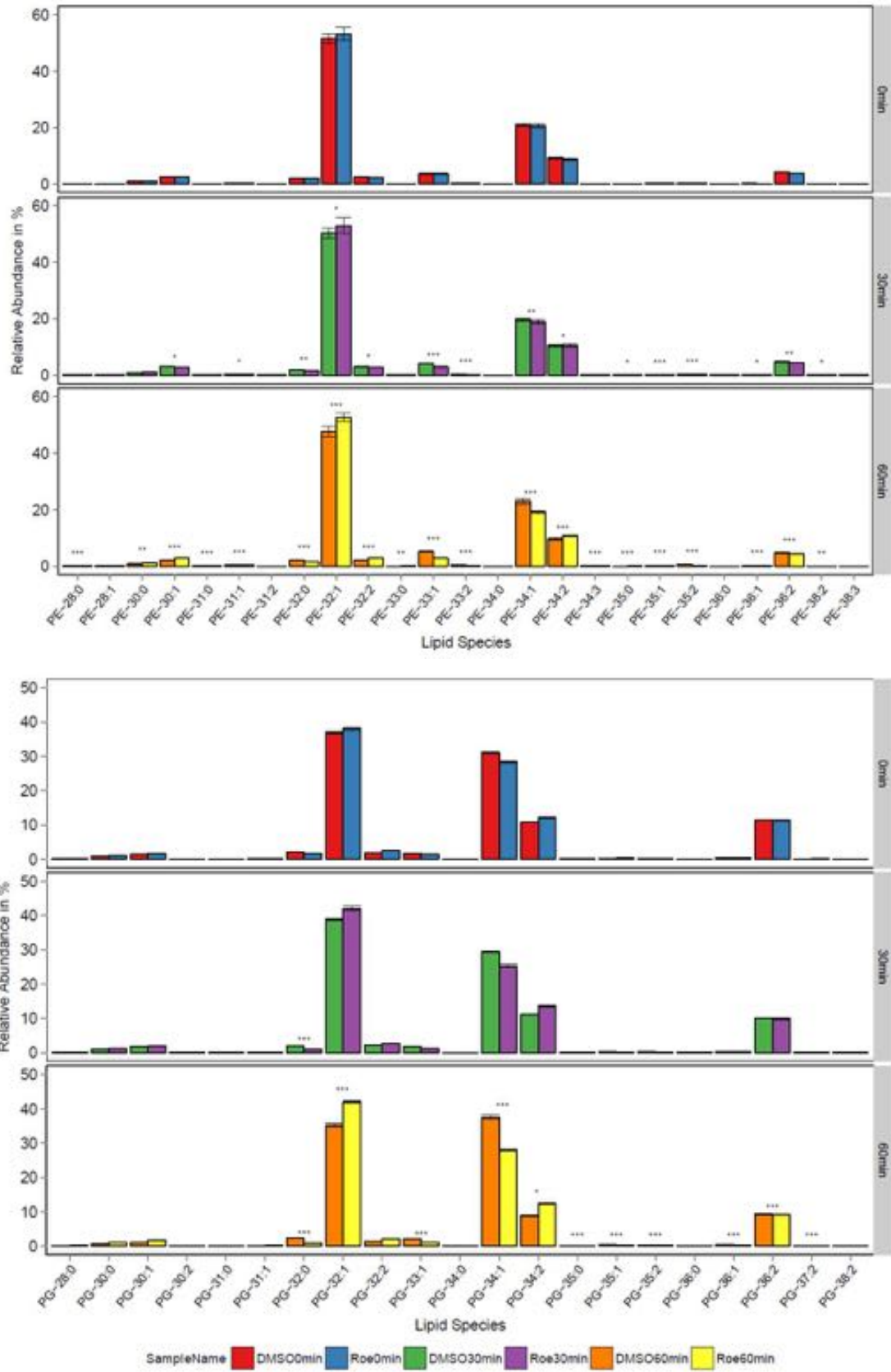
Ayrıca, kontaminant seviyeleri test edilmiştir. Örnek hazırlama sırasında kullanılan çoğunlukla plastik yüzeylerden gelen filtrelenebilir ve ekstrakte edilebilir kontaminantlar tespit edilmiştir. Bu kontaminantlar, yüksek konsantrasyonda olmasalar da iyonizasyon prosesi sırasında iyonlaşma verimini baskılayıcı şekilde etkileyebilirler. Kontaminant seviyesini ölçmek için, farklı ekstraksiyon prosedürleri ve materyaller (cam, plastik) test edilmiştir. Sonuçlar, plastik yüzey kullanımının cam yüzey kullanımına göre daha yüksek seviyede kontaminant oluşturduğunu göstermiştir. MTBE ekstraksiyonu, ABD ekstraksiyonuna göre 3-5 kat daha yüksek kontaminant seviyesi oluşturmaktadır.

E. coli örneklerinin nicel LC-MS analizinin önemli noktalarından biri kromatografik ayırmada alıkonma süresinin kararlılığıdır. LC çalışmaları, alıkonma zamanı farklılıklarının 0.02 - 0.05 dakika olduğunda, ayrılma sinyallerinin aynı olduğunu göstermiştir. Dionex'in LC system

Ultimate 3000 markası kullanıldığında, örneklerde yüksek alıkonma hızı kararlılığı gözlenmiştir. LC nin Q-exactive ve Hybrid Quadrupole Orbitap aletleri ile birlikte kullanılması, lipid sinyallerinin tanımlanmasında çok yüksek bir kesinlik sağlamıştır (ortalama kütle kesinliği, 1.0 ppm $\pm$ 0.5 ppm).

Bir hücrenin lipid profilindeki değişiklikler proteomda meydana gelen değişikliklere göre daha dinamik bir özellik gösterdiğinden, lipidom analizi için (-)-römerin ile muamele edilmiş *E. coli* hücrelerinde ilaç ilavesinin ardından 0., 30. ve 60. dakikalarda analiz için örnek alınmıştır. Üç tekrarlı olarak *E. coli* için yapılan analizlere ait örnek görüntü Şekil 7'de özetlenmiştir. Kontrol olarak yine sadece DMSO ile muamele edilmiş *E. coli* hücreleri kullanılmıştır.





Şekil 7. (-)-Römerin ile muamele edilen ve kontrol *E. coli* örneklerinin 0, 30 ve 60 dakika sonraki lipidlerinin analizleri

Fosfatidil-etanolamine (PE) ve fosfatidil-gliserol PG lipidlerinin molar yüzdeleri ve rölatif miktarlarını gösteren şekillerde (-)-römerin varlığının belirgin ölçüde lipid dağılımını değiştirdiğini göstermiştir.

Bakteriyel hücre büyümesi sırasında, hücre farklı bir büyüme fazına geçtiğinde lipid profilleri değişebilir. Bu değişimi test etmek için, büyüme eğrisinin farklı noktalarında hücredeki lipid profilleri analiz edilmiştir. Hücreler LB ortamında başka bir madde eklenmeden büyütülmüştür. PE ve PG türlerindeki bağıl miktar, PE-32:1 ve PG-32:1, hücre durağan faza geçtiğinde azalmıştır. İkinci en yüksek miktarda olan PE-34:1 ve PG-34:1 tam tersi davranış göstermiştir, CL türü için de aynı şey söylenebilir; bağıl miktar hücre durağan faza geçtiğinde CL-64:2 düşerken, CL-68:2 artmıştır. Bu durum, hücrenin durağan faza geçerken yüksek asil zincirli yağ asitlerini üretmeyi tercih ettiğini göstermektedir.

E. coli lipidomunda lipid türlerinin profilleri (-)-römerinin ile muamele edilmiş hücrelerde diğerlerine göre daha küçüktür. Bu durum, muamele edilmemiş hücrelerin hala büyümekte olmasından kaynaklanıyor olabilmektedir. (-)-Römerin ile muamele edilmiş hücrelerin PE türündeki lipidomun, muamele edilmemiş hücrelere göre farkı %1-3 tür. (-)-Römerin etkisine bağlı olarak, PE-32:1 az miktarda artmış ve PE-34:1 az miktarda azalmıştır. PG türünde, (-)-römerinle muamele edilmiş ve edilmemiş hücre arasındaki fark %7 ((-)-römerin eklenmesinden 30 dakika sonra) ve %10 ((-)-römerin eklenmesinden 60 dk sonra)dır. Genel olarak, %8-10 dan yüksek bir fark önemli bir değişim olarak kabul edilmektedir. PE türünde, PG-32:1 artmış ve PG-34:1 azalmıştır. Bu sonuçlar, (-)-römerin eklenen bakteri hücrelerinin uzun yağ asitleri tercih ettiğini göstermektedir. Muameleye bağlı olarak, 18 lipid sinyal faktörünün 2'den 6'ya çıktığı tespit edilmiştir.

Ayrıca, LB ortamına DMSO eklenmesi etkisinin lipid profillerine etkisi test edilmiştir. DMSO (-)-römerin için çözücü olarak kullanılmıştır. DMSO varlığında ve yokluğunda büyüyen hücrelerin lipid profillerinde bir değişim gözlenmemiştir.

Bu sonuçlar da protein sonuçlarında olduğu gibi (-)-römerin varlığında hücre membranında belirgin bir değişiklik olduğunu göstermiştir.

Zaman açısından değerlendirildiğinde, süre arttıkça kontrol ile (-)-römerin ile ilave edilmiş örneklerden elde edilen sonuçların arasındaki farkların arttığı görülse de, genel görüntü olarak büyük değişiklikler kaydedilmediğinden bundan sonraki çalışmalarda sadece 1 saat sonunda alınan örnekler değerlendirilmiştir.

4.1.4 (-)-Römerin Varlığında *E. coli*'de qPZR ile Analizler

İlk proteom ve lipidom analizlerinin eldesinden sonra hem ortamın ozmolaritesi ve hücre zarının bütünlüğü ile ilgili ortaya atılan hipotezleri test edebilmek hem de analiz sonuçlarını valide edebilmek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) için uygun primerler tasarlanmıştır. Gen seçimi için 4 temel analiz hedefi belirlenmiştir. Bu hedefler Tablo 5'te özetlenmiştir. Tasarlanan primerlerin dizileri de Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 5. qPZR ile analiz için *E. coli*'den seçilen ilk genler

Analiz hedefi	Gen isimleri
Ozmolarite ile ilintili genler	<i>envZ, ompR, ompF, ompC, otsA, otsB (tpp)</i>
Hücre zarı ile ilintili genler	<i>tolB, pal</i>
Proteom datası ile ilintili genler	<i>ompX, malE, tolB</i>
'Housekeeping' gen	<i>rrsG, rpsL</i>

Bu seçilen genler arasında EnvZ/OmpR ozmolarite regülatör sisteminin bir parçası olup bu ozmolarite regülatör sistemin hedef aldığı OmpF ve OmpC porin proteinleri de bulunmaktadır. Hücre dışı zarının bütünlüğünü ise TolB-PAL sistemi sağlamaktadır ve bu nedenle seçilmişlerdir. Seçilen genlerden üç tanesi, *ompX, malE* ve *tolB* ayrıca proteomik datasında bulunduklarından bu sonuçları valide etmek için kullanılmışlardır. *rrsG* ve *rpsL* genleri de 'housekeeping' gen olarak araştırılmak üzere seçilmiştir.

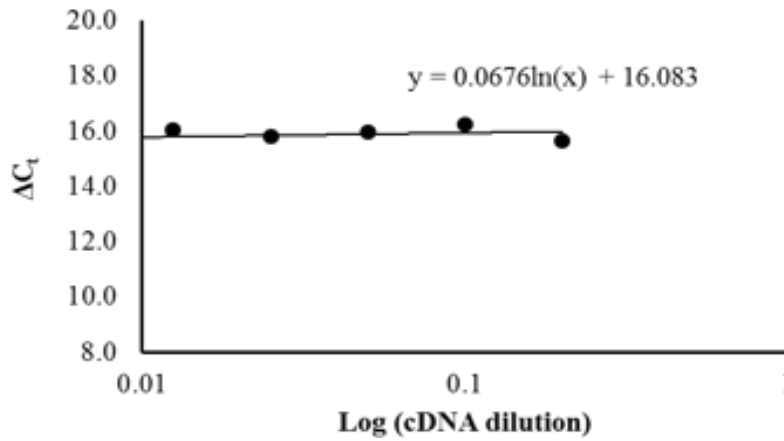
Seçilen genler ile erime eğrisi (melting curve) analizleri, her bir primer çifti ile genlerin tek bir gen ürün çoğalttığını ve primerlerin belirlenen bölgeye özel olduklarını göstermiştir. Ayrıca bu primerler kullanılarak genomik DNA ile PZR yapılmış ve elde edilen ürünler agaroz jel elektorforezi üzerinde tek bant verdiği elektroforetik analiz ile kontrol edilmiştir. Tek bant elde edilmemesi durumunda yapışma sıcaklıkları 1-2°C değiştirilmiştir.

qPZR analizi ile gen seviyelerindeki değişim hesaplamaları için öncelikle transkriptomda seviyesi sabit kalması gereken genin (housekeeping gene) seçimi için çalışmalar yapılmıştır. Bunun için literatür bilgilerine dayanılarak önce 30S ribozomal subünite proteini S12 kodlayan *rpsL* geninin ifade seviyesi kontrol ve (-)-römerin ile muamele edilen hücrelerde hesaplanmıştır. Deney sonuçları *rpsL* geninin (-)-römerine varlığından etkilendiğini ve ifadesinin çok düştüğünü göstermiştir. Bu nedenle aynı zamanda üzerindeki mütasyonlar ile

Streptomycin direncine neden olan *rpsL* geninin ifadesindeki büyük ölçüde azalma daha sonra araştırılmak üzere not edilmiştir.

'Housekeeping' gen olarak *rpsL* geni ile uygun sonuç alınamaması nedeniyle seçilen diğer 'housekeeping' gen adayı olan 16S rRNA'yı kodlayan *rrsG*'ye geçilmiştir. Bu *rrsG* geni ile yapılan qPZR sonuçları bu genin ifadesinin (-)-römerin varlığından etkilenmediğini göstermiştir. Bunun üzerine 'housekeeping' gen adayı olarak *rrsG* geni ile çalışmalara devam edilmesi uygun bulunmuştur. Bir sonraki aşamada Livak ve Schmittgen (2001)'nin geliştirdiği $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılabilmesi için önce verimlilik hesapları yapılmıştır. Örnek olarak *acrB* ve *rrsG* genleri için amplifikasyon verimlilikleri

Şekil 8'de özetlenmiştir.



Şekil 8. Livak ve Schmittgen (2001)'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodunun kullanılabilmesi için *acrB* ve *rrsG* genlerinin amplifikasyon verimliliklerinin grafiksel görüntüsü

Bu şekle göre grafiklerde elde edilen eğimlerin sıfır olmaları Livak ve Schmittgen (2001)'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodunun genlerdeki ifade değişikliğinin hesaplanabilmesi için uygun olduğunu göstermiştir.

Ardından (-)-römerin varlığındaki gen ifadeleri seçilen her bir gen için qPZR yöntemi ile hesaplanmış ve elde edilen veriler kullanılarak *rrsG* genine göre ifade değişiklikleri detaylı hesaplanmıştır. qPZR için kullanılan mRNA örnekleri, proteomik verilerin eldesinde olduğu gibi *E. coli* hücrelerinin (-)-römerin ile sadece 60 dakika muamelesinin ardından alınmıştır.

Genler için hesaplanan ifade değişim değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Eşik değeri olarak ≥ 1.8 alınmıştır.

Tablo 6. (-)-Römerin ile muamelenin ardından *E. coli* hücrelerinden ilk set genin transkriptom seviyelerindeki değişilerin qPZR yöntemi ile hesaplanmaları. Genlerin açıklamaları Pubmed Gen veri tabanından alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Gen	Gen tanımı	Değişim($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Regülasyon şekli
<i>ompX</i>	Outer Membrane Protein X	2,5	artmış
<i>ompF</i>	Outer Membrane Porin 1a	5,7	azalmış
<i>ompC</i>	Outer Membrane Porin Protein C	18,3	azalmış
<i>ompR</i>	Response regulator in two-component regulatory system with EnvZ	2,3	artmış
<i>envZ</i>	Sensory histidine kinase in two-component regulatory system with OmpR	1,0	değişmemiş
<i>tolB</i>	Periplasmic Protein	1,8	azalmış
<i>pal</i>	Peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	2,5	azalmış
<i>otsA</i>	Trehalose-6-phosphate synthase	N/A	hesaplanamadı
<i>otsB</i>	Trehalose-6-phosphate phosphatase	4,2	azalmış
<i>malE</i>	Maltose transporter subunit	> 100	hesaplanamadı
<i>rpsL</i>	30S ribosomal subunit protein S12	14,7	azalmış

qPZR analizleri sonucunda elde edilen bilgiler (-)-römerin varlığında *ompX* ve *ompR* ifadelerinin arttığını, *ompF*, *ompC*, *tolB*, *pal* ve *otsB* ifadelerinin azaldığını göstermiştir. Aynı koşullar altında *envZ* geninin ifadesi ise sabit kalmıştır. *malE* ve *otsA* genlerinin değişim seviyeleri ise, bu genlerin ifadelerinin (-)-römerin varlığında olmamış olmalarından dolayı hesaplanamamıştır.

Tablo 7’de proteomik ve qPCR analizlerinden elde edilen sonuçlar özetlenerek verilmiştir.

Tablo 7. *E. coli*'de Proteomik ve qPZR analizlerinin ortak sonuçları

Proteomik analiz			qPZR Analizi	
Protein	Regülasyon Şekli	Değişim	Regülasyon Şekli	Değişim
OmpX	arttı	2,09	arttı	2,50
MalE	azaldı	- 7,54	azaldı	Çok düşük, hesaplanamadı
TolB	arttı	2,67	azaldı	1,80

Proteomik ve qPZR analizlerinin karşılaştırmalı değerlendirmeleri OmpX ve MalE proteinleri için birbirlerini doğrular sonuçlar verirken TolB proteini için elde edilen sonuçlar proteomik analizde bu proteinin arttığını gösterirken qPCR analizi azaldığını göstermiştir. Bu şekilde birbirini doğrulamayan sonuçların literatürde de var olduğu görülmüştür. Bu durumda, özellikle de protein tanılaması esnasında çıkabilecek alternatif sonuçlar da önem taşımaktadır. TolB için tekrarlı yapılan qPZR deneylerinde farklı sonuç elde edilmemiştir.

