

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**REKOMBİNANT MRKD PROTEİNİNİN FİBROBLAST
HÜCRESİNE VE KOLAJENE ADEZYONDAKİ ROLÜNÜN
BELİRLENMESİ**

Asya Gülistan ORBAYOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN

Bu tez 2210-C öncelikli alanlara yönelik yurtiçi yüksek lisans bursu kapsamında 1649B022405104 numara ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

AYDIN-2025

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans çerçevesinde Asya Gülistan ORBAYOĞLU tarafından hazırlanan “Rekombinant MrkD Proteininin Fibroblast Hücrelerine Ve Kolajene Adezyondaki Rolünün Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/08/2025

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN	Aydın Adnan	
		Menderes Üniversitesi	
Üye	: Doç. Dr. Erman ORYAŞIN	Aydın Adnan	
		Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN	Akdeniz Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi, tecrübe ve engin birikimiyle bana her zaman güven veren, sadece bir danışman değil, aynı zamanda yol gösterici ve ilham kaynağı olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a en içten şükranlarımı sunarım.

Her zaman bir hocadan fazlası olarak sorularımı sabırla yanıtlayan, akademik gelişimime büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Asude Gülçe ORYAŞIN'a teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında yanımda olan, beni sabırla dinleyen, moral kaynağı olan ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili arkadaşım Melis YALÇIN'a minnettarım.

REDPROM Laboratuvarında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Abdulkerim KARAYNİR, Rümeysa Gülsu ÖZKAN, Sahd ALİ, Utku KURTKAYA, Hanife Salih DOĞAN, Yunus DOĞAN ve üç yıllık yüksek lisans eğitimimde bana yol arkadaşlığı yapan tüm dostlarıma teşekkür ederim. Bu süreçte doğrudan ya da dolaylı şekilde emeği geçen, bana katkı sunan ve yolumu aydınlatan tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve dostlarıma en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Lisans dönemimden bu yana her zaman yanımda olan can dostum Eda ÇETİN'e ve yüksek lisans eğitimine birlikte başladığım kıymetli arkadaşım Aslıhan KÜÇÜK'e verdikleri destek için ayrıca teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde yol gösterici olan, her adımda yanımda olan, her daim destekleriyle beni güçlü kılan sevgili aileme; annem Bircan ORBAYOĞLU, babam Mehmet ORBAYOĞLU, dayım Ercan UYSAL ve kuzenim İsmail Can UYSAL'a sonsuz teşekkür ederim. Onların sevgisi, sabrı ve desteği olmasaydı bu noktaya gelmem mümkün olamazdı.

TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na

Teşekkür Ederim

Asya Gülistan ORBAYOĞLU

Asla başarmaktan korkmayan güçlü kadınlara....

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY.....	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.ESKAPE Patojenleri	3
2.2. <i>K. pneumoniae</i>	4
2.2.1. Tarihçesi ve Taksonomisi	4
2.2.1. Morfolojisi	5
2.2.3. <i>K. pneumoniae</i> 'nin Virülans Faktörleri	6
2.2.4. Epidemiyolojisi	10
2.3. <i>K. pneumoniae</i> enfeksiyon kaynaklı hastalıkları:	12
2.3.1.1. Tedavisi ve Antibiyotik direnci.....	13
2.4. Tedavi Yaklaşımlarında Adezyon Mekanizmalarının Hedeflenmesi	14
2.4.1. Adezyon Proteinleri.....	14
2.4.2. Adezyon ve Enfeksiyon Arasındaki İlişki	15
2.5.MrkD Adezini:	16
2.6.Rekombinant DNA Teknolojileri	17
2.GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20

3.1.1. Cihazlar.....	20
3.1.2. Besiyerleri Çözeltiler ve Tamponlar	21
3.2. Yöntem	26
3.2.1 <i>K. pneumoniae</i> mrkD genine spesifik primer tasarımı.....	26
3.2.2. mrkD Geninin PZR ile Çoğaltılması ve Elektroforez	28
3.2.3. mrkD Geninin pET30-a(+) Plazmidine Klonlanması.....	29
3.2.3.1. Restriksiyon	29
3.2.3.2. Presipitasyon	30
3.2.3.3. Ligasyon	30
3.2.3.4. Kompetan Hücresinin Hazırlanması	31
3.2.3.5. Transformasyon.....	31
3.2.3.6. İnsert Alan Rekombinant Plazmidleri İçeren Kolonilerin Seçimi ve Doğrulanması ..	32
3.2.3.7. Sekans Analizi.....	32
3.2.4. Protein Analizi	32
3.2.4.1. Rekombinant MrkD proteinin indüklenmesi ve SDS-PAGE jel ile gösterilmesi	32
3.2.4.2. rMrkD'nin <i>E.coli</i> BL21 hücrelerinde kültürlenmesi	33
3.2.4.3. IMAC yöntemi ile rMrkD'nin Saflaştırılması ve SDS-PAGE ile Gösterilmesi	34
3.2.4.4. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	34
3.2.5. Tip V Kolajen ve rMrkD Proteinini Arasındaki Etkileşimin ELISA ile Doğrulanması ...	35
3.2.6.1. Fibroblast BJ Hücre Hattının Kültürlenmesi	36
3.2.6.2. Hücre Canlılığı Testi	36
3.2.6.3. MrkD Proteininin Fibroblast BJ Hücrelerine Bağlanmasının <i>K. pneumoniae</i> Bağlanmasına Etkisi.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. mrkD genin PZR sonucu	38
4.2. mrkD amplikonun pET30a-(+) vektörüne klonlanması ve transformasyonu.....	39
4.3.1.İnsert alan rekombinant plazmidleri içeren kolonilerin seçimi ve doğrulanması	40

4.3.2.T7 primerleri PZR kurulması ve DNA Dizi Analizi ve Karşılaştırma Sonucu	41
4.3.3.Şematik olarak MrkD'nin pET30a-(+) vektörüne klonlanması.....	43
4.4.1.rMrkD'nin protein ekspresyonu sonucu	44
4.4.2.rMrkD'nin IMAC yöntemi ile saflaştırılması sonucu	45
4.5. Tip V Kolajen ve rMrkD Proteini Arasındaki Etkileşimin ELISA ile İncelenmesi	45
4.6.BJ Fibroblast Hücre Hattının Kültürlenmesi	48
4.6.1.Thoma Lamı Kullanılarak Hücrelerin Sayılması	49
4.6.2.Hücre Canlılığı Testi	49
4.6.1 MrkD Proteininin Fibroblast BJ Hücrelerine Bağlanmasının <i>K. pneumoniae</i> Bağlanmasına Etkisinin İncelenmesi	52
5.TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR.....	63
BİLİMSEL ETİK BEYANI	73
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Ammonium persulfate
Bç	: Baz Çifti
BLAST	: Basic Logal Alignment Search Tool
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonukleazid Trifosfat
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
Gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromotography
HRP	: Horse Raddish Peroxidase
HvKp	: hipervirulan <i>K. pneumoniae</i>
IMAC	: İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografi
IPTG	: İzopropil β-d-1-tiogalaktopiranosid
L	: Litre
LB	: Luria Bertani Broth
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
mL	: mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür

NCBI	: National Center For Biotechnology Information
PBS	: Fosfat Buffer Salin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TSA	: Trypto-Casein Soy Agar
TSB	: Trypto-Casein Soy Broth
WHO	: Word Health Organization
YT	: Yeast Trypton

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>K. pneumoniae</i> 'nin morfolojisi :	6
Şekil 2. <i>K. pneumoniae</i> 'nin ana virülans faktörlerinin şematik gösterimi	7
Şekil 3. Biyofilmin gelişimi ve dağılmasına yol açan beş ana fazın şematik gösterimi.	9
Şekil 4. Tip 3 fimbriyanın yapısal bileşenlerini kodlayan genler	10
Şekil 5. hvKp'nin yayılımı	11
Şekil 6. <i>K. pneumoniae</i> (Kp) enfeksiyonlarının anatomik yerleşim bölgeleri.....	12
Şekil 7. Rekombinant DNA Teknolojileri	19
Şekil 9 Bradford grafiği	35
Şekil 10 MrkD proteinin indüklenmesinin SDS-PAGE ile gösterimi	44
Şekil 11 Saflaştırma sonrası elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE ile gösterimi.	45
Şekil 13 ELISA sonuçlarının grafik olarak gösterimi	46
Şekil 14. MrkD'nin Tip V Kolejenle Etkileşim seviyelerinin ELISA ile ölçümünün ortalaması	47
Şekil 12. MrkD'nin BJ Fibroblast Hattına Karşı Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	51

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. mrkD geninin lokasyonu	17
Resim 2 <i>K. pneumoniae</i> ait <i>mrkD</i> gen dizisi	27
Resim 3 mrkD geni üzerinde yer alan restriksiyon enzimleri kesim bölgeleri	27
Resim 4 pET-30a (+) üzerindeki klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon kesim bölgeleri	28
Resim 5 mrkD geni PZR sonucu agaroz jelde görüntüsü.	38
Resim 6 mrkD ampikonu ve pET-30 a (+) vektörünün EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesim sonucu	39
Resim 7 Tranformasyon Sonucu Petri Görüntüsü.....	39
Resim 8 Koloni PZR metodu ile mrkD ampikonlarını taşıyan kolonilerin elektroforez sonucu	40
Resim 9 Kolonilerden elde edilen plazmitlerin enzimler ile kesim sonucu agaroz jel görüntüsü.	41
Resim 10 Rekombinant MrkD dizisine ait sekans sonucu	42
Resim 11. mrkD genin pET30-a(+) plazmidine klonlanmasının şematik olarak gösterilmesi	43
Resim 12 Bj Fibroblast hücrelerinin 400X mikroskop görüntüsü	48
Resim 13 Bj Fibroblast hücre sayımı için kullanılan Thoma Lamı görüntüsü	49
Resim 14 LB-Agar besiyerine ekilen dilüsyonlar, PBS uygulanan kontrol grubu	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>K. pneumoniae</i> taksonomisi	5
Tablo 2 . PZR Reaksiyonun hazırlanma oranları	29
Tablo 3 Kesim reaksiyonun hazırlanma oranları	29
Tablo 4. Ligasyon reaksiyon hazırlanma oranları.....	30
Tablo 5 T7 primerlerinin gen sekansları	32
Tablo 6 SDS-PAGE hazırlanması için gerekli ürünler ve oranları	33
Tablo 7 ELISA Deney Grupları	36
Tablo 8. MrkD'nin Tip V kolejenle Etkileşim seviyelerinin ELISA ile ölçümü	46
Tablo 9. MrkD'nin Tip V Kolejenle Etkileşim seviyelerinin ELISA ile ölçümünün ortalama değerleri.....	47
Tablo 10. BJ Fibroblast hücre hattına MrkD ve PBS uygulama sonrası OD450 ölçümü	50
Tablo 11. BJ Fibroblast hücre hattına MrkD uygulama sonrası yüzde olarak hücre canlılığı	50
Tablo 12 Bakteriyel adezinleri hedefleyen tedavi yaklaşımları.....	56

ÖZET

REKOMBİNANT MRKD PROTEİNİNİN FİBROBLAST HÜCRESİNE VE KOLAJENE ADEZYONDAKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

**Orbayoğlu, A. G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Moleküler Biyoteknoloji, Yüksek Lisans tezi Aydın, 2025**

Amaç: Bu tezde, rekombinant olarak üretilen MrkD proteininin insan fibroblast hücreleri ve kolajenle olan etkileşimi moleküler düzeyde incelenmiş, bu proteinin potansiyel terapötik hedef olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Rekombinant DNA teknolojisi ile *K. pneumoniae*'nin *mrkD* geninin çoğaltılması için primerler tasarlanmış ve çoğaltılan gen pET30a(+) ekspresyon vektörüne klonlanmıştır ardından *E. coli* BL21 hücrelerine transforme edilmiştir. MrkD proteini IMAC yöntemi ile saflaştırılmış, fibroblast hücre hattına karşı sitotoksitesi ve *K. pneumoniae*'nin hücreye bağlanabilme potansiyelindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca MrkD proteininin Tip V kolajen ile olan etkileşim değerleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Bulgular: Saflaştırılan MrkD proteininin boyu 40.8 kDa olarak hesaplanmıştır. MrkD proteinin tip V kolajen ile etkileşim gösterdiği ELISA yöntemi ile doğrulanmıştır. Proteinin BJ fibroblast hücrelerine dair herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı Wst-1 yöntemi ile belirlenmiştir. MrkD proteini *K. pneumoniae*'nin Bj hücrelerine bağlanma potansiyelini yaklaşık 0,85 log azaltmıştır.