Elde edilen bu ilk qPZR analizlerinin ardından daha mekanizmanın daha detaylı incelenmesi için yine proteom ve lipidom sonuçlarından yola çıkılarak analiz edilmek üzere 'housekeeping' gen dışında 4 grup halinde 12 adet gen daha seçilmiştir. Yeni seçilen genlerin dizileri Tablo 2'de verilmiş ve bu seçilme nedenleri kısaca Tablo 8'de özetlenmiştir.

Tablo 8. qPZR ile analiz için *E. coli*'den seçilen ikinci set gen

Analiz hedefi	Gen isimleri
Glikoz metabolizması ile ilintili genler	<i>ptsI, ptsH, crr, glk, treA</i>
Şeker taşınımı ile ilintili genler	<i>mgIB, malE*, lamB, phoE</i>
Çoklu ilaç pompaları ile ilintili genler	<i>tolC, tolB*, acrE, acrF, acrA, acrB, msbA, mdtA</i>
Protein sentezi ile ilintili genler	<i>rpsL*, tufA</i>

* Bir önceki dönemden çalışılan, kontrol amaçlı seçilen genler

(-)-Römerin varlığı genel olarak hücre içi karbonhidrat varlığını kısıtlamakta, proteom sonuçları da bunun nedeninin, hücre porinlerindeki azalma olduğunu işaret etmişti. Bu sonuçtan yola çıkarak öncelikle glikozun hücre içine nasıl girdiğini irdelemek istedik. Bu doğrultuda seçilen genlerle glikoz metabolizması ile ilintili olanları, hücre içine alınan glikoz moleküllerinin fosfotransferaz sistemi (PTS) ile mi yoksa difüzyon ile mi içeri girdiğini göstermesi planlanmıştır. PTS ile içeri giren glikoz molekülleri enzim I (EI) (*ptsI* tarafından

ifade edilir), histidin proteini (HPr) (*ptsH* tarafından ifade edilir) ve enzim II (EIIA) (*crr* tarafından ifade edilir) proteinlerine gereksinim duyarlar. Fosfoenolpirüvattan (PEP) EI'e geçen fosfat grubu önce HPr'ye, sonra EIIA'ya oradan da son olarak hücre içine giren şekere geçmektedir. EI ile HPr, fosfotransferaz sistemi ile hücre içine giren tüm şekerler için ortak iken, her şeker için özel EIIA bulunmaktadır. Glikoz için gereken EIIA, *crr* tarafından ifade edilmektedir. Diğer taraftan *glk* tarafından ifade edilen hegzokinaz enzimi, hücre içine difüzyon ile giren ya da hücre içinde serbest bulunan glikozu fosfatlayarak glikoz-6-fosfata dönüştürmektedir. Bu iki yoldan hangisi aktif ise, o yolak genlerin sentezlenmesi beklenmektedir.

Diğer taraftan şekerlerin içeri alınmasında rol oynayan *lamB* ve *phoE* tarafından ifade edilen porinler ile protein taşınımında görev alan ve şekerlere bağlanan iki periplazmik protein, maltoza bağlanan protein (*malE*) ve galaktoza bağlanan protein (*mgIB*), farklı şekerlerin *E. coli* tarafından kullanılıp kullanılmadıklarının anlaşılması için seçilmiştir.

Proteomik sonuçlar doğrultusunda seçilen bir üçüncü grup gen de çoklu ilaç pompalarını kapsamaktadır. Çoklu ilaç pompaları, hücre için yabancı ve zararlı görünen ilaçların hücre dışına pompalanarak etkilerinin azaltılmasına neden olmaktadır. Bu pompaların etkin olarak çalışmaması durumunda, verilen ilaç adayı etkinlik göstermektedir. Proteomik sonuçların TolB proteinindeki artışı göstermesi ile bu protein ile beraber çalışan TolA ve TolC proteinleri de dikkatimizi çekmiştir. Özellikle TolC proteini gram-negatif bakterilerde iç zarda yer alan birçok çoklu ilaç pompasının dış zar komponenti olarak işlev görmektedir. Bu nedenle TolC ile beraber, en yaygın olarak kullanıldığı bilinen çoklu ilaç pompalarının ifadelerine bakılmasına karar verilmiştir. Bu doğrultuda 4 farklı pompanın çeşitli parçaları (*acrE*, *acrF*, *acrA*, *acrB*, *msbA*, *mdtA*) inceleme amaçlı seçilmiştir.

Bir dördüncü grup olarak da daha önceki dönemde ifadesi değiştiği belirlenen *rpsL* geni ile beraber *tufA* geni seçilmiştir. Her iki genin birincil görevinin protein sentezi olduğu bilinmektedir. Ancak protein sentezinde yer alan, örneğin uzatma faktörlerinin, ikincil görevleri de olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *rpsL* geninin tetrasiklin direnci ile ilintili olması da direnç mekanizması ile ilintili bir durumun söz konusu olabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca *tufA* geninin proteom sonuçlarında yer alması, bu genin seçilip qPCR ile doğrulanması açısından önem taşımaktadır.

Seçilen bu genler ile yine erime eğrisi (melting curve) analizleri, her bir primer çifti ile genlerin tek bir gen ürün çoğalttığını ve primerlerin belirlenen bölgeye özel olduklarını göstermek için genomik DNA ile PZR yapılmıştır. Elektroforetik analiz ile tek bant elde edilmemesi durumunda yapışma sıcaklıkları 1-2°C değiştirilmiştir.

Ardından 'housekeeping' gen adayı olarak *rrsG* geni ile çalışmalara devam edilerek yine her bir gen için verimlilik hesapları yapılmıştır. Livak ve Schmittgen (2001)'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodunun genlerdeki ifade değişikliğinin hesaplanabilmesi için uygun olduğunu gösterdiği genler ile qPZR analizlerine geçilmiştir. *mdtA* ve *phoE* genleri ile yapılan farklı koşullardaki analizlerin hiçbirinde, bu primerlerin kullanılabilirliğini gösteren bir sonuç elde edilememiştir.

Tablo 9. (-)-Römerin ile muamelenin ardından *E. coli* hücrelerinden ikinci set genin transkriptom seviyelerindeki değişilerin qPZR yöntemi ile hesaplanmaları. Genlerin açıklamaları Pubmed Gen veri tabanından alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Gen	Gen tanımı	Değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Regülasyon şekli
<i>acrA</i>	Multidrug efflux pump	-	değişmemiş
<i>acrB</i>	Multidrug efflux pump	1,6	artmış
<i>acrE</i>	Multidrug efflux protein	-	bulunamadı*
<i>acrF</i>	Multidrug efflux protein	-	bulunamadı*
<i>tolC</i>	Outer-membrane protein	1,9	artmış
<i>crr</i>	Enzyme IIA ^{GLC}	3,4	artmış
<i>ptsH</i>	Phosphocarrier protein HPr	3,5	artmış
<i>glk</i>	Glucokinase	-	değişmemiş
<i>lamB</i>	Maltose outer-membrane porin	> 100	hesaplanamadı
<i>malE</i>	Maltose transporter subunit	> 100	hesaplanamadı
<i>mgIB</i>	Galactose binding periplasmic protein	-	değişmemiş
<i>msbA</i>	Lipit export permease protein	-	bulunamadı*

* Her iki koşulda da ifadesi olmamıştır.

İlk olarak glikozun içeri nasıl alındığı ve parçalanmaya başlandığı ile ilgili genler olan *crr*, *ptsH* ve *ptsI* ile *glk* genlerinin analizleri yapılmıştır.

Glikoz metabolizması ile ilgili sonuçlar genel olarak *ptsH* ve *crr* genleri tarafından kodlanan enzimlerin hem (-)-römerin ile muamele edilmiş hem de kontrol örneklerinde ortamda bulunduğunu ancak (-)-römerin varlığında ifadenin biraz daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durum glikoz alınımı için PTS sisteminin her iki durumda da aktif olduğunu ancak (-)-römerin stresinin sistemi biraz daha aktivelediğini işaret etmiştir. Diğer taraftan *glk* geni ile

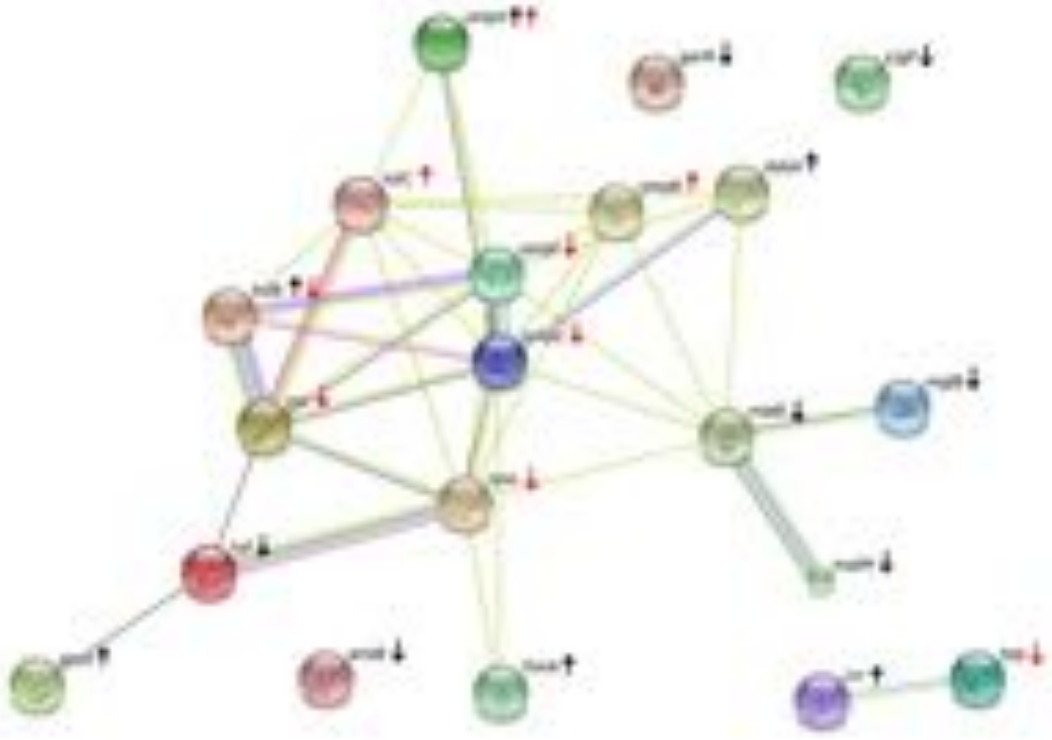
yapılan deneyler bu gen tarafından ifade edilen hekzokinaz enziminin ise kontrol koşullarında PTS enzimlerine oranla daha az olsa da ortamda bulunduğunu göstermiştir.

E. coli hücrelerinin (-)-römerin stresini azaltmak için, bu molekülü hücre dışına attığı ile ilgili hipotez ise beklediğimiz kadar etkin çıkmamıştır. TolB proteinin arttığının bulunması ile bu protein ile çalıştığı için seçilen *tolC* geni ve bu protein sistemi ile ilaç atımında beraber çalışan çoklu atım pompa proteinleri incelendiğinde sadece *tolC* ve *acrB*'de az da olsa artış hesaplanmıştır. *acrB* ile beraber çalışan *acrA*'da ise bir değişiklik ölçülmemesi bu pompanın işlevselliği konusunda soru işaretleri uyandırmıştır. Sonuç olarak *E. coli* hücrelerinin (-)-römerini dışarı pompalayamadığı ve bu yüzden de öldükleri düşünülebilir. TolC ile çalışan başka sistemler olabileceği gibi bunların da yeteri kadar etkin olamadıkları açıktır.

4.1.5 (-)-Römerin'nin *E. coli*'ye Etkisinin Analizi

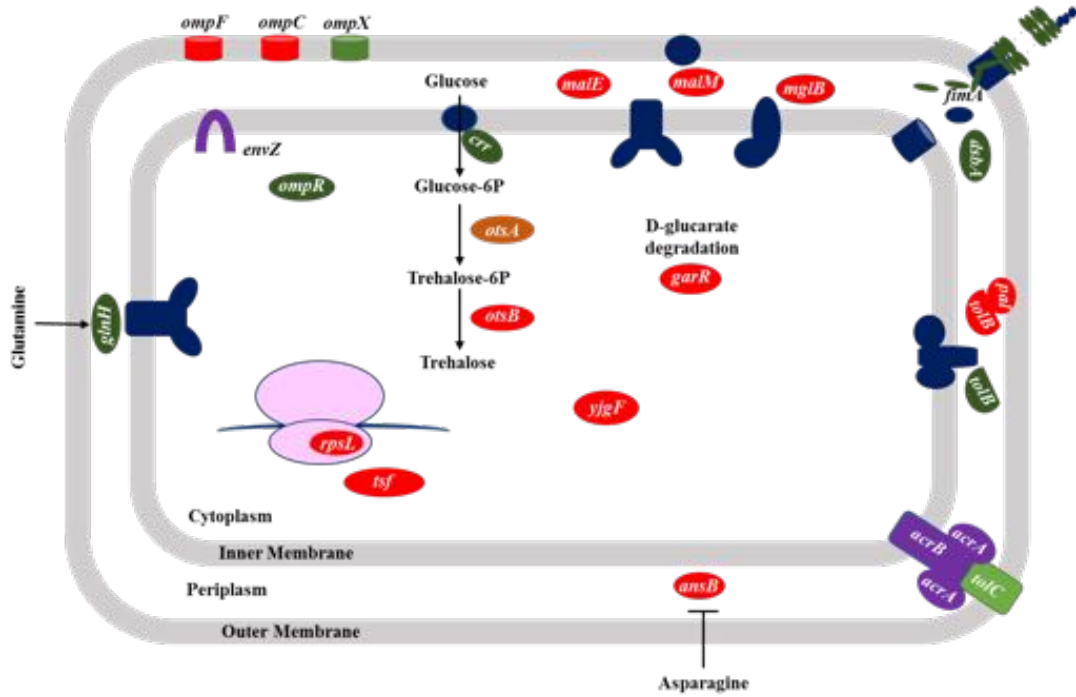
Proteomik sonuçlara göre miktarlarında değişiklik olan proteinler ile qPZR sonuçlarına göre ifadeleri değişen genlerin lipidom bilgilerini de kullanarak toplam 20 hedef seçilmiştir. Bu hedefler, STRING 9.1 veritabanı kullanılarak analiz edilmiş ve bir etkileşim ağı oluşturulmuştur. Bunun için yazılımın aktif tahmin yöntemleri kullanılmıştır. Oluşturulan etkileşim ağı Şekil 9'de verilmiştir.

Oluşturulan fonksiyonel etkileşim ağı, 17 tane hedefin etkileşimde olduğunu göstermiştir. Örneğin, maltoz ve galatoz taşınım sistemlerinin birer parçası olan ve *malE*, *malM* ve *mgIB* genleri tarafından kodlanan proteinlerin birbirleri ile etkileşim halinde olduğu görülmüştür. Bu proteinlerden MalE'nin aynı zamanda hücre zarı porin proteinleri olan OmpF ve OmpC ile de etkileşim halinde olduğu bulunmuştur. Yine aynı etkileşim ağı üzerinde, tahmin edildiği gibi *rpsL* geninin ürününün protein biyosentezinde yer alan EF-Ts proteini ile etkileştiği görülmüştür. Hücre çeperinde yer alan Tol yapısının bir parçası olan TolB proteinin ile peptidoglikan ile ilintili dış zar lipoproteini PAL'ın da etkileştiği ayrıca bulunmuştur.



Şekil 9. (-)-Römerin ile muamele edilen *E. coli* hücrelerinin proteomik ve qPCR analizlerinde elde edilen verilerinin entegre analizi. Hedefler arasındaki farklı renkler STRING 9.1 veritabanının analiz için kullandığı farklı yöntemleri ifade etmektedir. Siyah oklar proteomik analizlerden elde edilen sonuçları, kırmızı oklar ise qPCR analizi ile elde edilen sonuçları göstermektedir

Şekil 10'da da *E. coli* hücreleri için elde edilen tüm sonuçlar hücre üzerinde gösterilmiştir.

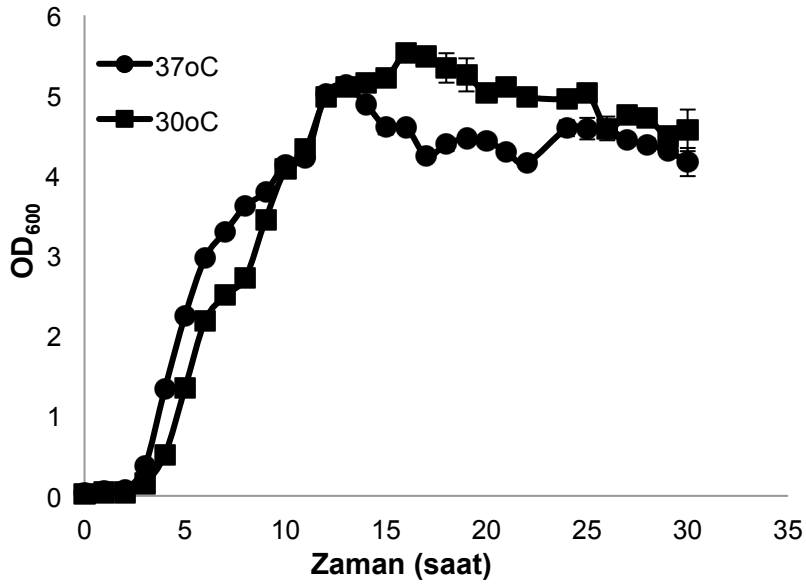


Şekil 10. 1 saat (-)-römerin ile muamelenin ardından *E. coli* TB1 hücrelerinde farklılaşan tüm protein ve genlerin şekilsel görüntüsü. Kırmızı rengi azalmayı, yeşil rengi artışı, mor ise değişim olmadığını göstermektedir. Laciverte etkilenen sistemlere ait diğer bölümleri göstermektedir

4.2 Aporfin Alkaloidlerin *B. subtilis* Üzerindeki Etkileri

4.2.1 *B. subtilis* için Büyüme Koşullarının Belirlenmesi

B. subtilis hücreleri ile daha önce çalışılmadığı için öncelikle hangi büyüme sıcaklığında proje kapsamındaki çalışmaların yapılmasına karar verilmesi için ön deneyler yapılmıştır. Bu doğrultuda, nütrient besiyerindeki büyümeler 30 ve 37°C'de spektrofotometrik olarak OD₆₀₀ takip edilerek izlenmiştir. Elde edilen büyüme grafikleri Şekil 11'de özetlenmiştir. Her iki sıcaklıkta da hücrelerin büyüdüğü ancak düşük sıcaklıkta büyümenin biraz daha yavaş olduğu gözlenmiştir. 37°C'de büyümenin biraz daha hızlı olması nedeniyle, bundan sonraki çalışmaların bu sıcaklıkta yapılmasına karar verilmiştir.