Sonuç: Bu çalışma kapsamında, BJ insan fibroblast hücreleriyle MrkD proteini arasında gerçekleşen etkileşim ilk kez deneysel olarak ortaya konmuş ve protein yapısının sitotoksik potansiyeli doğrudan analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların, MrkD proteininin kolajenle ilişkisini açıklığa kavuşturması ve tedavi hedefi olabilecek yapılar için yol gösterici olması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: *K. pneumoniae*, *MrkD*, *Adezin*, *Rekombinant DNA Teknolojileri*

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF THE ROLE OF RECOMBINANT MRKD PROTEIN IN ADHESION TO FIBROBLAST CELLS AND COLLAGEN

Orbayoğlu, A. G. (2025). Master's Thesis, Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Department of Molecular Biotechnology, Aydın, Turkey.

Objective: The present study aimed to investigate, at the molecular level, the interaction of recombinant MrkD protein with human fibroblast cells and type V collagen, and to evaluate its potential as a therapeutic target.

Material and Method: The *mrkD* gene from *K. pneumoniae* was amplified using specifically designed primers and cloned into the pET30a(+) expression vector, followed by transformation into *E. coli* BL21 cells. The recombinant MrkD protein was purified using IMAC. Its cytotoxicity on BJ human fibroblast cells was assessed via the WST-1 assay, and its impact on bacterial adhesion capacity was determined. In addition, ELISA assays were employed to evaluate the interaction between MrkD and type V collagen.

Results: The molecular weight of the purified recombinant MrkD protein was determined to be approximately 40.8 kDa. ELISA analyses confirmed the specific interaction between MrkD and type V collagen. WST-1 assay results indicated that MrkD exhibited no cytotoxic effects on BJ fibroblast cells. Furthermore, the presence of recombinant MrkD protein was associated with a reduction of approximately 0.85 log in the adhesion of *K. pneumoniae* to fibroblast cells.

Conclusion: This study provides the first experimental evidence demonstrating the specific interaction between recombinant MrkD protein and human fibroblast cells. It also directly evaluates the cytotoxic potential of MrkD. The findings offer new insights into the collagen-binding capacity of this adhesin and suggest that MrkD may serve as a promising target for anti-adhesion therapeutic strategies against *K. pneumoniae* infections.

Keywords: *K. pneumoniae*, MrkD, Adhesin, Recombinant DNA Technologies

1. GİRİŞ

Bakteriyel enfeksiyonlar, küresel sağlık sistemlerinde önemli morbidite ve mortaliteye neden olan yaygın enfeksiyonlardır. Solunum, idrar, dolaşım, gastrointestinal ve sinir sistemleri gibi çok çeşitli anatomik bölgelerde enfeksiyonlara yol açabilen bu mikroorganizmalar, bağışıklık sisteminin işlevlerini hedef alarak ciddi klinik tabloların gelişmesine neden olabilmektedir (Paczosa & Mecsas, 2016). Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde veya invaziv tıbbi girişimlerin uygulandığı hastane ortamlarında enfeksiyonların kontrolü daha da zorlaşmaktadır. Bu özellikleri en iyi şekilde temsil eden bakteri grubu, literatürde “ESKAPE patojenleri” olarak bilinmektedir. ESKAPE kısaltması, altı önemli patojenin baş harflerinden oluşmaktadır. Bunlar: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* spp’dir. (Rice, 2008; Panda ve diğerleri,, 2022). Bu bakteriler, özellikle hastane kaynaklı (nosokomiyal) enfeksiyonların çoğundan sorumlu olup, tedaviye direnç ve bağışıklık sisteminden kaçış yetenekleri nedeniyle ciddi halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Son yıllarda, özellikle karbapenem ve kolistin gibi antibiyotiklere karşı gelişen direnç bakteriyel enfeksiyonların tedavisini giderek zorlaştırmaktadır (Tacconelli ve diğerleri,2018). 2017’de bir rapora göre Avrupa’daki bakteriyemi vakalarının yaklaşık %45’inden *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakteri türlerinin sorumlu olduğu ve *Klebsiella* spp’nin bu oranda önemli bir role sahip olduğu bildirilmektedir. (ECDC, 2018). *Klebsiella* türleri, özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda giderek artan prevalansa sahiptir; ventilatörle ilişkili pnömoni, kateterle ilişkili üriner sistem enfeksiyonları ve nozokomiyal sepsis gibi durumlarda sıklıkla izole edilmektedir (Martin & Bachman, 2021). Antibiyotik direnci ile hipervirülansın birleşimi, *K. pneumoniae* cinsini enfeksiyon kontrolü ve tedavi açısından kritik bir hedef haline getirmiştir (Zhu ve diğerleri,2021). Bir enfeksiyonun başlayabilmesi için, hastalığa neden olan bakterinin önce vücuttaki epitel hücrelerin yüzeyine tutunması ve ardından daha derin doku veya organlara ilerlemesi gerekmektedir. Enfeksiyonun ilk adımı, belirli bakteriyel yüzey yapıları ile onlara özgü konak hücre yüzeyleri arasında gerçekleşen adezyon etkileşimidir. Fimbrial adezinler, bakterilerin yüzeyinden dışarıya doğru uzanan ipliksi yapılar olan fimbriaların (veya pili) ucunda yer almaktadır. Bu ipliksi yapılar, konak hücrelerin yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanarak bakterinin tutunmasını sağlamaktadır (Hakansson ve diğerleri,2018). Her bir

fimbria, ardışık yapı proteinlerinden oluşmakta olup ucunda genellikle bir veya birkaç adezin yer almaktadır. Bu adezinler, bağlanma özgülüğü sayesinde bakterinin belirli doku veya organlara tropizm göstermesinde etkilidir (Krachler & Orth, 2013).