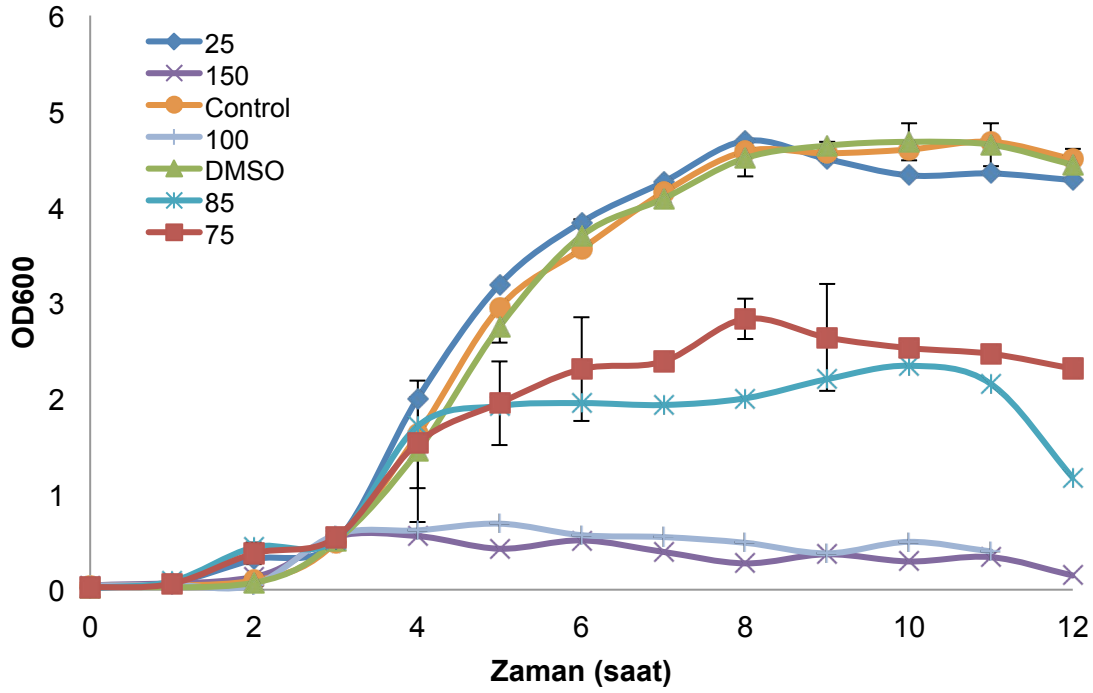


Şekil 11. *B. subtilis* hücrelerinin iki farklı sıcaklıkta zamana karşı OD₆₀₀ değerleri

4.2.2 Aporfin Alkaloidlerin *B. subtilis* Büyümesine Etkileri

Büyüme koşullarına karar verildikten sonra önce 3 aporfin alkaloidin, (-)-römerin, boldin ve bulbokapninin varlığında büyüme analizleri yapılmıştır. *E. coli*'de (-)-römerin ile elde edilen sonuçtan yola çıkılarak önce 25 ile 150 µg/mL aralığında değişen 5 farklı römerine konsantrasyonu ile muamele edilen *B. subtilis* hücreleri ile büyüme analizleri yapılmış ve elde edilen eğrileri Şekil 12'de verilmiştir.

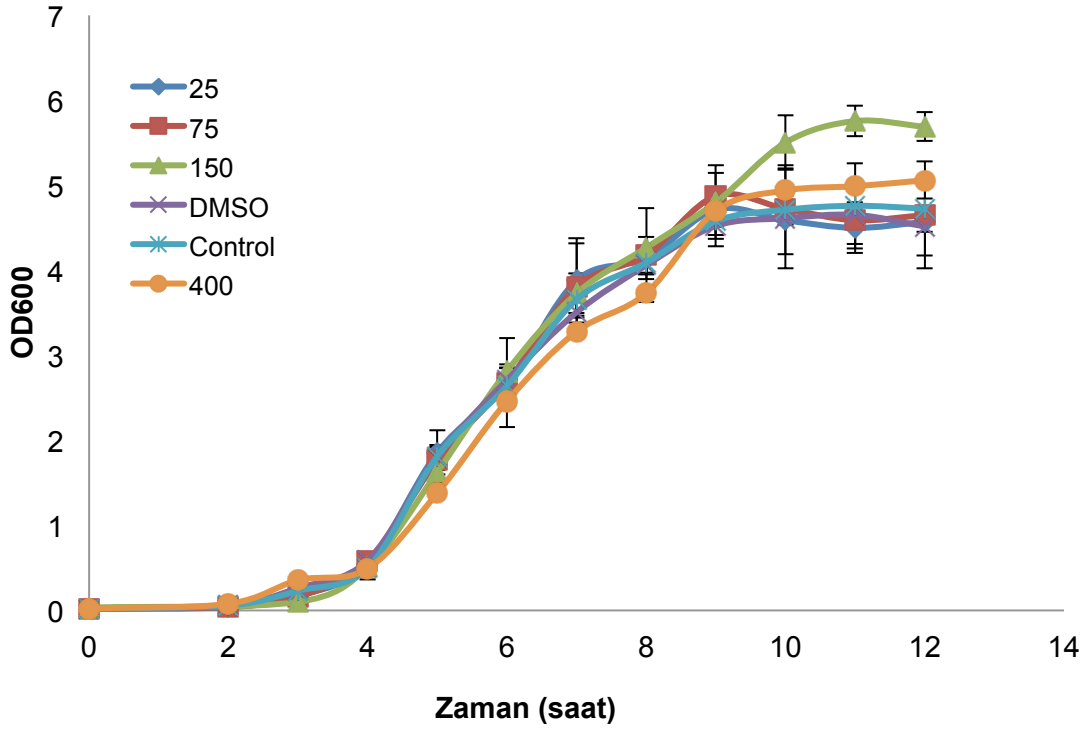
Şekil 12'de elde edilen sonuçlara göre, *B. subtilis* hücreleri incelendiğinde OD₆₀₀ değeri 0.5'e ulaştığında sadece DMSO ilavesi yapılan kültür ile hiçbir ilave yapılmayan *B. subtilis* kültürlerindeki büyümeler çok benzerdir. 25 µg/mL (-)-römerin ile muamelenin ardından *B. subtilis* hücrelerinin büyümesinde çok büyük bir değişiklik olmamıştır. (-)-Römerin konsantrasyonu 75 µg/mL'e çıkarıldığında ise, ilaç ile muamelenin ardından 1 saat sonra hücreler durağan faza girmişlerdir. 75 ile 85 µg/mL (-)-römerin muamelesi arasında çok az bir fark gözlemlenmiştir. Ancak (-)-römerin konsantrasyonu 100 µg/mL ve üzerine çıkarıldığında *B. subtilis* hücrelerinin hemen durağan hatta belki de ölüm fazına geçmişlerdir.



Şekil 12. Farklı konsantrasyonlardaki (-)-römerin ($\mu\text{g/ml}$) varlığında *B. subtilis* büyümesi

Literatürde boldinin antimikrobiyel özelliğine dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır (Ortega-Ramirez vd., 2014). Boldinin *B. subtilis* üzerinde hemen hemen hiç etkisinin olmadığı hipotezi ile yola çıkarak, (-)-römerin için kullanılan konsantrasyonların daha üzerinde değerler ile *B. subtilis*'te boldinin etkisi araştırılmıştır. Bunun için iki tanesi (-)-römerinde kullanılan ile aynı olmak üzere dört farklı boldin konsantrasyonunu ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $75 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $400 \mu\text{g mL}^{-1}$) ile muamelenin ardından büyüme grafikleri çıkarılmıştır.

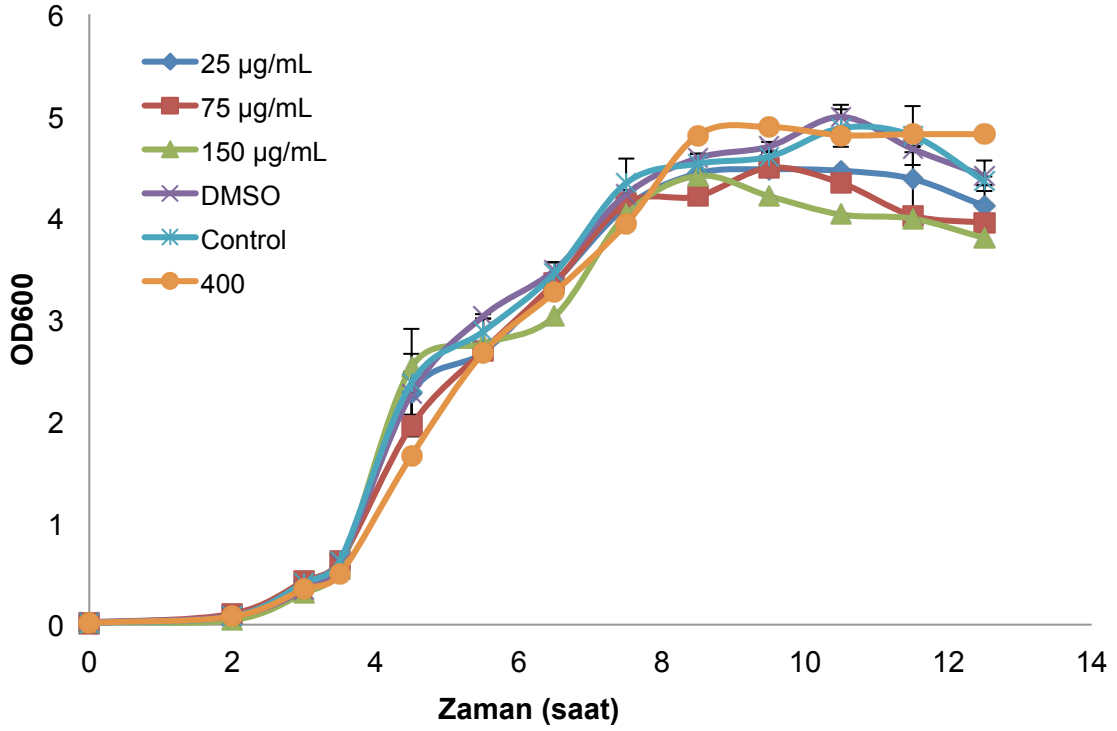
Şekil 13'te görüldüğü gibi boldinin yüksek konsantrasyonunun bile *B. subtilis* büyümesi üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Bunun iki nedeni olabilir: 1) Boldin dışarı akış pompalarıyla hücre dışına atılabilir ya da 2) Boldin daha önce Ortega-Ramirez vd. tarafından rapor edildiği gibi antimikrobiyel etkiye sahip değildir (Ortega-Ramirez vd., 2014).



Şekil 13. Farklı konsantrasyonlardaki boldin ($\mu\text{g/ml}$) varlığında *B. subtilis* büyümesi

Son olarak dört farklı bulbokapnin konsantrasyonunun ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $75 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $400 \mu\text{g mL}^{-1}$) *B. subtilis* büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Orhan vd. (2007) yaptıkları çalışmada bulbokapnin *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı inhibe edici etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca bulbokapnin $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ minimum inhibitör konsantrasyonunda (MİK) *B. subtilis* büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır (Orhan vd., 2007). Bu bilgilerden yola çıkılarak bulbokapnin için boldin için kullanılan ile aynı dört konsantrasyon seçilmiştir. Şekil 14'te görüldüğü gibi seçilen bulbokapnin konsantrasyonlarında *B. subtilis* büyümesinde hiç bir etki gözlemlenmemiştir.

Boldin ve bulbokapnin için çözünürlük sorunlarından dolayı daha yüksek konsantrasyonlara çıkılamamıştır. Daha yüksek konsantrasyon daha fazla çözücü, DMSO, gerektirmektedir ancak daha fazla DMSO'nun da hücre büyümesine toksik olduğu bilinmektedir.



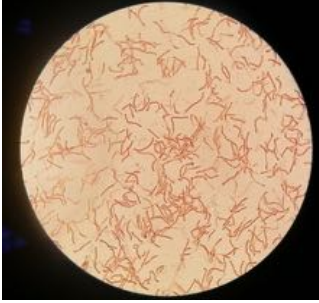
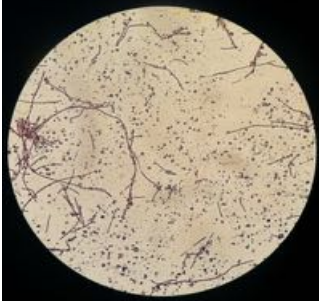
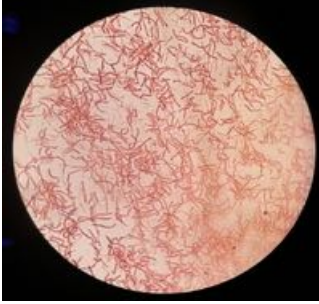
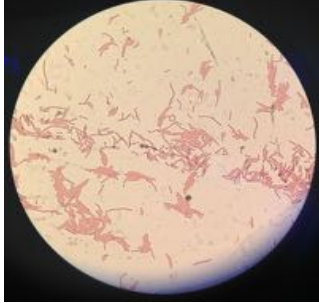
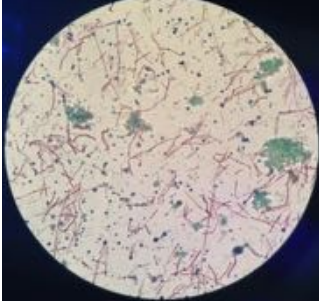
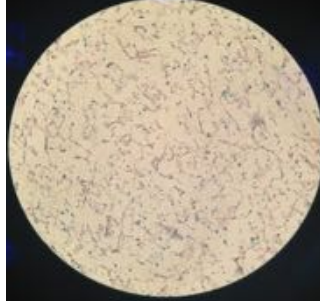
Şekil 14. Farklı konsantrasyonlardaki bulbokapnin ($\mu\text{g/ml}$) varlığında *B. subtilis* büyümesi

Üç aporfin alkaloid ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda proje kapsamında incelenmek üzere (-)-römerinin etkisine bağlı olarak konsantrasyon belirlenmesine karar verilmiştir.

4.2.3 (-)-Römerin Varlığında *B. subtilis* Hücrelerinde Spor Oluşumu

B. subtilis stres koşulları altında endospor oluşturan bir bakteridir (Schaeffer ve Fulton, 1933). (-)-Römerinin büyüme ortamına eklenmesiyle hücrelerin endospor oluşturmuş olabileceğinden endişe duyularak endospor oluşumunu incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (-)-römerin içeren ortamlardan farklı zamanlarda alınan örneklerle endospor boyama yöntemi uygulanmıştır.

B. subtilis hücreleri $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve üzerindeki (-)-römerin ile muamele edildiklerinde büyümede ciddi bir yavaşlama gözlemlendiğinden (Şekil 12), *B. subtilis* hücrelerindeki endospor oluşumu 75 , 85 ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (-)-römerin ile muamelenin ardından incelenmiştir. Örneklerin endospor boyamalarının ardından götüntüleri ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Roemerine Konsan-trasyonu	1 saat	4 saat	8 saat
75 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
85 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$			

Şekil 15. Farklı (-)-römerin konsantrasyonları ile muamelenin 1, 4 ve 8 saat ardından *B. subtilis* hücrelerinde endospor oluşumu

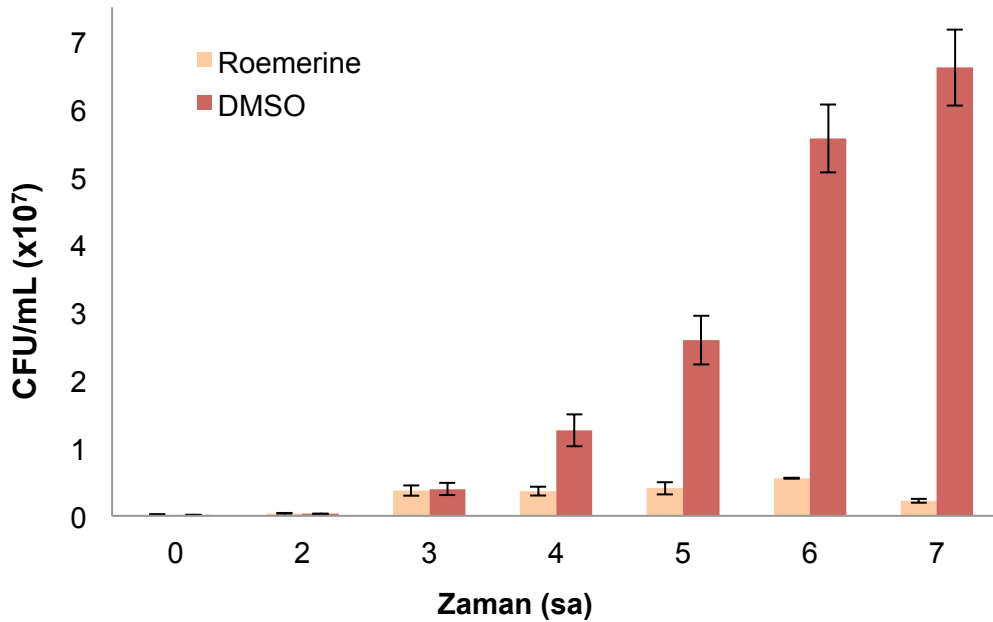
Şekil 15'te görüldüğü gibi bakteriler (-)-römerine maruz bırakıldıklarında endospor oluşturmaktadırlar. Endospor sayısı artan (-)-römerin konsantrasyonu ve maruz kalma süresi ile artmaktadır. Özellikle ölüme neden olan 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ üzerindeki (-)-römerin varlığında, (-)-römerin ilavesini takiben 4 saat sonra hemen hemen tüm hücrelerin spor oluşturduğu

görülmüştür. Diğer taraftan (-)-römerin konsantrasyonu azaldıkça, maruz kalma süresi artsa da spor oluşturan hücre sayısı düşmüştür.