Enfeksiyon tedavisinde bakterinin henüz hücre yüzeyine tutunmadan önce müdahale etmek oldukça etkili bir stratejidir. Bu amaçla geliştirilen antiadezyon tedavi yaklaşımları, enfeksiyonu henüz başlamadan engellemeye odaklanmaktadır. Bakterilerin konak hücreye tutunmasını hedef alan bu modern tedavi stratejileri, özellikle antibiyotiklere dirençli bakteri türleriyle mücadelede oldukça önemli bir alternatif haline gelmektedir. Enfeksiyonun ilk adımını engellemek, tüm süreci durdurmanın en etkili yollarından biridir. Yapılan çalışmada *K. pneumoniae*'nin fimbrial adezini olan MrkD rekombinant olarak üretilmiş olup *K. pneumoniae* bakterisinin insan hücre hattına ve kolajene olan bağlanma kapasitesi saptanmıştır. Bu çalışma *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisine yönelik adezyon inhibitörlerine dayalı yeni stratejilerin geliştirilmesinde temel oluşturması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ESKAPE Patojenleri

Günümüzde hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir kısmı, artan antibiyotik direnciyle karakterize edilen belirli bir grup patojen tarafından oluşturulmaktadır. Bu bakteriler, “ESKAPE” kısaltması ile anılmakta olup *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türlerini kapsamaktadır. (Miller ve diğerleri,2024) Bu mikroorganizmalar, mevcut antibakteriyel tedavilere karşı kaçış mekanizmaları geliştirmeleri nedeniyle bu adla anılmaktadır (Mulani ve diğerleri,2019). ESKAPE patojenleri, Dünya Sağlık Örgütü tarafından öncelikli tehdit kategorisine alınmıştır. Her biri kendine özgü direnç profilleri sergileyerek, küresel sağlık açısından ciddi bir endişe kaynağı oluşturmaktadır (Tacconelli, 2017. Bu bakteriler, antimikrobiyal tedavilerden etkili şekilde kaçmalarını ve yüzeylere sıkı şekilde tutunmalarını sağlayan biyofilm oluşturma yetenekleri başta olmak üzere, mücadeleyi zorlaştıran çeşitli özelliklere sahiptir (Dale, ve diğerleri,2015). Ayrıca, enfeksiyonların virülansını artıran çeşitli enzimler ve toksinler üretirler (Aloke ve Achilonu, 2023). Bunun yanı sıra, farklı çevresel koşullara hızla uyum sağlama ve bakteriyel konjugasyon ile plazmit transferi gibi genetik mekanizmalar yoluyla direnç genlerini değiştirme konusundaki dikkat çekici yetenekleri, bu patojenlerle mücadeleyi daha da karmaşık hale getirmekte; bu da bulaşıcı hastalıkların kontrolü alanında önemli bir engel oluşturmaktadır (Roque-Borda ve diğerleri,2024)

ESKAPE patojenlerinin temel ortak özelliği, çeşitli direnç mekanizmalarını etkin bir şekilde kullanabilmeleridir. Bu bakteriler antibiyotiklerin yapısını bozan β -laktamaz enzimleri gibi enzimlerle antibiyotikleri inaktive edebilir, antibiyotik hedeflerini değiştirebilir ya da aktif efüls sistemleriyle antibiyotikleri hücre dışına atabilirler (Patil ve diğerleri,. 2022). Aynı zamanda, biyofilm oluşturarak hem konak bağışıklığından hem de antibakteriyel ajanlardan korunurlar. Bu biyolojik savunma yapıları, özellikle kalıcı enfeksiyonların gelişmesinde önemli rol oynar (Mulani ve diğerleri,2019; Bhukta, ve diğerleri, 2022.). Söz konusu patojenlerin neden olduğu dirençli enfeksiyonlar, ciddi morbidite ve mortalite oranlarıyla ilişkilidir. Bu nedenle, geleneksel antibiyotiklere ek olarak yeni ve etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda geliştirilen yaklaşımlar arasında antimikrobiyal peptitler,

bakteriyofaj terapileri, anti-virölans ajanlar, immünoterapi ve CRISPR-Cas tabanlı genetik mühendislik uygulamaları dikkat çekmektedir (Mulani ve diğerleri,2019).

Anti-virölans stratejiler özellikle önem kazanmaktadır çünkü bu yaklaşımlar bakterilerin hayatta kalma yeteneklerini değil, enfeksiyon oluşturma kapasitelerini hedef alır. Bu, seçici basınç oluşturmada direnç gelişimi riskini azaltabilecek bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

2.2. *K. pneumoniae*

K. pneumoniae, *Enterobacteriaceae* ailesine ait, Gram-negatif, kapsüllü, hareketsiz ve çubuk şeklinde bir bakteri türüdür (Douradinha, 2024). İlk olarak 1882 yılında Carl Friedländer tarafından zatürreden ölen hastaların akciğerlerinden izole edilen bir bakteri olarak tanımlanmıştır. *Enterobacteriaceae* ailesine ait olup, sağlıklı insan ve hayvanların gastrointestinal mikrobiyotasında doğal olarak bulunan bir mikroorganizmadır (Fliss ve diğerleri,2022). Gram negatif enfeksiyonların yaklaşık üçte birinden sorumlu olan bu bakteri, yaygın bir fırsatçı ve hastane kaynaklı patojen olarak öne çıkmaktadır. Normalde insan gastrointestinal sisteminde kommensal olarak yer alan *K. pneumoniae*, fırsatçı bir patojen olarak ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Douradinha, 2024). İdrar yolu enfeksiyonları, sistit, pnömoni, cerrahi yara enfeksiyonları, endokardit ve sepsis gibi yaşamı tehdit eden çeşitli bağırsak dışı enfeksiyonlarda rol oynamaktadır. Ayrıca, nekrotizan pnömoni, piyojenik karaciğer apseleri ve endojen endoftalmi gibi ciddi toplum kökenli enfeksiyonların da önemli etkenlerinden biridir (Chang, ve diğerleri,2021).

2.2.1. Tarihçesi ve Taksonomisi

K. pneumoniae, ilk olarak 1882 yılında Alman mikrobiyolog Carl Friedländer tarafından keşfedilmiştir. Friedländer, pnömoni hastalarının akciğerlerinden izole ettiği bu kapsüllü bakteri türünü detaylı bir şekilde tanımlamış ve bu bakterinin zatürre (pnömoni) etkeni olabileceğini öne sürmüştür. Bu nedenle *K. pneumoniae* uzun yıllar “Friedländer basil”i olarak da anılmıştır (Friedländer, 1882; Podschun & Ullmann, 1998). Bakteri daha sonra Avusturyalı patolog Edwin Klebs’in adını alarak, taksonomik olarak *K.* cinsine dahil edilmiştir. 1970’li

yıllardan itibaren nozokomiyal enfeksiyonlarda artan bir şekilde izole edilen bu bakteri, antibiyotik direnci geliştirmesiyle dikkat çekmeye başlamıştır. (Jacoby & Medeiros, 1991). 2000’li yılların başından itibaren ise *K. pneumoniae*’nin hem klasik (klKp) hem de hipervirulent (hvKp) suşlarının varlığı ortaya konmuş, hipervirulent türlerin Asya kökenli olduğu ve karaciğer apsesi, endoftalmi gibi sistemik enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmiştir (Yong ve diğerleri 2009; Shon, 2013;).