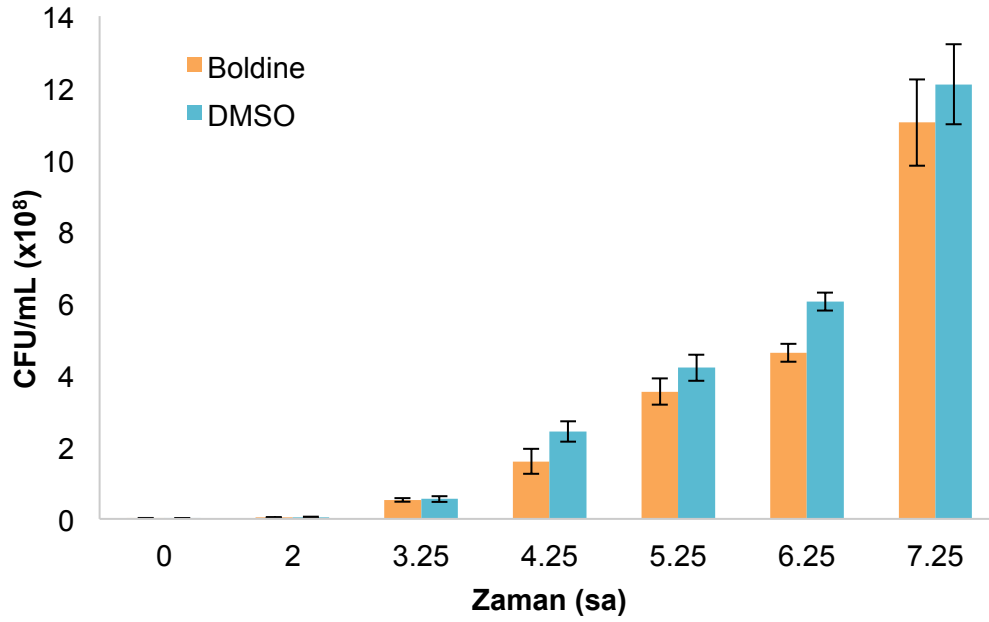
Bakteriyel büyüme ve endospor boyamadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda (-)-römerin çalışma konsantrasyonu olarak $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'nin uygun olduğu düşünülmüş ancak deneylere devam etmeden önce bu konsantrasyonda yeteri kadar protein ve RNA elde edebilmek için canlı hücre olduğunun da teyit edilmesi gerektiğine karar verilmiştir.

4.2.4 (-)-Römerin Çalışma Konsantrasyonunda Canlı Hücre Sayımı

Çalışılmasına karar verilen $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (-)-römerin valığında canlı hücre sayımı yapılarak elde edilen sonuçlar Şekil 16'da özetlenmiştir. Karşılaştırma amaçlı $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ boldin ile muamele edilen hücreler de incelenmiştir. OD_{600} değeri 0,5-0,65 aralığına geldiğinde *B. subtilis* hücreleri DMSO, (-)-römerin ve boldin ile muamele edilmişlerdir. Her üç kültürdeki DMSO miktarı eşit ayarlanmıştır. Muamelenin ardından her saat başı örnek alınarak seri olarak seyreltme ile örnekler nütrient besi yeri içeren petrilere yayılmıştır. 37°C 'de inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayılmış ve elde edilen değerler Şekil 16 ve Şekil 17'te özetlenmiştir.



Şekil 16. DMSO ve $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ roemerine ile muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinin canlı hücre sayımları



Şekil 17. DMSO ve 75 µg mL⁻¹ boldine ile muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinin canlı hücre sayımları.

Şekil 16'da özetlenen sonuçlar 75 µg mL⁻¹ (-)-römerin ile muamelenin ardından canlı *B. subtilis* hücrelerinin sayısında bir artış olmadığını göstermiştir. Diğer taraftan *B. subtilis* hücreleri DMSO ile muamele edildiklerinde *B. subtilis* hücreleri normal büyümelerine devam etmişlerdir. Şekil 17'deki sonuçlar DMSO gibi boldin varlığında da hücrelerin hemen hemen hiç etkilenmediğini göstermiştir.

4.2.5 Alkaloidler Varlığında *B. subtilis* Proteomu

B. subtilis'in alkaloidler varlığında tüm büyüme analizleri doğrultuda 75 µg/µl (-)-römerin, boldine ve bulbokapnin alkaloidleri varlığında *B. subtilis* hücrelerinden proteinler izole edilmiştir. Kontrol olarak DMSO ile muamele edilmiş hücreler kullanılmıştır. Protein izolasyonu için optimize edilmiş tampon kullanılmıştır.

B. subtilis 168 hücreleri gram (+) oldukları için *E. coli* için geliştirilen protein ekstraksiyon protokolü yeterli olmamış ve yeni bir metoda gereksinim ortaya çıkmıştır. Bu doğrultuda farklı parçalama tamponları ve yöntemleri araştırılmıştır. Farklı metotlar ile tekrarlı olarak yapılan protein ekstraksiyonlarını takiben iki boyutlu jel analizlerinde sürekli jellerde yatay

izgilenmeler ıkmıştır. Protein rneklerinin kirli olmasından, özellikle ekstraksiyon esnasında gelebilecek tuzlardan kaynaklandığı düşünülerek, örneklerin temizlemek için önce BIORAD ReadyPrep 2-D Clean-up Kit sonra ZEBA (7K MWCO, ThermoScientific) kolonları kullanılmıştır. Ne yazık ki her iki kit ile de jellerdeki yatay izgilenmelerden kurtulunamamıştır. ZEBA kolanları ile temizlendikten sonra 2 boyutlu jelde analiz edilen protein örneklerinde tek tek spotlar görünmüş olsa da çizgilenme mevcudiyetini sürdürmüştür. Bu duruma ek olarak sıkıntı yaratan bir durum da temizlemeyi takiben protein konsantrasyonunun çok düşmesi ve bu nedenle mevcut spotların bile görüntülenmesinde sıkıntı olmuştur.

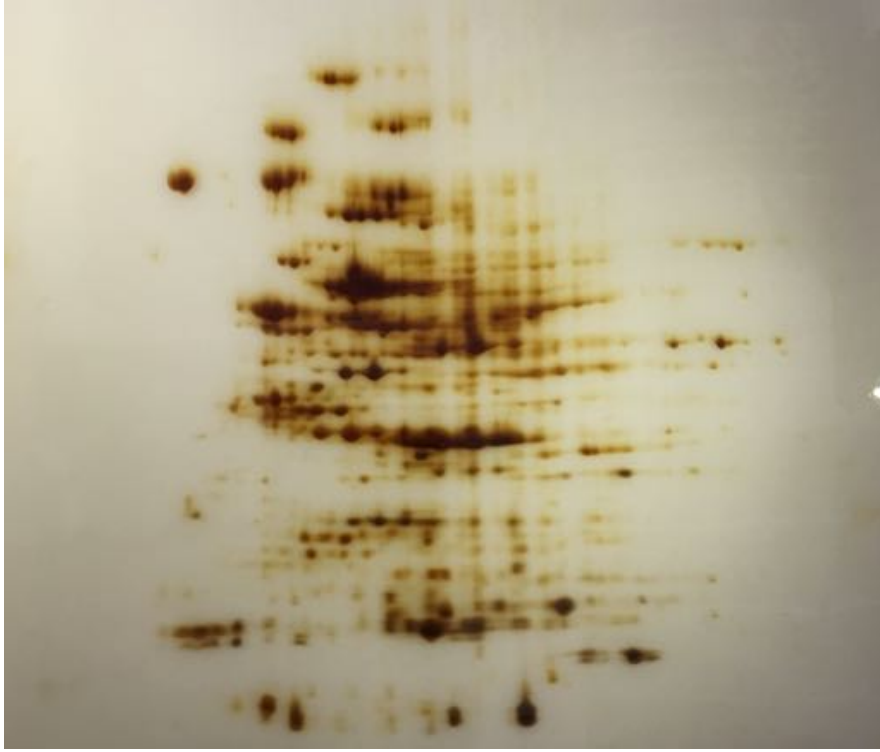
Düşük protein konsantrasyonları olan örneklerde çizgilenmenin belirli ölçüde az olduğu fark edilmiştir. Ancak düşük protein konsantrasyonlarında gümüş boyama ile jellerde görüntü elde edilebilse de ktle spektrometrisi ile yapılan tanılama analizleri (CBB)-G250 ile boyamayı gerektirmektedir ve bu boya da örneklerde çok daha yüksek protein konsantrasyonu gerektirmektedir. Bu durum yine yatay çizgilenme açısında ciddi sorun oluşturmaktadır.

Literatürde yayınlanan çeşitli çalışmalarda, özellikle *Bacillus* türlerinden ekstrakte edilen protein karışımındaki proteazların varlığının proteinlerin degrade olmasına ve bu protein parçalarının da yatay izgilenmeye neden olabileceği rapor edilmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak ekstrakte edilen protein karışımına phenylmethysulfonyl floride (PMSF) ilave edilerek serin proteazların inaktive edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra BioRad temizleme kiti ile tuzlarından ayrılan örnek pH 4-7'lik şeride yüklenmiş ancak 2. boyut jellerde yine yatay çizgilenme gözlemlenmiştir. Protein rnekleri PMSF ile muamele edildikten ve ardından temizleme kiti ile tuzlarından arındırılınca, küçük molekül ağırlıklı proteinler jel üzerinde kısmen gözükse de yatay izgilenmelerde çok da fark edilir bir azalma olmamıştır.

Literatür bilgileri tekrar tarandığında nükleik asit kirliliğinin de yatay izgilenmeye neden olabileceği grlmştr. Ayrıca alkaloitleri çözmek için kullanılan zc DMSO'nun hücre içi RNA sentezini arttırdığı ve ayrıca karmaşık DNA yapısını değiştirerek transkripsiyonu arttırdığı rapor edilmiştir (Stratling, 1976; Juang ve Liu, 1987). Bu bilgiler doğrultusunda nükleik asit kontaminasyonunun yatay izgilenmeye neden olabileceğini düşünülmüş ve protein ekstrelerini proteaz inhibitörü karışımı ile muamelenin hemen ardından nükleaz karışımı ile muamele edilmiştir. Hem proteaz inhibitörü karışımı hem de nükleaz karışımı ile muamele edilen protein ekstrelerinin 2-D jellerdeki analizinde çok belirgin ölçüde protein spotları özellikle orta ve küçük molekül ağırlıklı proteinlerin bölgesinde gözlemlenmeye başlamıştır. Ancak yüksek molekül ağırlık bölgesinde yatay çizgilenmeler devam etmiştir.

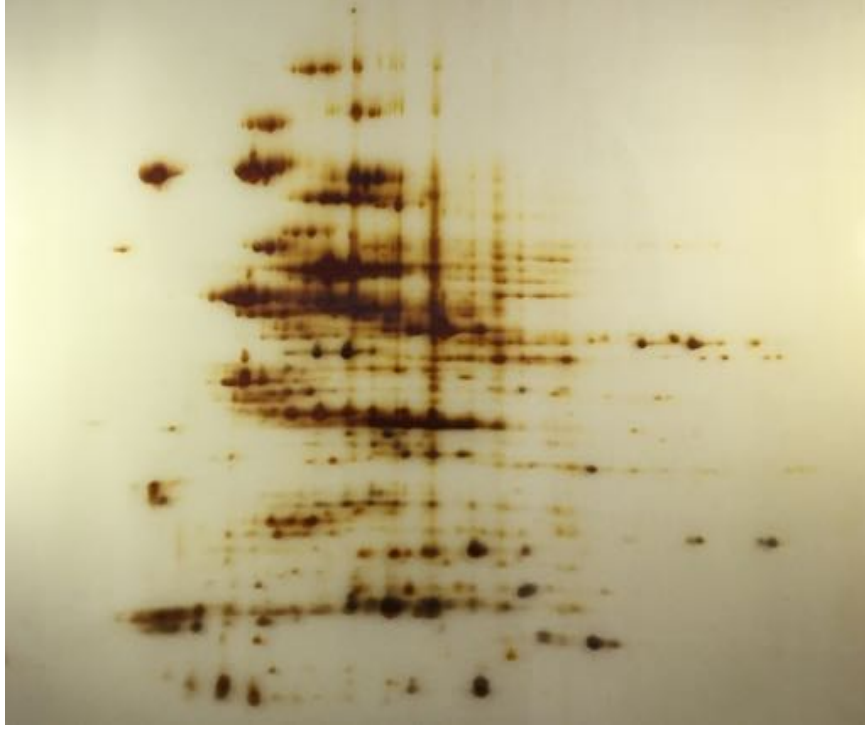
Bu izgilenmelere örneklerin tuzlardan arınmamasının neden olabileceği düşünülerek hem proteaz inhibitörü karışımı hem de nükleaz karışımı ile muamelenin ardından protein ekstreleri BioRad temizleme kiti ile tuzlarından ayrılmış ve örnek pH 4-7'lik şeride yüklenmiş.

Elde edilen protein haritası Şekil 18'de verilmiştir.



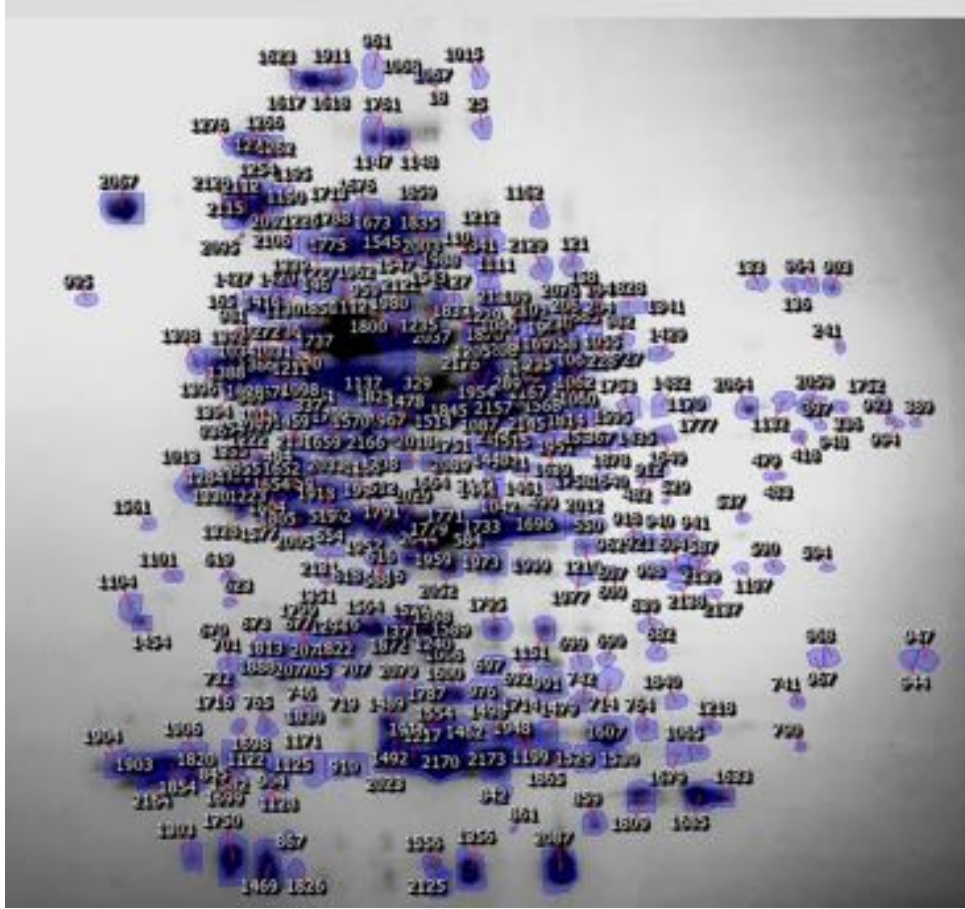
Şekil 18. DMSO ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinden ekstrakte edilmiş proteinlerin gümüş boyaması sonrası elde edilen 2-boyutlu jel görüntüleri. 100 mL besi yerinden büyütülen hücrelerin 500 µL tamponda parçalandıktan sonra elde edilen protein örnekleri hem proteaz inhibitörü karışımı ile hem de nükleaz karışımı ile muamele edilmiş ve daha sonra BIORAD temizleme kiti ile temizlenmiştir (1. Boyutta ayırım için kullanılan şeridin pH aralığı 4-7). Yüklenen toplam protein miktarı: 200 µg.

Şekil 18'de görülen 2-D jel görüntüleri proteaz inhibitörü karışımı ve nükleaz karışımı ile muameleyi takiben Biorad temizleme kiti tuzlarından arındırılan örneklerin proteinlerinin yatay çizgilenme olmaksızın ayrılabilirdiğini göstermiştir. Bunun üzerine hemen (-)-römerin ile muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinden ekstrakte edilmiş proteinlerin gümüş boyaması da aynı protokol izlenerek yapılmıştır. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 19'da verilmiştir.