Tablo 1. *K. pneumoniae* taksonomisi (NCBI,2024)

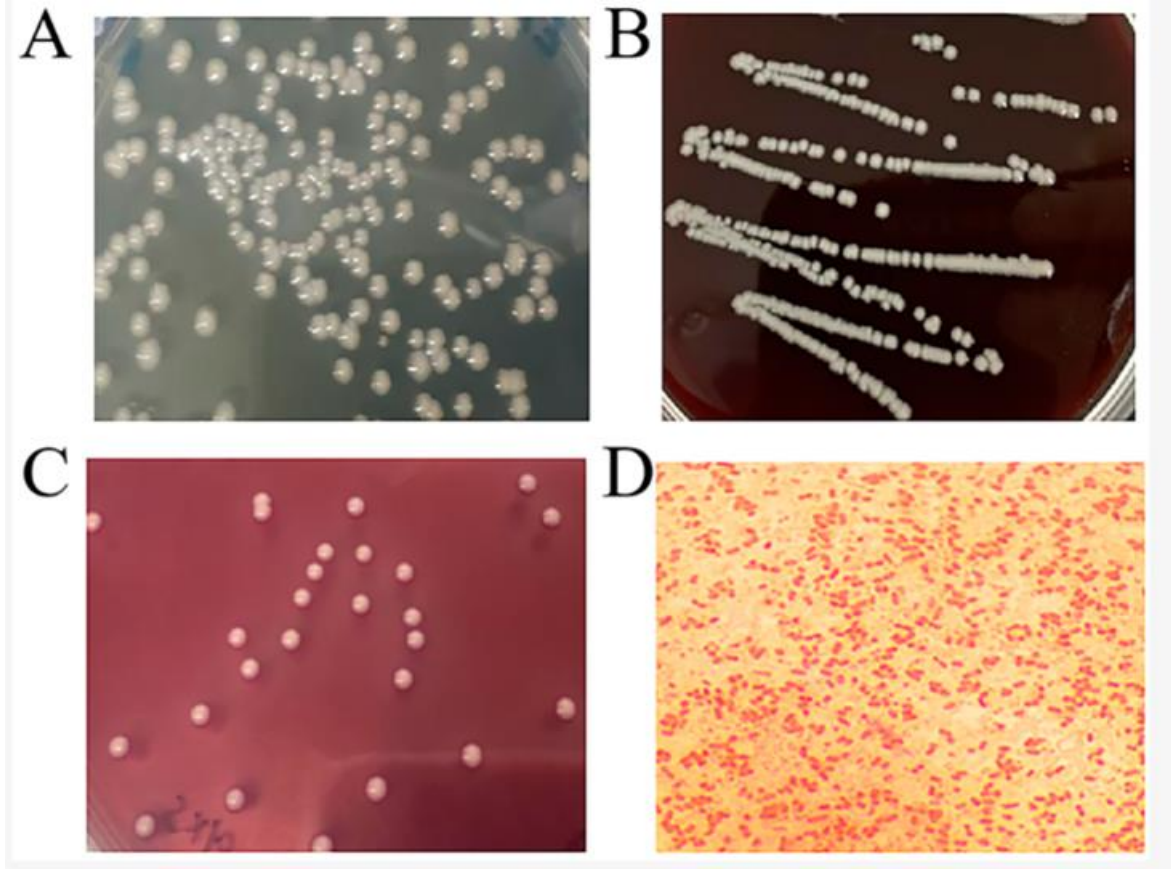
Taksonomik Düzey	Sınıflandırma
Domain (Âlem)	Bacteria
Phylum (Şube)	Proteobacteria
Class (Sınıf)	Gammaproteobacteria
Order (Takım)	Enterobacterales
Family (Aile)	Enterobacteriaceae
Genus (Cins)	Klebsiella
Species (Tür)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

K. pneumoniae, bakteriyel taksonomiye göre Bakteri âlemine, Proteobakteri şubesine, Gammaproteobakteri sınıfına, Enterobacterales takımına ve *Enterobacteriaceae* ailesine ait bir türdür. *Klebsiella*. cinsi içinde yer almaktadır (Tablo 1). (NCBI,2024)

2.2.1. Morfolojisi

K. pneumoniae, Enterobacteriaceae ailesine ait, Gram-negatif, çubuk şeklinde (basil) bir bakteri türü olmakla beraber ortalama 0.5–0.8 µm çapında ve 1.0–2.0 µm uzunluğunda çubuk biçimli morfolojiye sahiptir. *K. pneumoniae*’yi diğer bakterilerden ayıran en belirgin özelliklerinden biri, kalın polisakkarit kapsül ile çevrili olmasıdır (Martin & Bachman, 2021). Bu kapsül, bakteri virülansında önemli bir rol oynamaktadır. Bakteri kapsülü dolayısıyla konağın bağışıklık sisteminden kaçınabilmektedir. Kapsül varlığı, aynı zamanda gram boyama veya kapsülün spesifik boyalarla muamelesi ile mikroskop altında da gösterilebilir. *K. pneumoniae*, hareketsiz bir bakteri olup flagella taşımaz (Alasedi ve diğerleri,2021). Bu durum, Enterobacteriaceae ailesindeki hareketli türlerden ayırt edilmesini kolaylaştırır. Ayrıca spor oluşturmaz ve genellikle fakültatif anaerobik bir yaşam biçimi sergiler, yani oksijen varlığında ya da yokluğunda büyüyebilir. Besiyerlerinde kolaylıkla ürer; özellikle MacConkey agar gibi

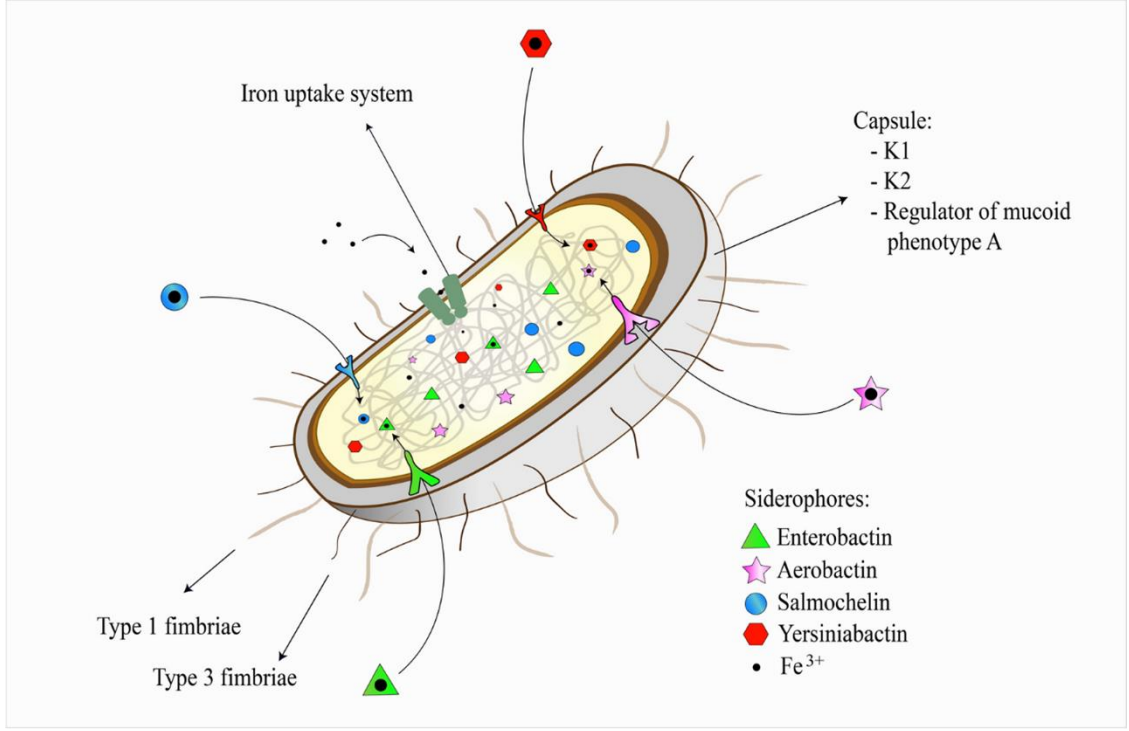
seçici besiyerlerinde laktoz pozitif olması nedeniyle pembe-kırmızı koloniler oluşturur. (Podschun & Ullmann, 1998).



Şekil 1. *K. pneumoniae*'nin morfolojisi : (A) TSA'da koloni morfolojisi. (B) Kanlı agarda koloni morfolojisi. (C) McConkey agarda koloni morfolojisi. (D) *K. pneumoniae*'nin Gram boyama mikroskopik morfolojisi, 100×. (Wang,F 2022)

2.2.3. *K. pneumoniae*'nin Virülans Faktörleri

Virülans faktörleri, bakterilerin konak organizma içinde yerleşmesini, çoğalmasını ve yayılmasını sağlayan ayrıca konak bağışıklık sisteminden kaçmalarına ya da baskılamalarına yardımcı olan yapısal ve moleküler araçlar olarak tanımlanmaktadır (Mendes ve diğerleri,2023). *K. pneumoniae*, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilen, kapsüllü bir Gram-negatif bakteridir. Bu bakterinin hastalık yapıcı gücü, sahip olduğu çeşitli virülans faktörlerinden kaynaklanır.



Şekil 2. *K. pneumoniae*'nin ana virülans faktörlerinin şematik gösterimi (Monteiro, 2024)

K. pneumoniae 'nin ana virülans faktörleri; kapsül polisakkarit, lipopolisakkarit (LPS), demir tutucu sistemler (siderforlar), Tip I ve Tip III fibrillar olarak bildirilmiştir (Monteiro, 2024).

Kapsül Polisakkaritleri (CPS)

Kapsül polisakkaritleri (CPS), bakteriyi bağışıklık sisteminden koruyan en önemli yapılardan biridir. Özellikle K1 ve K2 serotipleri, hipervirülen suşlarda daha baskındır (Paczosa ve Mecsas, 2016; Zhu ve diğerleri 2021).. Kapsül üretimi, *rmpA* ve *rmpA2* genleriyle kontrol edilir ve bu genlerin yüksek ekspresyonu bakterinin daha saldırgan hale gelmesini sağlamaktadır (Martin & Bachman, 2018).

Lipopolisakkarit (LPS)

Lipopolisakkarit (LPS) yapısı, bağışıklık sistemiyle etkileşimde önemli rol oynar. LPS'nin Lipid A kısmı şiddetli inflamasyonu tetiklerken, O-antijeni kompleman sisteminden kaçışı kolaylaştırır. Bu yapı, bakterinin sepsise neden olma potansiyelinde önemli bir etkidir (Raetz & Whitfield, 2002; Paczosa & Mecsas, 2016).

Sideroforlar

Sideroforlar, bakterinin yaşamını sürdürebilmesi için gerekli demiri konaktan çekmesini sağlamaktadır.

Başlıca sideroforlar:

- ✓ Enterobaktin
- ✓ Aerobaktin
- ✓ Yersiniabaktin ve Salmochelin

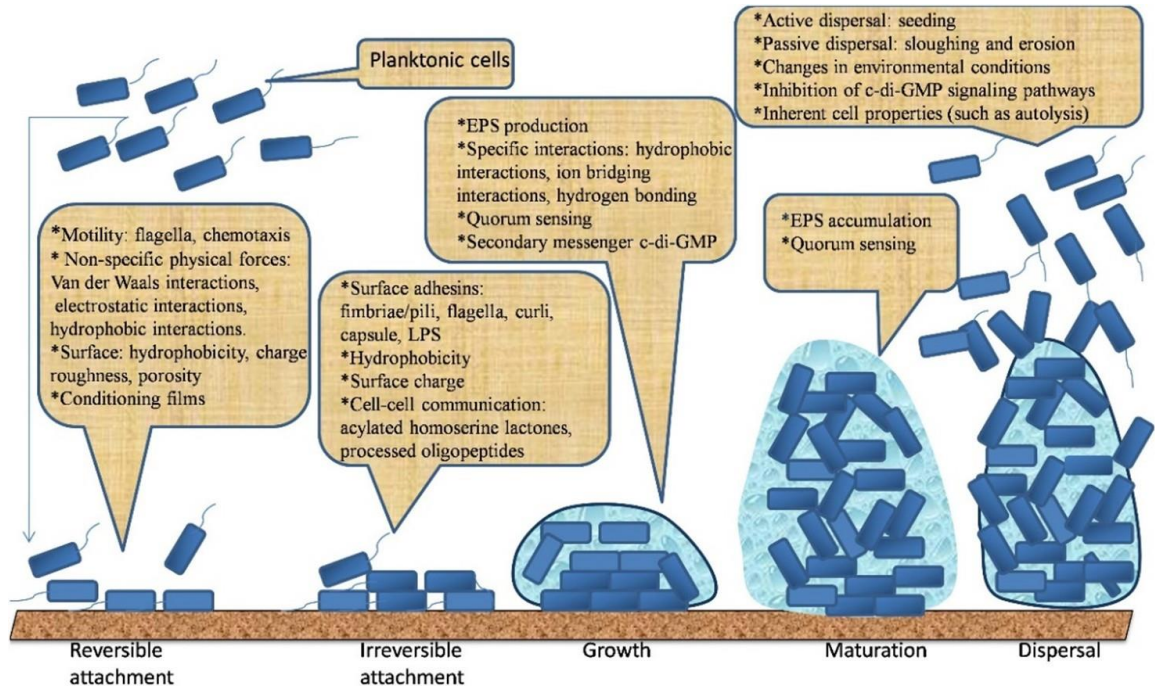
Enterobaktin, en yüksek demir bağlama kapasitesine sahip molekül olup genellikle klasik suşlarda görülürken, aerobaktin ve yersiniabaktin özellikle hipervirülan suşlarda yaygındır. Bu sideroforlar, konak savunma moleküllerini bypass ederek bakterinin invazif potansiyelini artırır (Zhu ve diğerleri,2021; Shokri ve diğerleri, 2023).