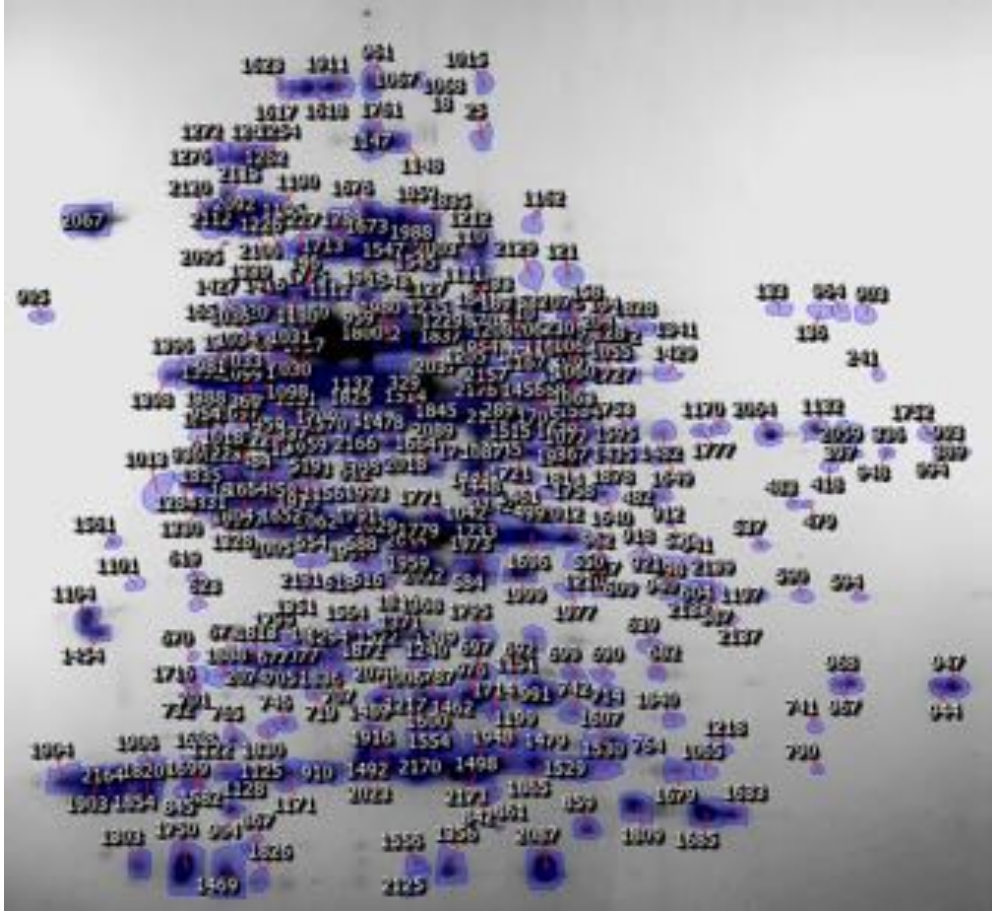


Şekil 19. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinden ekstrakte edilmiş proteinlerin gümüş boyaması sonrası elde edilen 2-boyutlu jel görüntüleri. 100 mL besi yerinden büyütülen hücrelerin 500 µL tamponda parçalandıktan sonra elde edilen protein örnekleri hem proteaz inhibitörü karışımı ile hem de nükleaz karışımı ile muamele edilmiş ve daha sonra Biorad temizleme kiti ile temizlenmiştir (1. Boyutta ayırım için kullanılan şeridin pH aralığı 4-7). Yüklenen toplam protein miktarı: 200 µg.

(-)-Römerin ve DMSO ile muamele edilen örneklerin proteinlerinin 2-D haritaları başarı ile elde edildikten sonra bu görüntülerin karşılaştırılmalı analizinin yapılma aşamasına gelinmiştir. Bu amaç ile önce TotalLab'ın Samespots yazılımının deneme sürümü kullanılarak elde edilen bu iki harita protein spot farklılıkları açısından karşılaştırılmıştır. Farklı spotları gözlemlendiği analizli protein haritaları Şekil 20 ve Şekil 21'de verilmiştir. Her bir spot için ekspresyon farklılığı ayrıntılı olarak Ek1'de verilmiştir.



Şekil 20. DMSO ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinden elde edilen protein haritalarının Samespots yazılımı ile analiz sonucu elde edilen spotlar



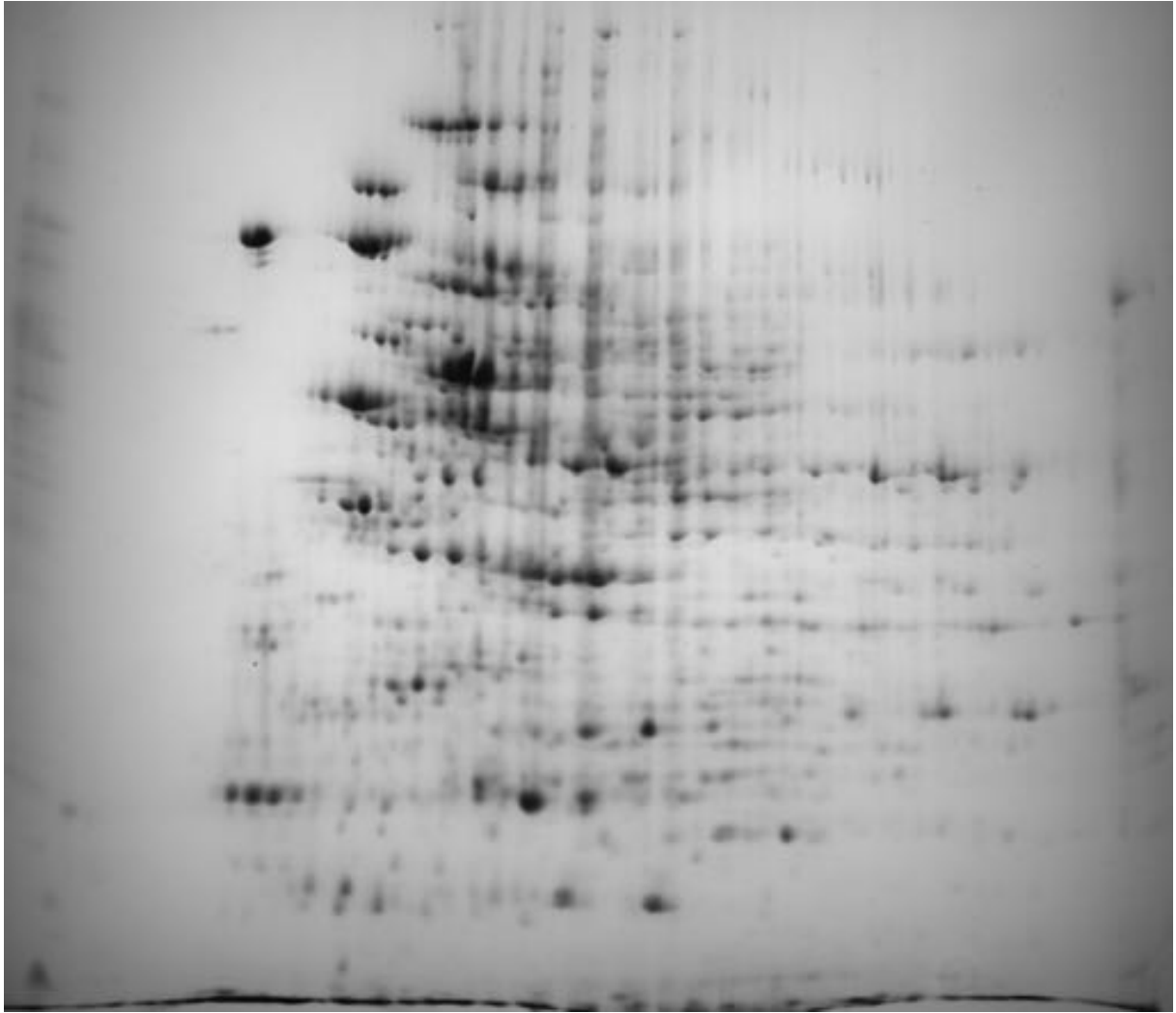
Şekil 21. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinden elde edilen protein haritalarının Samespots yazılımı ile analiz sonucu elde edilen spotlar

Optimize edilen protokol ile gümüş ile boyanmış jellerde farklılaşan protein spotlarının net olarak belirlenebilmesinin ardından, seçilen üç farklı aporfin alkaloidin 75 µg/mL konsantrasyonu ile 1 saat muamele edilen *B. subtilis* hücrelerinden proteinler izole edilmiş ve iki boyutlu jellerde ayırmanın ardından protein örnekleri kesim için CBB G-250 ile boyanmışlardır (Şekil 22, Şekil 24, Şekil 26).

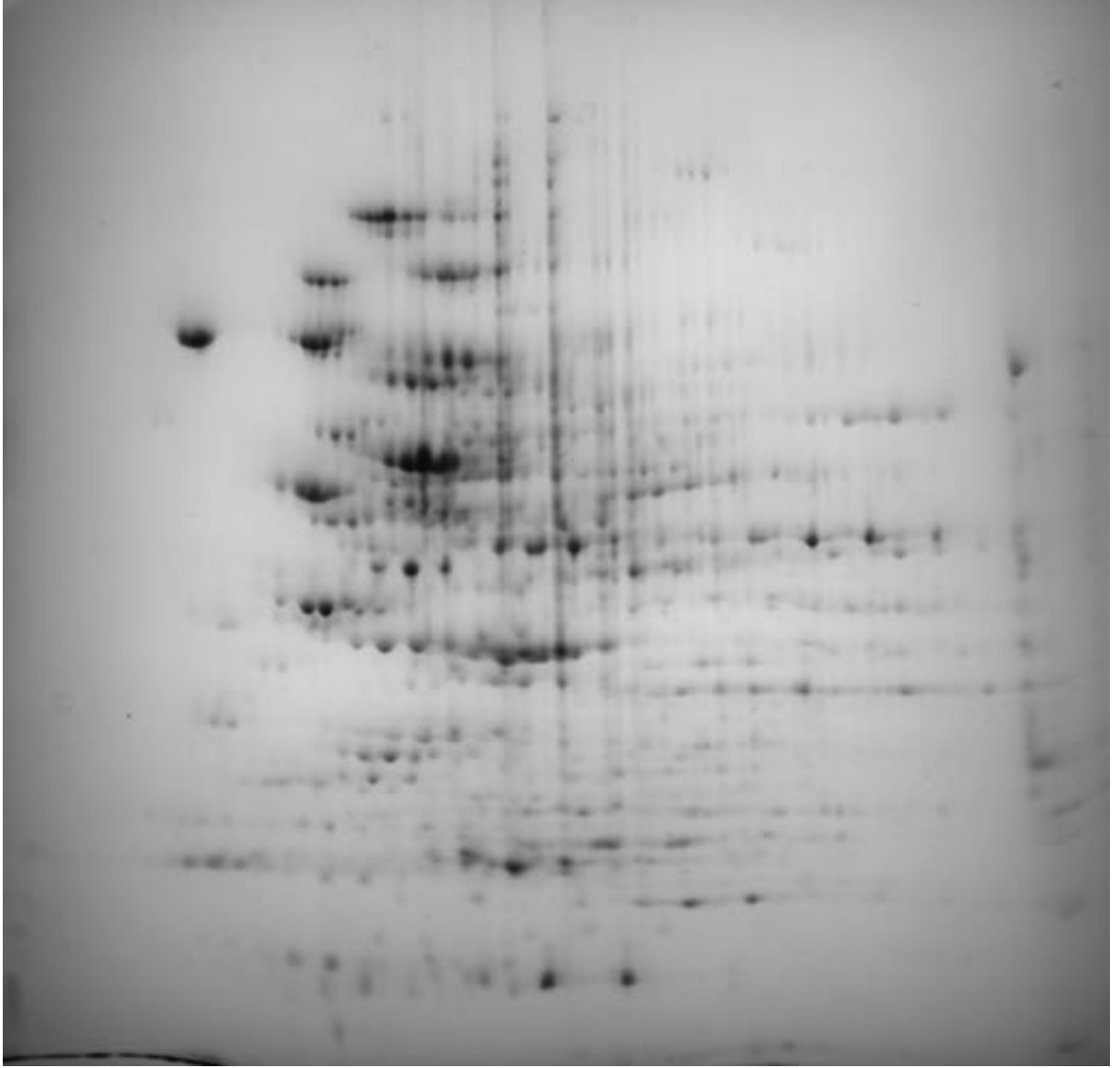
Her bir ilaç muamelesi yapıldığında kontrol örnekleri arasında fark olmadığının teyit edilmesi için de her seferinden kontrol örnekleri ilaç ile muamele edilmiş örnekler beraber yürütülmüştür. Elde edilen jel görüntüleri DMSO ile muamele edilmiş kontrol örneklerinde bir farklılık göstermemiştir (Şekil 23, Şekil 25, Şekil 27).

Daha sonra ilaç ile muamele edilen ve kontrol jellerinden tanımlanmak üzere ifadeleri farklılaşan protein spotları kesilmiştir.

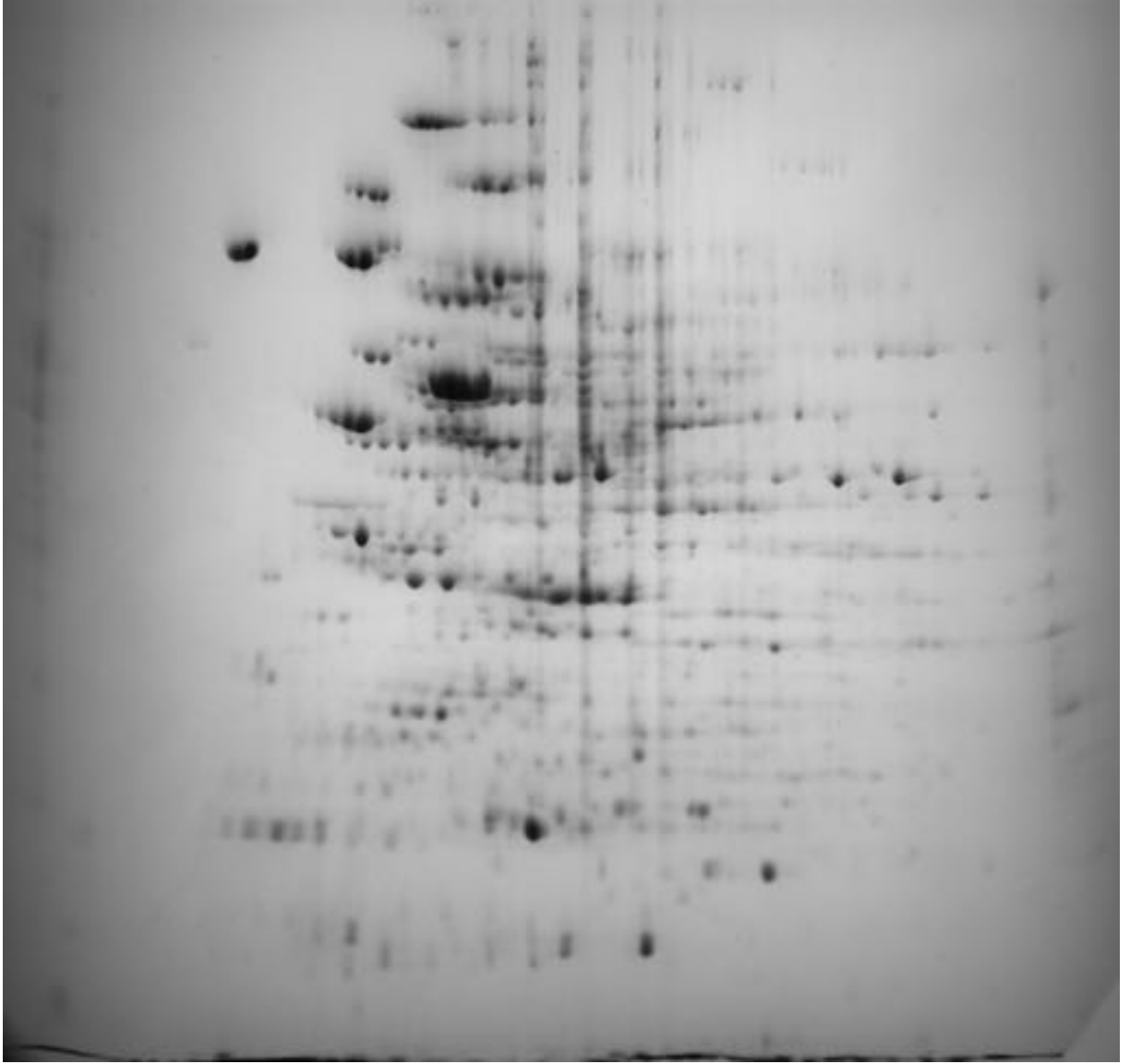
(-)-Römerin (Şekil 22), boldin (Şekil 24), bulbokapnin (Şekil 26) ve DMSO (Şekil 23, Şekil 25, Şekil 27) ile muamelenin ardından jel görüntüleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, (-)-römerin ile muamele edilen hücreler dışında diğer tüm hücrelerden elde edilen protein haritalarının birbirine büyük benzerlik gösterdiğini açıkça görülmüştür. Hatta boldin ve bulbokapnin ile muamele edilen hücrelerden elde edilen jel görüntülerinde kontrole göre 2 kat ve daha fazla değişime uğramış olan protein spotu belirlenememiştir ve bu nedenle bu jellerden protein spotu analiz edilmemiştir.



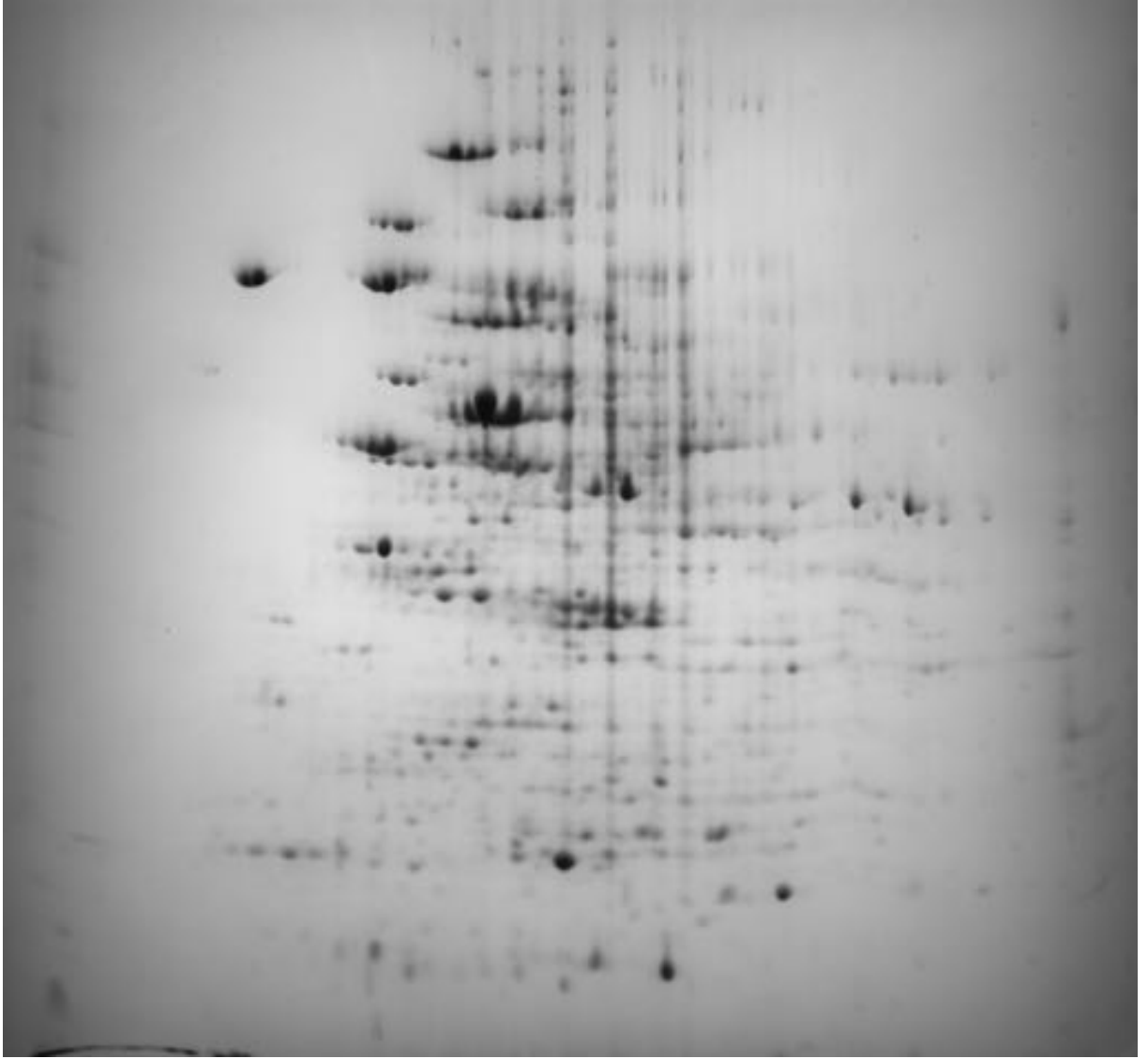
Şekil 22. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.



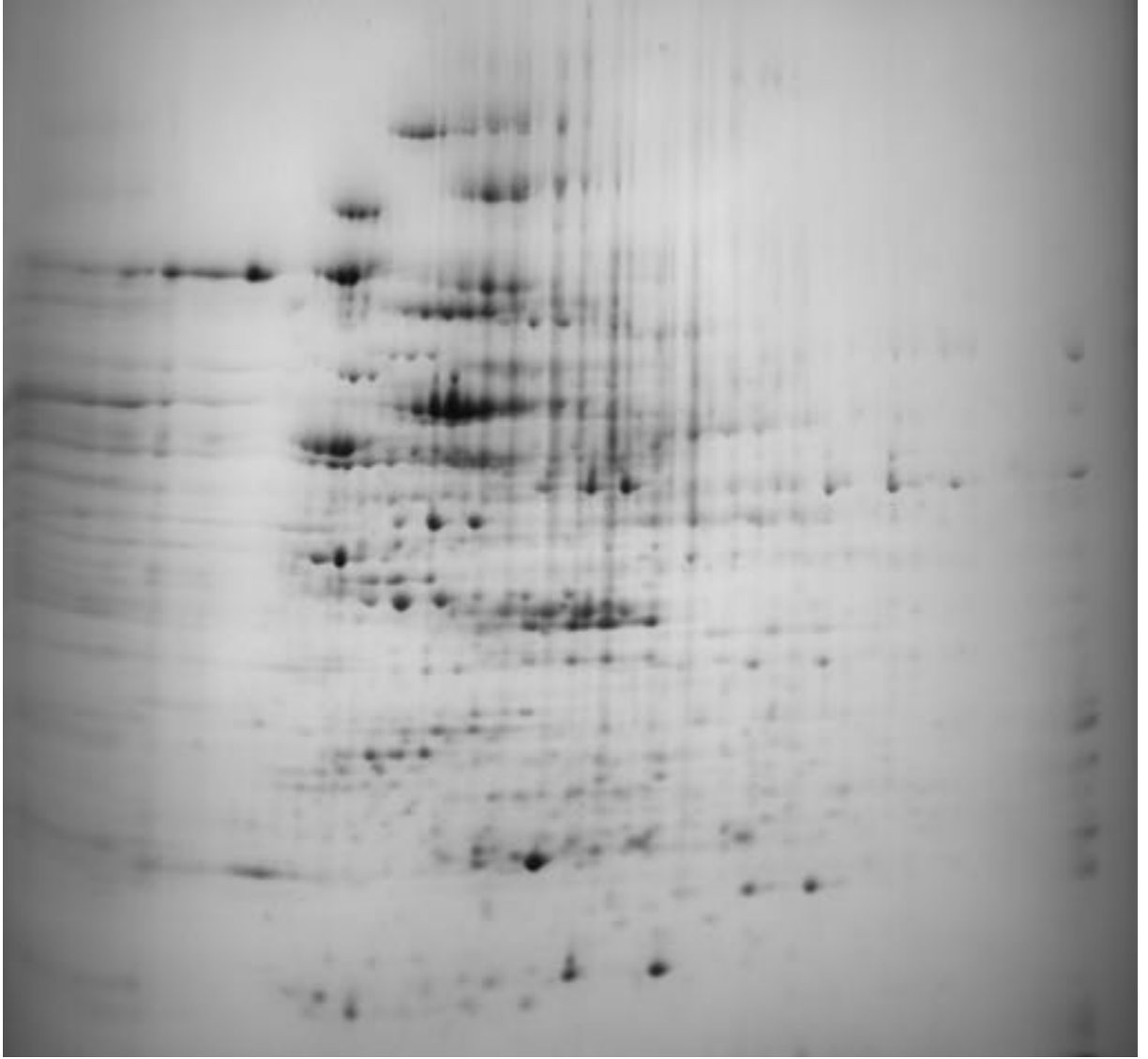
Şekil 23. (-)-Römerin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.



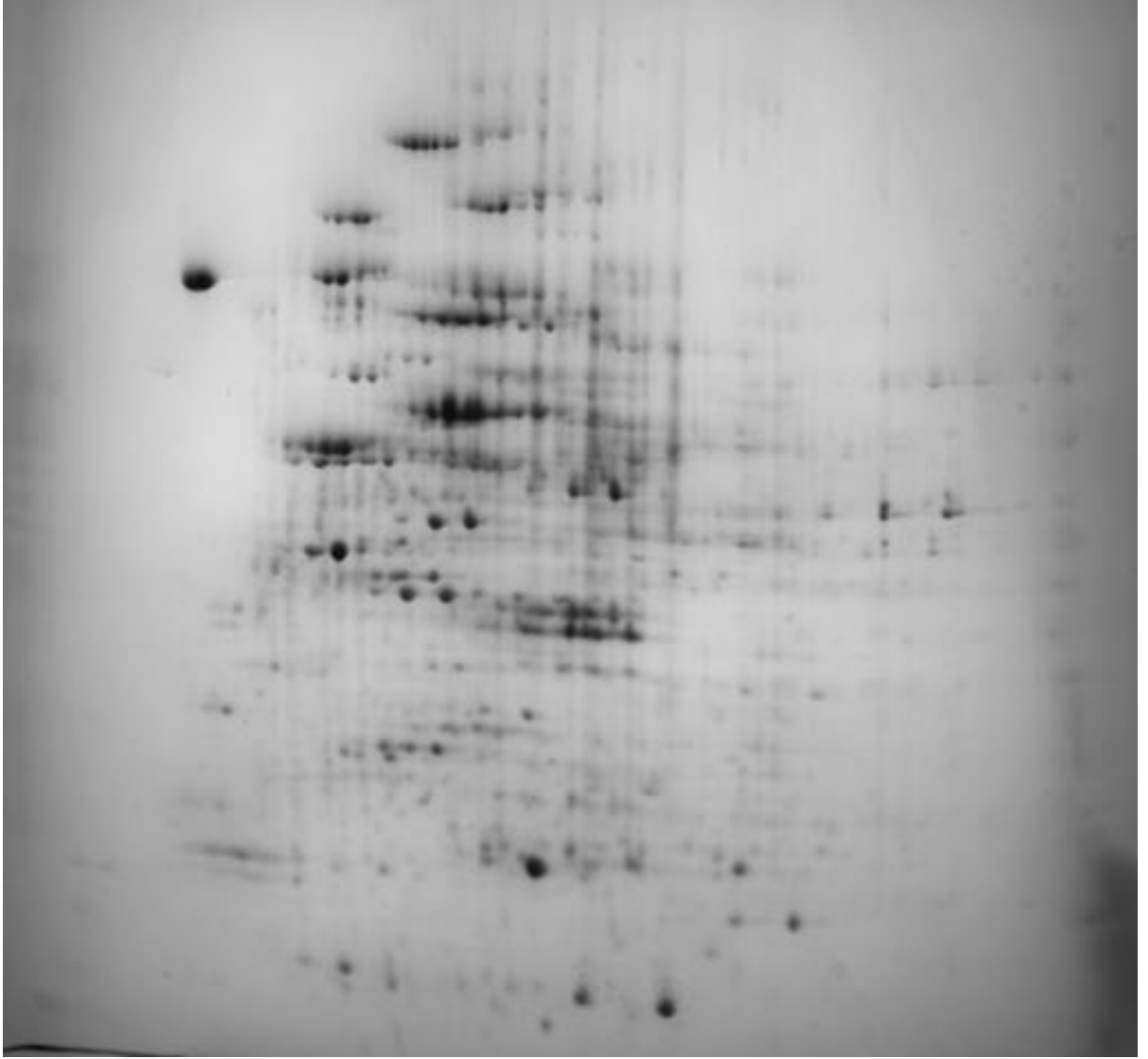
Şekil 24. Boldin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.



Şekil 25. Boldin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.



Şekil 26. Bulbokapnin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.



Şekil 27. Bulbokapnin ile 1 saat muamele edilmiş *B. subtilis* hücrelerinin kontrolü. Kontrol hücrelerinden elde edilen proteinlerin 2-D haritaları. Jeller CBB G-250 ile boyanmışlardır.

Jellerden kesilen protein spotlarının analizi Kocaeli Üniversitesi Proteomik Laboratuvarında (Tıbbi-Biyoloji bölümü, proteomiks laboratuvarı) yapılmış ve ifadeleri 2 kat ve daha çok değişen protein spotlarının analiz sonuçları

Tablo 10'da özetlenmiştir.

Tablo 10. (-)-Römerin muamelesini takiben *B. subtilis*'te ekspresyonu farklılaşan proteinlerin kütle spektrometrisi ile yapılan analiz sonuçları

Best Protein Accession	Best Protein Mass	Calculated pI	Best Protein Description	Regulation
LIAH_BACSU	25682	6,2	Protein liaH	Up
LIAH_BACSU	25682	6,2	Protein liaH	Up
LIAH_BACSU	25682	6,2	Protein liaH	Up
LIAH_BACSU	25682	6,2	Protein liaH	Up
YVYD_BACSU	21966	5,36	Uncharacterized protein yvyD	Up
YVYD_BACSU	21966	5,36	Uncharacterized protein yvyD	Up
MDH_BACSU	33623	4,92	Malate dehydrogenase	Up
SUCC_BACSU	41346	5,04	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	Down
G3P1_BACSU	35810	5,2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	Down
YCEH_BACSU	41646	5,9	Uncharacterized protein yceH	Up
DHNA_BACSU	54840	4,89	NADH dehydrogenase	Up
DHNA_BACSU	54840	4,89	NADH dehydrogenase	Up
TPIS_BACSU	27013	5	Triosephosphate isomerase	Down
PTA_BACSU	34769	4,84	Phosphate acetyltransferase	Up
IMDH_BACSU	52958	6,18	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Down
IMDH_BACSU	52958	6,18	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Down
IMDH_BACSU	52958	6,18	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Down
GLPK_BACSU	55046	5,12	Glycerol kinase	Down
G20U_BACSU	16583	4,64	General stress protein 20U	Up
MREB_BACSU	35894	5,09	Rod shape-determining protein mreB	Up
LIAH_BACSU	25682	6,2	Protein liaH	Up
GR_BACSU	31643	5,23	Glyoxal reductase	Up
GR_BACSU	31643	5,23	Glyoxal reductase	Up
IOLS_BACSU	35146	5,5	Protein iolS	Up

Protein analiz sonuçlarına göre, yapısal olarak çok benzemelerine rağmen, seçilen aporfin sınıfı alkaloitlerden sadece (-)-römerin *B. subtilis*'e karşı ciddi bir antibakteriyel olarak bulunmuştur. Boldin ve bulbokapnin ile muamelenin ardından çeşitli metaolizmalara ait yolların etkileneği olduğu görölse de, proteinlerin değışme miktarlarının çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle de bu iki alkaloit muamelesinin ardından elde edilen protein haritaları kontrol örneklerinin protein haritalarına çok benzer görüntülenmiştir. Ayrıca boldin ve bulbokapnin ile muamelenin ardından hücrelerin genel büyüme eğrilerinin kontrol hücrelerine çok benzemesi de bu sonucu doğrulamıştır.

Genel olarak (-)-römerin muamelesinin ardından *B. subtilis* hücrelerinde stresi kontrol eden alternative sigma faktörü σ^B etkisi altındaki proteinlerin ifadelerinde değışiklik olduğu görölmüştür. Bunun dışında karbon metabolizmasında yer alan proteinin ifadelerinin ifadelerinin genel olarak azaldığı bulunmuştur. Ancak bu azalmanın azalan büyüme hızının bir sonucu olabileceği de düşünölmektedir. Karbonhidrat metabolizması çok sayıda farklı yoldan etkilenebileceği için, meydana gelen değışimleri tek bir hedefte yoğunlaştırmak yanıltıcı olabilecektir. Bunlara ek olarak özellikle stres proteinlerinde ciddi bir değışiklik bulunmuştur. Bu proteinler Tablo 10'da kalın harfler yazılar ile işaretlenmiştir.

4.2.6 Alkaloitler Varlığında *B. subtilis* Lipidomu

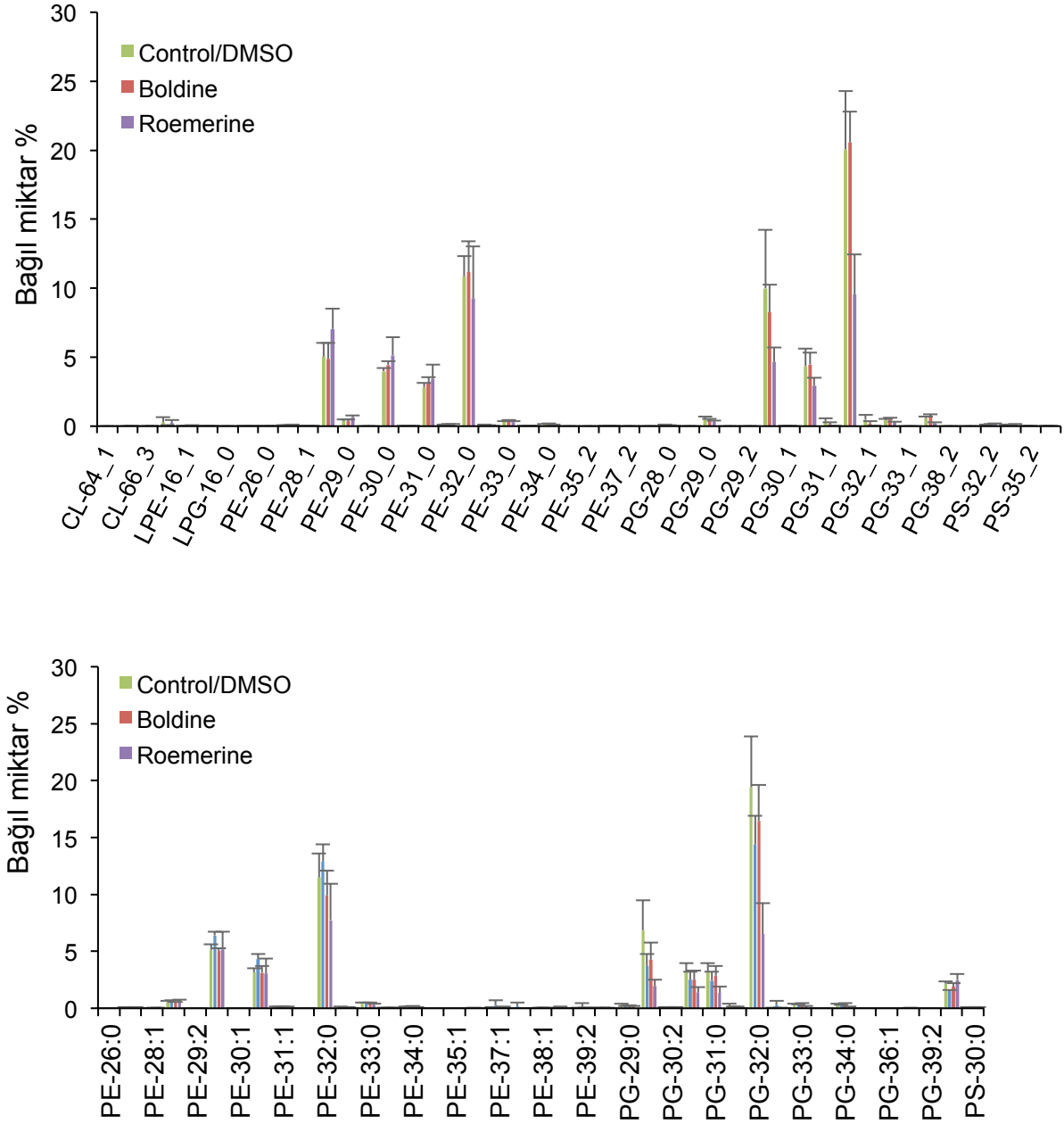
B. subtilis hücrelerinin (-)-römerin varlığında büyümeleri sırasında da, lipit profillerinin değıştiği gözlemlenmiştir. Zamana bağılı olarak çok ciddi değışiklikler gözlemlenmediği için sadece 1 saat alkaloit muamelesinin ardından *B. subtilis* hücrelerinin lipidomları analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 28'de özetlenmiştir.