Biyofilm

Bakteriler, çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı hayatta kalabilmek amacıyla biyofilm adı verilen koruyucu topluluk yapılarını oluştururlar. Bu stres faktörleri arasında ultraviyole (UV) radyasyon, kuruma, sınırlı besin kaynakları, aşırı pH değerleri, yüksek sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonları, yüksek basınç ve antimikrobiyal maddeler yer almaktadır. Biyofilm oluşum süreci genellikle beş aşamada gerçekleşir:

1. Geri dönüşümlü yüzey tutunması,
2. Geri dönüşümsüz bağlanma,
3. Ekstraselüler polimerik madde (EPS) üretimi,
4. Olgun biyofilm yapısının oluşumu ve
5. Hücrelerin dağılması.

Bu aşamalar sonucunda bakteriler, dış etkilere karşı korunaklı bir matris içinde organize olur ve antibiyotik direnci gibi avantajlar kazanır (Limoni ve diğerleri,2020).



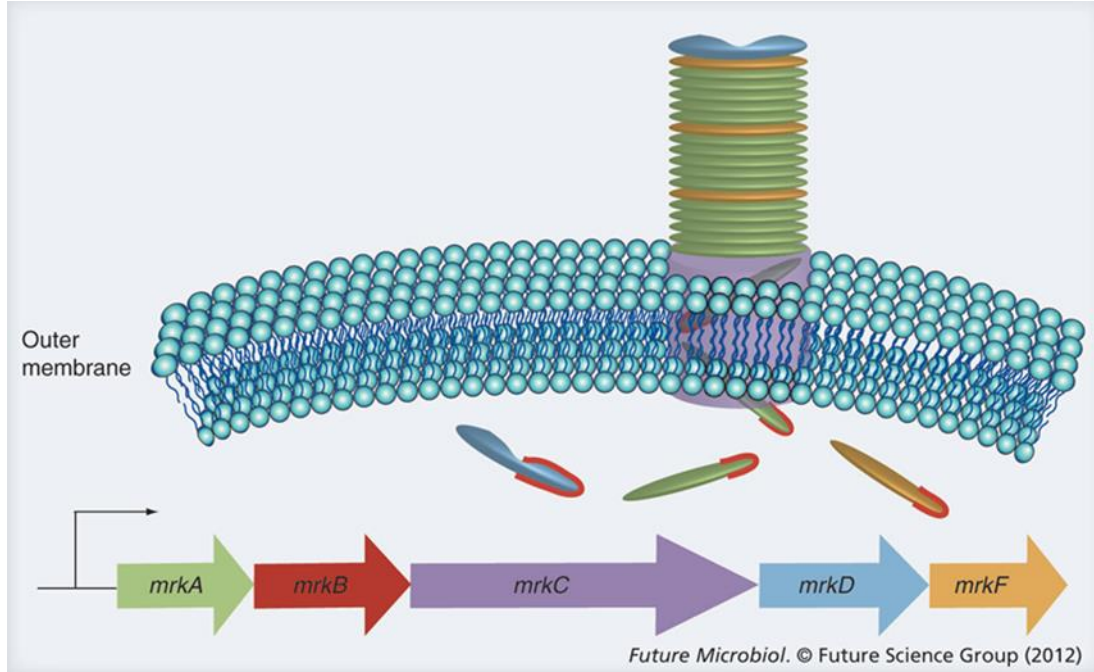
Şekil 3. Biyofilmin gelişimi ve dağılmasına yol açan beş ana fazın şematik gösterimi. (Limoni ve diğerleri,2020)

K. pneumoniae, özellikle tıbbi cihaz yüzeylerinde biyofilm oluşturarak kalıcılığını ve antibiyotik direncini arttırmaktadır. Fimbrial yapılar (özellikle tip 3), kapsül polisakkaritleri ve çeşitli matriks proteinleri biyofilm oluşumunu destekler. Biyofilm ortamındaki bakteriler, serbest yaşayan formlara kıyasla 10 ila 1000 kat daha dirençlidir (Wang ve ark.,, 2020).

Tip 1 ve Tip 3 Fimbrialar

Fimbrialar, bakterinin yüzeyinde yer alan, kamçısız ve ipliksi yapılar olup, konak hücrelerine tutunmada görev almaktadırlar. *K. pneumoniae*'de iki tip fimbria bulunmaktadır. Bunlar Tip 1 ve Tip 3 fimbrialar olarak tanımlanmaktadır. Tip 1 fimbria, mannoz içeren reseptörlere bağlanma yeteneğine sahiptir ve bu özellik, özellikle idrar yolu enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Struve ve diğerleri,, 2008). Tip 3 fimbria ise tanenle muamele edilmiş eritrositlere bağlanarak aglütinasyona neden olur ve aynı zamanda endotel, solunum ve ürogenital epitel hücrelerine yapışmada görev almaktadır. (Murphy ve diğerleri,2012) Tip 3 fimbrialar, (şaperon/taşıyıcı) sınıfına aittir ve elektron mikroskobu ile yapılan analizlerde, Mrk fimbrialarının 2–4 nm genişliğinde ve 0.5–2 µm uzunluğunda, ince ve esnek lifler şeklinde olduğu gösterilmiştir (Hornick ve diğerleri,1995). mrkABCDF gen kümesi tarafından kodlanır. Bu gen kümesinde:

- ✓ mrkA, temel yapısal fimbrial alt birimini,
- ✓ mrkB ve mrkC, şaperon ve taşıyıcı proteinleri,
- ✓ mrkD, adezin proteinini,
- ✓ mrkF ise fimbriaların stabilizasyonu ya da montajında görevli olduğu düşünülen bir proteini kodlamaktadır.