Kontrol hücrelerine göre (-)-römerin ile muamele sonucunda en çok PE-32:0 ve PG-32:0 miktarında ciddi azalma görölmüştür. PG-32:0'daki değışiklik PE-32:0'ye göre çok daha fazla olmuştur. Boldine ile muamelenin ardından ise hem PE-32:0 hem de PG-32:0'da az bir azalma olsa da bu azalmalar (-)-römerindeki kadar belirgin olmamıştır.

Genel olarak (-)-römerin varlığında farklı PG'lerin miktarlarında aynı oranda olmamakla beraber hemen hepsinde belirli bir düşüş görölmüştür. PE'lerdeki değışim ise PG'lerdekenden biraz daha farklı olmuştur. (-)-Römerin varlığında kontrol hücrelerine göre PE'lerde de azalma ölçölmüştür ancak azalma miktarı PG'lere oranla daha az olmuştur. Yalnız ciddi farkın ölçöldüğü PE-28:2 olmuştur. Diğer tüm ürönlere oranla (-)-römerin varlığında PE-28:2'de ciddi bir artış ölçölmüştür.

3 tekrarlı yapılan bu analizlerdeki hata barlarının yüksek olması ise analizlerin daha fazla tekrarlı yapılması gerekliliğini işaret etmektedir.

Bu sonuçlar da protein sonuçlarında olduğu gibi sadece (-)-römerin varlığında hücre membranında belirgin bir değişiklik olduğunu göstermiştir.



Şekil 28. (-)-Römerin ve boldine ile muamele edilen ve kontrol *E. coli* örneklerinin lipidlerinin analizleri

4.2.7 (-)-Römerin Varlığında *B. subtilis*'de qPZR ile Analizler

B. subtilis ile süren proteom çalışmalarının analiz sonuçlarının gelmesi uzun zaman aldığından ve ayrıca primer tasarımı ve siparişi de uzun sürdüğünden, (-)-römerinin çoklu ilaç pompalarının hedefleyebilme ihtimali üzerinde durularak, bu mikroorganizmanın en yaygın *bmr* pompası için ve transkriptomda seviyesi değişmeyen genin (housekeeping gene) belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle transkriptomda seviyesi değişmeyen genin bulunması için üç tane hedef gen seçilmiştir. Bunlar *16s rRNA*, *gyrA* ve *gyrB* olarak belirlenmiştir. Yapılan qPZR sonucunda bu genlerden sadece *16s rRNA*'nın ifade seviyesinin uygun olduğu görülmüştür. Bu gen temel alınarak yapılan qPZR deneyleri ve hesaplamaları sonucunda *bmr* geni için elde edilen sonuçlar da Tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo 11. *B. subtilis*'te qPZR ile seçili genlerin ekspresyon hesapları

Değişim (log2 değeri)			
Gen ismi	Boldin	Bulbokapnin	(-)-Römerin
<i>bmr</i>	6.1	2.6	7.2

Tablo 11'de görüldüğü gibi *bmr* ilaç pompasına ait genin ifadesini her üç alkaloidin varlığı da arttırmıştır. Bu da Bmr'nin alkaloidlerin dışarı atımından etkili olduğunu göstermektedir. Ancak bu proteine ait sonuç proteom analizi sonucunda elde edilememiştir. Bu durumun en önemli nedeni Bmr'nin membran proteini olması nedeniyle çözünü proteinler arasında yer almama ihtimalinin olmasıdır. Diğer taraftan ifadesin genel olarak düşük olması da bu proteinin kaçırılmasına neden olabilecektir.

4.2.8 (-)-Römerin'nin *B. subtilis*'te Çoklu İlaç Pompalarına Etkisinin Analizi

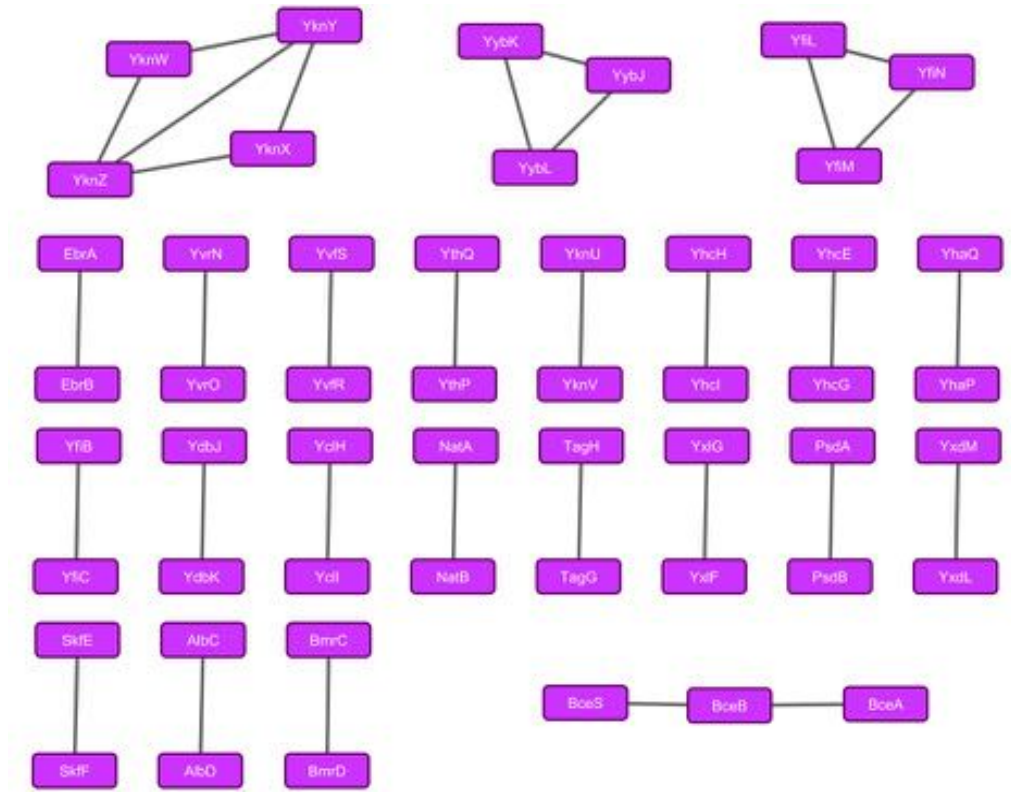
Üç farklı alkaloid için *E. coli* TB1 ile elde edilen sonuçlar çoklu ilaç pompalarının etkin olabileceğini göstermiştir.

Çoklu ilaç pompaları arasında P-glikoprotein'in (-)-römerin ile etkileştiği You vd. (1995) tarafından daha önce rapor edilmiştir. Bu pompa ökaryotlarda bulunup *B. subtilis*'teki homologunun da BmrA olduğu rapor edilmiştir (Steinfels vd., 2004). Bu bilgi doğrultusunda BmrA proteininin STRING 10 veri tabanı kullanılarak fonksiyonel etkileşim ağı oluşturulmuştur. Sonuçlar BmrA'nın farklı proteinler ile fonksiyonel bir etkileşim oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak BmrA'nın etkileşimde bulunduğu

proteinler fonksiyonel olarak da araştırılması (-)römerinin mekanizmasını aydınlatılmasına fayda sağlayacaktır.

Daha sonra *B. subtilis*'te çoklu pompalar ve birbirleri ile ilişkileri araştırılmıştır. Şekil 29'da *B. subtilis*'te bulunan ve fiziksel etkileşimleri özetlenen bilgiler verilmiştir. Bu şekil Cytoscape 3.2.1 kullanılarak çizilmiştir.

Şekil 29'daki sonuçlar mevcut pompaların birbirleri ile fiziksel bir bağ kurmayıp ortak proteinleri-parçaları olmadığını göstermiştir. Her biri bağımsız olarak çalışmıştır. Mevcut fiziksel bağ bilgileri de SubtiWiki (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/>) ve UniProt (<http://www.uniprot.org/>) veri tabanlarından alınmıştır.



Şekil 29. *B. subtilis* MDR pompalarının ilişkilendirilmesi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu projede aporfin sınıfına ait üç farklı alkaloidin, (-)-römerin, boldine ve bulbokapninin *E. coli* ve *B. subtilis* üzerindeki olası antibakteriyel mekanizması araştırılmıştır. Yapılan proteom ve lipidom çalışmaları sonucunda, bu alkaloidlerden sadece (-)-römerinin ciddi bir antimikrobiyel etkisi olduğu bulunmuştur. (-)-Römerin alkaloidinin $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonu her iki bakteri için de öldürücü olmuştur ve *E. coli* hücreleri için bu değer çalışma konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan aynı konsantrasyonda *B. subtilis* hücrelerinde ciddi bir spor oluşumu meydana geldiğinden, bu hücreler için çalışma konsantrasyonu $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda

- $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (-)-römerin ile 1 saat muamelenin ardından *E. coli* hücrelerinde genel olarak hücre içi karbonhidrat varlığını kısıtlanmakta ve hücre porinleri azalmaktadır. Bunun en önemli nedeninin hücre içine (-)-römerinin alımını engellemek olduğu düşünülmektedir. Ozmotik denge ile ilgili ciddi bir değişiklik olmamıştır. Hücre atım pompalarında da değişiklik qPZR ile gösterilmiş ancak protein seviyesinde bu farklılık belirgin olmamıştır.
- $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (-)-römerin ile 1 saat muamelenin ardından *B. subtilis* hücrelerinde ise yine hücre içi karbon akışı azalırken stres proteinlerinden önemli bir artış kaydedilmiştir. Buna ek olarak, qPZR analizleri *B. subtilis* hücrelerinde çoklu direnç pompalarından Bmr'de ciddi artma meydana geldiğini işaret etmiştir. Bu *B. subtilis*'in en çok çalışılan ve bilinen atım pompalarından bir tanesidir.
- Diğer iki aporfin alkaloidi boldin ve bulbokapninin yüksek konsantrasyonlarında bile *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinde belirgin bir antibakteriyel aktivite ölçülememiştir.
- (-)-Römerin ile 1 saat muamelenin ardından hem *E. coli* hem de *B. subtilis* hücrelerinin membranlarında akışkanlığın arttığı ve belki de bunun hücre ölümüne neden olduğu düşünülmüştür.
- Projeden elde edilen sonuçlar ile (-)-römerinin yeni bir antibakteriyel ilaç adayı olarak değerlendirilmesi düşünülebilir.

5.2 Öneriler

Projeden elde edilen sonuçlar, (-)-römerinin yeni bir antibakteriyel ilaç adayı olarak değerlendirilebileceğini işaret etmiştir. Etki mekanizması konusunda önemli ipuçları elde edilmiş olsa da, tam hedeflerinin neler olduğu doğrultusunda henüz bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu doğrultuda çeşitli önerilerde bulunulabilir.

- (-)-Römerinin *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinde etkili bir antibakteriyel oldukları ve hangi yolakları etkilemiş oldukları belirlenmiş olsa da bu yolaklardaki hedefleri tam olarak belirli değildir. Bunun önemli nedeni de değişikliklerin protein ve lipid seviyelerine hassas olmamaları olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle etkilenen yolakların transkriptom düzeyinde ve hatta fonksiyonel testler ile araştırılması uygun olacaktır.
- (-)-Römerinin *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinde çoklu ilaç direnci pompalarını hedef alabileceği bilgisinden yola çıkarak, özellikle bu pompaları sentezlemeyen mutantlar yapılarak ilacın hedefinin bu pompalardan biri olup olmadığı araştırılabilir. (-)-Römerinin bu pompalardan birinin sübstratı olması durumunda hücre büyümesinde ciddi değişiklikler görülecektir.
- *E. coli* ve *B. subtilis* hücre membranlarında meydana gelen değişiklikler elektron mikroskopu ile görüntülenerek, elde edilen sonuçlar (-)-römerinin membran lipidlerinde meydana getirdiği değişiklikler ile ilişkilendirilebilir. Böylece mekanizma hakkında daha detaylı bilgilere elde edilecektir.
- (-)-Römerinin yeni bir ilaç adayı olarak değerlendirilebilmesi için memeli hücreleri ile toksisite deneyleri yapılabilir.

6. REFERANSLAR

- Abreu, A.C., McBain, A.J., Simoes, M. 2012. "Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents", *Nat Prod Rep*, 29, 1007–1021.
- Agnihotri, V.K., Elsohly, H.N., Khan, S.I., Jacob, M.R., Joshi, V.C. 2008. "Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity", *Phytochem Lett*, 1, 89-93.
- Baldwin, E.L., Osheroff, N. 2005. "Etoposide, topoisomerase II and cancer", *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5, 363–372.
- Bertalanffy, L.V. 1968. "General System Theory". New York: George Braziller.
- Bhadra, K. Kumar, G.S. 2011. "Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design", *Med Res Rev*, 31, 821–862.
- Boberek, J.M., Stach, J., Good, L. 2010. "Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine", *PLoS One*, 5, e13745.
- Bockstael, K., Aerschot, A.V. 2009. "Antimicrobial resistance in bacteria", *Cent Eur J Med*, 4, 141–155.
- Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, 12, 248–254.
- Braga, L.C., Leite, A.A., Xavier, K.G., Takahashi, J.A., Bemquerer, M.P., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M. 2005. "Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*", *Can J Microbiol*, 51, 541-547.
- Camacho, D., de la Fuente, A., Mendes, P. 2005. "The origin of correlations in metabolomics data", *Metabolomics*, 1, 53-63.
- Cannon, W. 1932. "The Wisdom of the Body", New York: Norton.
- Cowan, M.M. 1999. "Plant products as antimicrobial agents", *Clin Microbiol Rev*, 12, 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis N.G. 2000. 1250–1318. "Natural Products (Secondary Metabolites)". *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Editörler: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones R. Maryland: American Society of Plant Physiologists.
- Deng, Y.C., Li, J.R., Gao, C.W., Yang, L.L. 2006. "Inhibitory activity of the extract from the root tubers of *Stephania kwangsiensis* and its compounds against pathogenic fungi and bacteria", *Plant Protection*, 32, 43–46.
- Doyle, A.E., McQueen, E.G., Smirk, F.H. 1955. "Treatment of hypertension with reserpine, with reserpine in combination with pentapyrrolidinium, and with reserpine in combination with *Veratrum* alkaloids", *Circulation*, 11, 170–181.
- East, S.P., Silver, L.L. 2013. "Multitarget ligands in antibacterial research: Progress and opportunities", *Expert Opin Drug Discov*, 8, 143–156.
- Heeb, S., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Diggle, S.P., Williams, P., Camara, M. 2011. "Quinolones: From antibiotics to autoinducers", *FEMS Microbiol Rev*, 35, 247–274.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christman, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Hood, L. 2001. "Integrated genomic and proteomic analysis of a systematically perturbed metabolic network", *Science*, 292, 929-934.
- Ivanova, P., Milne, S.B., Myers, D.S., Brown, H.A. 2009. "Lipidomics: a mass spectrometry based, systems level analysis of cellular lipids", *Curr. Opin. Chem. Biol*, 13, 526-531.

- Jantan, I., Rafi, I.A., Jalil, J. 2001. "Inhibition of platelet-activating factor receptor binding by aporphine and phenanthrenoid alkaloids from *Aromadendron elegans*", *Planta Med*, 67, 466-467.
- Juang, J.K., Liu, H.J. 1987. "The effect of DMSO on natural DNA conformation in enhancing transcription", *Biochem Biophys Res Com*, 146, 1458-1464
- Kittakoop, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S. 2014. "Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation", *Curr Top Med Chem*, 14, 239-252.
- Karaosmanoglu, K., Sayar, N.A., Kurnaz, I.A., Akbulut, B.S. 2014. "Assessment of berberine as a multi-target antimicrobial: A multi-omics study for drug discovery and repositioning" *OMICS J Integr Biol* 18, 42-53.
- Kobayashi, Y., Yamashita, Y., Fujii, N., Takaboshi, K., Kawakami, T., Kawamura, M., Mizukami, T., Nakano, H. 1995. "Inhibitors of DNA topoisomerase I and II isolated from the *Coptis rhizomes*", *Planta Med*, 61, 414-418.
- Lieber, D. 2002. "Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology", Editor: Liebler, D.C., Totowa NJ: Humana Press Inc.
- Liu, W., Han, C., Hu, L., Chen, K., Shen, X., Jiang, H. 2006. "Characterization and inhibitor discovery of one novel malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase (MCAT) from *Helicobacter pylori*", *FEBS Lett.*, 580, 697-702.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method", *Methods*, 25, 402-408.
- McKenna M. 2013. "Antibiotic resistance: the last resort", *Nature* 499, 394-6.
- Milian, L., Estelles, R., Abarca, B., Ballesteros, R., Sanz, M.J., Blazquez, M.A. 2004. "Reactive oxygen species (ROS) generation inhibited by aporphine and phenanthrene alkaloids semi-synthesized from natural boldine", *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 52, 696-699.
- Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., Kaatz, G.W. 1993. "Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter", *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 128-129.
- Orhan, I., Ozcelik, B., Karaoğlu, T., Sener, B. 2007. "Antiviral and Antimicrobial Profiles of Selected Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* Species", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62, 19-26.
- Ortega-Ramirez, L.A., Rodriguez-Garcia, I., Leyva, J.M., Cruz-Valenzuela, M.R., Silva-Espinoza, B.A., Gonzalez-Aguilar, G.A., Siddiqui, M.W., Ayala-Zavala, J.F. 2014. "Potential of Medicinal Plants as Antimicrobial and Antioxidant Agents in Food Industry: A Hypothesis",
- Özbalci, C., Sachsenheimer, T., Brügger, B. 2013. "Quantitative analysis of cellular lipids by nano-electrospray ionisation mass spectrometry", *Methods Mol Biol.*, 1033, 3-20.
- Quetin-Leclercq, J., Stevigny, C., Hoet, S., Block, S., Wautier, M.C. 2004. "Study on *Cassytha filiformis* from Benin: isolation, biological activities and quantification of aporphines", *Proceedings of Bioresources Toward Drug Discovery and Development*, 81-107.
- Rao, G-X., Zhang, S., Wang, H-M., Li, Z-M., Gao, S., Xu, G-L. 2009. "Antifungal alkaloids from the fresh rattan stem of *Fibraurea recisa* Pierre", *J Ethnopharmacol*, 123, 1-5.
- Reddy, P.J., Ray, S., Sathe, G.J., Prasad, T.S.K., Rapole, S., Panda, D., Srivastava, S. 2015. "Proteomics Analyses of *Bacillus subtilis* after Treatment with Plumbagin, a Plant-Derived Naphthoquinone", *OMICS*, 19, 12-23.

- Rohini, K., Srikumar, P.S. 2012. "Aporphine alkaloids as inhibitors for Malonyl-CoA: Acyl Carrier Protein Transacylase (MCAT) from *Helicobacter pylori*", *Int J Pharm Pharm Sci*, 4, 764-768.
- Sahu, J., Sen, P., Choudhury, M.D., Dehury, B., Barooah, M., Modi, M.K., Talukdar, A.D. 2014. "Rediscovering medicinal plants' potential with OMICS: Microsatellite survey in expressed sequence tags of eleven traditional plants with potent antidiabetic properties", *OMICS*, 18, 298-309.
- Schaeffer, A.B., Fulton, M.D. 1933. "A simplified method of staining endospores", *Science*, 77, 194.
- Shevchenko, A., Simons, K. 2010. "Lipidomics: coming to grips with lipid diversity", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 593-598.
- Sibanda, T., Okoh, A.I. 2007. "The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents", *Afr J Biotechnol*, 6, 2886-2896.
- Silvestri, E., Lombardi, A., Lange, P., Glinni, D., Senese, R., Cioffi, F., Lanni, A., Goglia, F., Moreno, M. 2011. "Studies of Complex Biological Systems with Applications to Molecular Medicine: The Need to Integrate Transcriptomic and Proteomic Approaches", *J Biomed Biotechnol*, Article ID 810242, 19 pages
- Steinfels ve ark., 2004, Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochem*, 43:7491-7502
- Stratling, W.H., 1976. "Stimulation of transcription on chromatin by polar organic compounds", *Nucleic Acids Res*, 3, 1203-1213.
- Terkeltaub, R.A., Furst, D.E., Bennett, K., Kook, K.A., Crockett, R.S., Davis, M.W. 2010. "High versus low dosing of oral colchicine for early acute gout flare: Twenty-four-hour outcome of the first multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-comparison colchicine study", *Arthritis Rheum*, 62, 1060-1068.
- Tsai, I.L., Liou, Y.F., Lu, S.T. 1989. "Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities", *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*, 5, 132-145.
- Weiner, N. 1948. "Cybernetics, or control and Communication in the Animal and Machine", Cambridge: MIT Press.
- Weiner, N. 1948. "Cybernetics, or control and Communication in the Animal and Machine", Cambridge: MIT Press.
- Wink, M., Schimmer, O. 2010. "Molecular modes of action of defensive secondary metabolites". Annual plant reviews volume 39: functions and biotechnology of plant secondary metabolites. Editör: Wink, M., Oxford: Wiley-Blackwell.
- Woo, S.H., Sun, N.J., Cassady, J.M., Snapka, R.M. 1999. "Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids", *Biochem Pharmacol*, 57, 1141-1145.
- WU C.C., Shryock T.R., Lin T.L., Veenhuizen M.F. 1997. "Testing Antimicrobial Susceptibility Against *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro", *Swine Health Production*, 5, 227.
- You, M., Mahinda Wickramaratne, D.B., Silva, G.L., Chai, H., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Kinghorn, A.D., F'ezzuto, J.M. 1995. "(-)-Roemerine, An Aporphine Alkaloid From *Annona Senegalensis* That Reverses The Multidrug-Resistance Phenotype With Cultured Cells", *J Nat Prod*, 58, 598-604.

7. EKLER

7.1 Çalıştay

Bu proje kapsamında Marmara Üniversitesi Enstitüler Binası Konferans salonunda 7-9 Haziran 2017 tarihleri arasında yaklaşık 100 katılımcı ile bir çalıştay gerçekleştirilmiştir. Çalıştayın ana teması OMİK teknolojileri ve bunların kullanımı ile hedeflerin belirlenmesi olduğundan proteomik, lipidomik ve transkriptomik konularında çalışan araştırmacılar konuşmacı olarak davet edilmiştir. Düzenlenen çalıştayın anonsu ve programı aşağıda yer almaktadır.



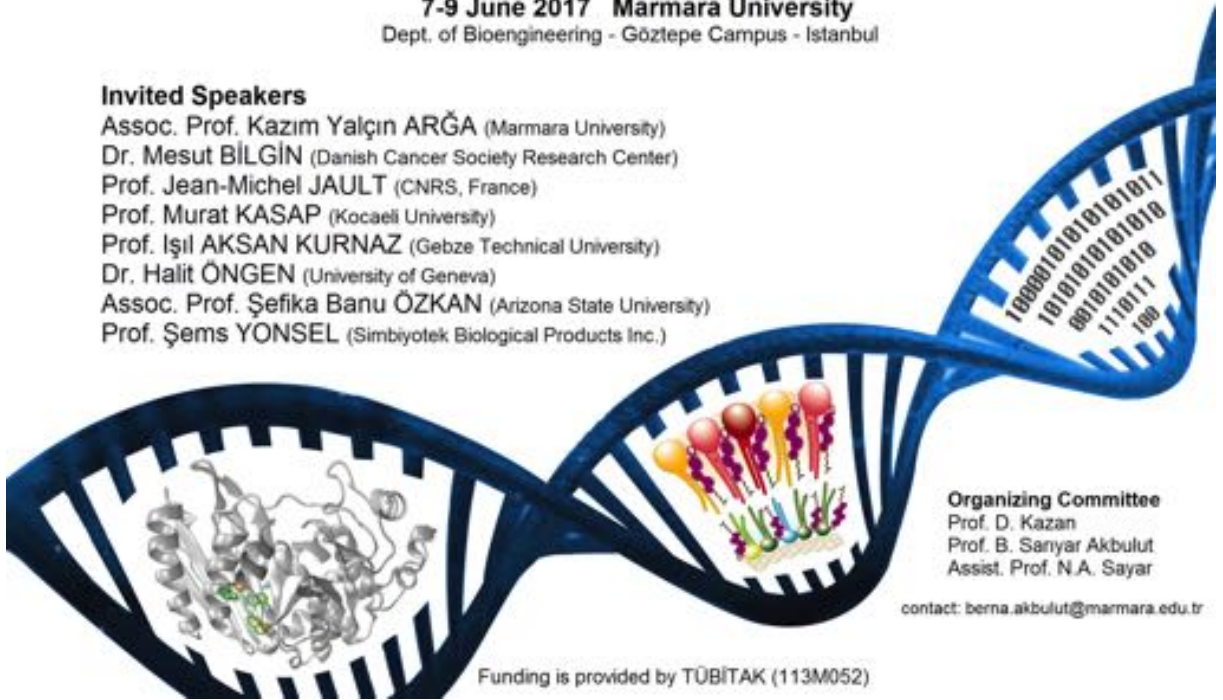
FROM NETWORKS TO TARGETS

Workshop on OMIC technologies and their applications

7-9 June 2017 Marmara University
Dept. of Bioengineering - Göztepe Campus - Istanbul

Invited Speakers

Assoc. Prof. Kazım Yalçın ARĞA (Marmara University)
Dr. Mesut BİLGİN (Danish Cancer Society Research Center)
Prof. Jean-Michel JAULT (CNRS, France)
Prof. Murat KASAP (Kocaeli University)
Prof. Işıl AKSAN KURNAZ (Gebze Technical University)
Dr. Halit ÖNGEN (University of Geneva)
Assoc. Prof. Şefika Banu ÖZKAN (Arizona State University)
Prof. Şems YONSEL (Simbiyotek Biological Products Inc.)



Organizing Committee
Prof. D. Kazan
Prof. B. Saniyar Akbulut
Assist. Prof. N.A. Sayar

contact: berna.akbulut@marmara.edu.tr

Funding is provided by TÜBİTAK (113M052)

FROM NETWORKS TO TARGETS

Workshop on OMIC technologies and their applications

Program

JUNE 7TH, 2017

10:00-11:00 Registration

11:00-11:30 Welcome notes

Prof. Berna Sarıyar Akbulut

Prof. A. Alp Sayar

11:30-12:15 Prof. Şems Yonsel (*Simbiyotek Biological Products Inc.*)

Türkiye'de endüstriyel mikrobiyoloji mevzuatı

LUNCH BREAK

13:30-14:15 Dr. Halit Öngen (*University of Geneva*)

Impact of regulatory variation on human disease development

14:15-15:00 Dr. Halit Öngen

Application: Analysis of RNA-seq data

COFFEE BREAK

15:30-16:15 Dr. Halit Öngen

Application: Analysis of RNA-seq data

JUNE 8TH, 2017

9:30-10:15 Prof. Murat Kasap (*Kocaeli University*)

2D gel electrophoresis and DIGE: Their power and limitations in performing comparative proteomics

10:15-11:00 Prof. Jean-Michel Jault (*CNRS-France*)

The functioning mechanism of multidrug ABC transporters involved in antibiotic resistance

COFFEE BREAK

11:30-12:15 Assoc. Prof. Ş. Banu Özkan (*Arizona State University*)

The Role of Allostery and Conformational Dynamics in Protein Function:
A Proteomewide Analysis through Missense Variation in Genome

LUNCH BREAK

13:30-14:15 Prof. Ozlem Keskin (*Koç University*)

Computationally modeling protein-protein interactions

14:15-16:15 Proteomics Applications Groups A/B

JUNE 9TH, 2017

9:30-10:15 Assoc. Prof. K. Yalçın Arğa (*Marmara University*)

Systems biomarkers, and network driven drug targeting and repositioning

10:15-11:00 Dr. Mesut Bilgin (*Danish Cancer Society Research Center*)

Quantitative shotgun lipidomics: tracks, tricks and challenges

COFFEE BREAK

11:30-12:00 Prof. Işıl Aksan Kurnaz (*Gebze Technical University*)

Experimental aspects of high throughput-omic studies and recent technologies

12:00 Closing remarks

7.2 Yayınlar

7.2.1 Bilimsel Makaleler

1. Nilay Budeyri Gokgoz, Berna Sariyar Akbulut. Proteomics Evidence for the Activity of the Putative Antibacterial Plant Alkaloid (-)-Roemerine: Mainstreaming Omics-Guided Drug Discovery. OMICS A Journal of Integrative Biology. Volume 19, Number 8, 2015.
2. D Ayyıldız, KY Arga, FG Avcı, FE Altinisik, C Gurer, G Gulsoy Toplan, D Kazan, K Wozny, B Bruegger, B Mertoglu, B Sariyar Akbulut Transcriptomic analysis displays the effect of (-)-roemerine on the motility and nutrient uptake in *Escherichia coli*. Current Genetics (DOI 10.1007/s00294-016-0673-4).

7.2.2 Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Dilara Ayyıldız, Fatma Gizem Avcı, Kazım Yalcın Arga, Nilay Budeyri Gokgoz, Nihat Alpogu Sayar, Dilek Kazan, Katharina Wozny, Britta Bruegger, Berna Sariyar Akbulut. The plant derived alkaloid roemerine is involved in the modulation of motility in *Escherichia coli*. Poster bildiri olarak basıldı ve sunuldu.
2. F.G. Avcı, B. Sariyar Akbulut Evaluation the effect of plant-derived natural products on *Bacillus subtilis* 168 proteome. FEBS-IUBMB WORKSHOP Biointeractomics 17-20 Mayıs 2016. Poster bildiri olarak basıldı ve sunuldu.
3. F. G. Avcı, C. Velioglu, E. Recber, C. Unsal, G. Gulsoy, B. Sariyar Akbulut. Evaluation of roemerine as a multidrug resistance pump inhibitör. 41st FEBS Congress, Kuşadası-TURKEY. Poster bildiri olarak kabul edilip basıldı ancak kongre iptal oldu.
4. D. Ayyıldız, F. G. Avcı, K. Y. Arga, B. Sariyar Akbulut (-)-Roemerine limits carbohydrate uptake which leads to alternative nutrients as acetyl-CoA sources 41st FEBS Congress, Kuşadası-TURKEY Kısa sözlü sunum olarak kabul edilip basıldı ancak kongre iptal oldu.
5. Ayyıldız D, Budeyri-Gökgöz N, Sariyar-Akbulut B. Effect of (-)-roemerine on the RND-type efflux pumps of *E. coli*. FEBS, Berlin, 2015. Poster bildiri olarak basıldı ve sunuldu.
6. Nilay Budeyri Gokgoz, Berna Sariyar Akbulut. The alkaloid (-)-roemerine blocks carbohydrate uptake in *Escherichia coli*. FEBS, Berlin, 2015. Poster bildiri olarak basıldı ve sunuldu.
7. Fatma Gizem Avcı, Berna Sariyar Akbulut. Effect of Three Aporphine Alkaloids on *Bacillus subtilis* 168. 29th Annual Symposium of the Protein Society, Barselona. Temmuz 2015. Poster bildiri olarak basıldı ve sunuldu.

8. Nilay Budeyri Gokgoz, Katharina Wozny, Dilek Kazan, Britta Brügger, Berna Sariyar Akbulut. Getting an insight into the antibacterial activity of the plant derived alkaloid (-)-roemerine against *E. coli* cells. FEBS-EMBO, Paris, 2014. Poster bildiri olarak basıldı ve sunuldu.

7.2.3 Tamamlanan/Devam Eden Tezler

1. Nilay Budeyri Gokgoz. Understanding the response of bacteria to plant origin antimicrobial alkaloid roemerine using biosystem engineering tools. Marmara Üniversitesi Doktora tezi. Tamamlandı (2015).

2. Dilara Ayyıldız. Transcriptional changes in *E. coli* upon treatment with roemerine. Marmara Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi. Tamamlandı (2016).

3. Fatma Gizem Avc. Investigation of Aporphine Alkaloids for Their Antimicrobial Activities. Marmara Üniversitesi Doktora tezi. Devam ediyor.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. BERNA SARIYAR AKBULUT
Proje No:	113M052
Proje Başlığı:	Antimikrobiyel Ajanların Etkisini Anlamak İçin Sistem Biyolojisi Yaklaşımı İle Birleştirilmiş OMİK Verilerin Analizi
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	NİHAT ALPAGU SAYAR, DİLEK KAZAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	MARMARA Ü. MÜHENDİSLİK F. BİYOMÜHENDİSLİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/02/2014 - 01/08/2017
Onaylanan Bütçe:	467780.0
Harcanan Bütçe:	351501.8
Öz:	Bu proje aporfin sınıfına ait farklı alkaloitlerin antibakteriyel mekanizmalarının proteom ve lipidom çalışmaları ile anlaşılmasını ve yeni ilaç adayları olarak değerlendirilebilmesini hedeflemektedir. Bu hedef doğrultusunda incelenmek üzere (-)-römerin, boldin ve bulbokapnin olmak üzere üç farklı alkaloit belirlenmiş ve model mikroorganizma olarak da Escherichia coli ve Bacillus subtilis seçilmiştir. Bu üç alkaloidin seçilmesinin en önemli nedeni hepsinin aporfine sınıfına ait olmaları ve yapısal olarak birbirlerine yüksek benzerlik göstermeleridir. Alkaloitlerin olası etkilerinin anlaşılması doğrultusunda öncelikle çalışma konsantrasyonunun seçilebilmesi için büyüme eğrileri çıkarılmış ve canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Ayrıca B. subtilis stres koşullarında spor oluşturduğu için, çalışılan konsantrasyonda bu bakterinin spor oluşturmamış olmasına dikkat edilmiştir. 100 µg mL⁻¹ (-)-römerin varlığında E. coli hücrelerinde genel olarak hücre içi karbonhidrat varlığını kısıtlanmakta ve hücre porinleri azalmaktadır. Ozmotik denge ile ilgili ciddi bir değişiklik olmamıştır. 75 µg mL⁻¹ (-)-römerin varlığında B. subtilis hücrelerinde ise yine hücre içi karbon akışı azalırken stres proteinlerinde önemli bir artış kaydedilmiştir. Ayrıca her iki bakteri için de çoklu ilaç direnç pompalarının önemi gözardı edilmemelidir. Bu iki model bakteride (-)-römerin varlığındaki lipidom değişikliklerini bakıldığında ise, lipid dağılımlarında önemli farklılaşmalar kaydedilmiştir. (-)-Römerin varlığında hücre zarındaki taşıyım proteinlerindeki farklılaşma da lipid dağılımındaki farklılaşma ile uyumludur. Diğer taraftan boldine ve bulbokapninin yüksek konsantrasyonlarında bile E. coli ve B. subtilis hücrelerinde belirgin bir aktivite gözlemlenmemiştir. Bu doğrultuda (-)-römerinin yeni bir antibakteriyel ilaç adayı olarak değerlendirilmesi önerilebilir.
Anahtar Kelimeler:	E. coli; B. subtilis; aporfin alkaloitler; antibakteriyel; lipidom; proteom; yolaklar analizi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Transcriptomic analysis displays the effect of roemerine on the motility and nutrient uptake in Escherichia coli (Makale - İndeksli Makale), 2- Proteomics Evidence for the Activity of the PutativeAntibacterial Plant Alkaloid (-)-Roemerine:Mainstreaming Omics-Guided Drug Discovery (Makale - İndeksli Makale), 3- Proteomics Evidence for the Activity of the PutativeAntibacterial Plant Alkaloid (-)-Roemerine:Mainstreaming Omics-Guided Drug Discovery (Makale - İndeksli Makale), 4- Effect of (-)-roemerine on the RND-type efflux pumps of E. coli (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 5- Getting an insight into the antibacterial activity of the plant derived alkaloid (-)-roemerine against E. coli cells (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 6- UNDERSTANDING THE RESPONSE OF BACTERIA TO PLANT ORIGIN ANTIMICROBIAL ALKALOID (-)-ROEMERINE USING BIOSYSTEM ENGINEERING TOOLS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Doktora Tezi), 7- Effect of Three Aporphine Alkaloids on Bacillus subtilis 168 (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),