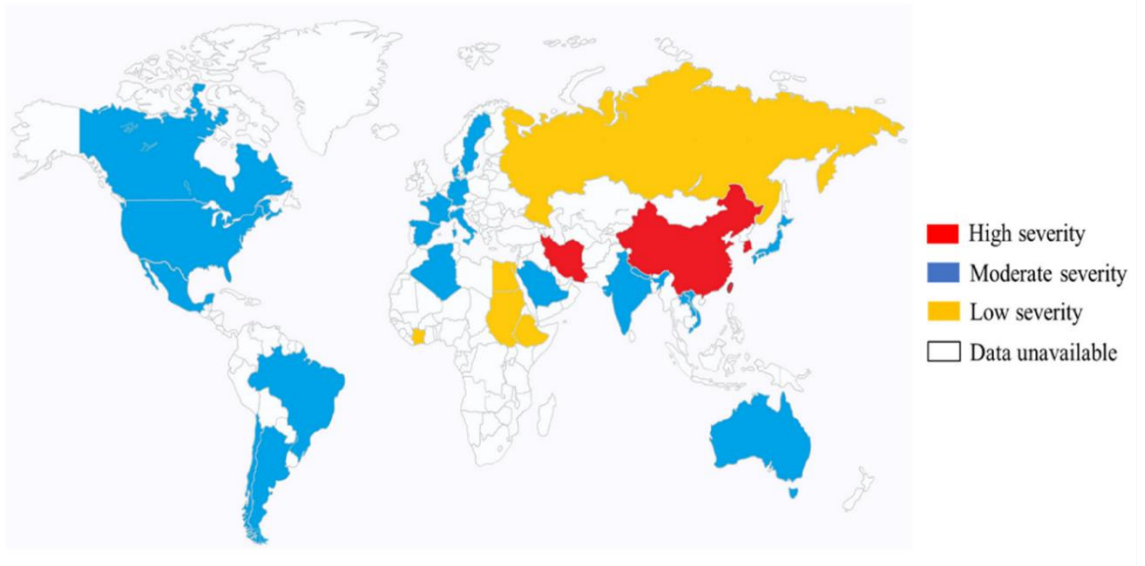


Şekil 4. Tip 3 fimbrianın yapısal bileşenlerini kodlayan genler (Murphy, 2012)

Tip 3 fimbriaların lokalizasyonu için gerekli olan proteinler, Sec taşıma sistemi aracılığıyla periplazmaya taşınmaktadır. Periplazmada, yapısal alt birimler olan MrkA, MrkD ve MrkF, şaperon protein MrkB ile etkileşime girmektedir. Bu şaperon, ilgili proteinleri dış membranda bulunan ve iskele görevi gören MrkC proteinine yönlendirmektedir. MrkC, fimbrial proteinlerin hücre yüzeyinde düzenli olarak birleştirilmesinden sorumludur ve aynı zamanda fimbria üretimi için bir platform görevi görmektedir. Bu fimbrialar, ardışık olarak dizilen MrkA (ana yapı alt birimi) ve aralara serpiştirilmiş MrkF (minör alt birim) proteinlerinden oluşur; MrkD adezin proteini ise, fimbrial uzantının ucunda konumlanmaktadır (Struve, 2013).

2.2.4. Epidemiyolojisi

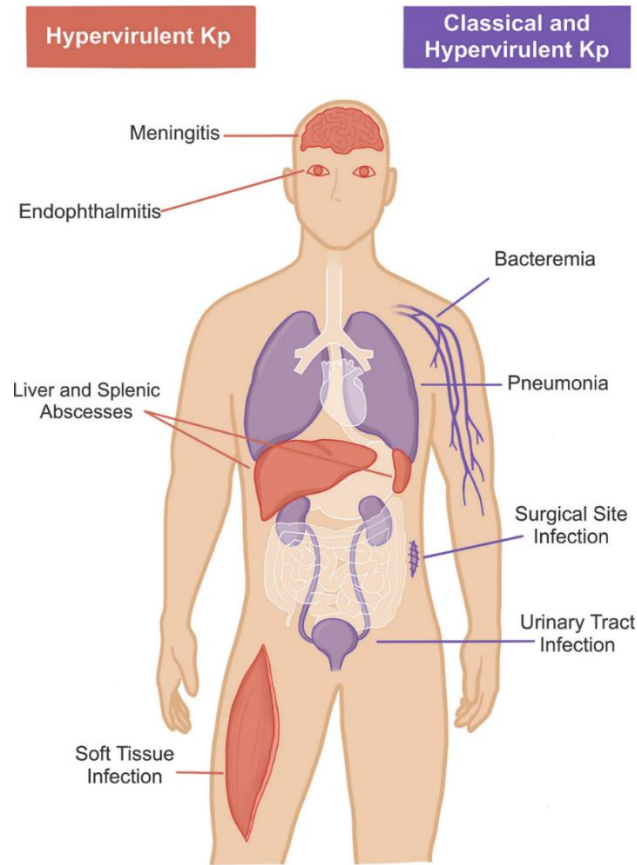
K. pneumoniae, dünya genelinde hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık izole edilen patojenlerden biridir. 2020’de sunulan bir rapora göre Avrupa’daki yoğun bakım ünitelerinde görülen nozokomiyal pnömonilerin yaklaşık %9–12’sinden, kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarının ise %7–9’unun etkeni olarak bildirilmektedir (Martin & Bachman, 2021). Dünya genelinde ve Türkiye’de, özellikle karbapenemaz üreten suşların hızla yayılması, enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir (Telli, 2022; Annals of RSCB, 2025). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “kritik öncelikli patojen” olarak tanımlanan ve yeni antibiyotik geliştirilmesi gereken en tehlikeli bakterilerden biri olarak kabul edilmektedir (WHO, 2017). Aynı zamanda, *K. pneumoniae*’nin biyofilm oluşturma yeteneği, hastane cihazları ve yüzeylerinde kalıcı kolonizasyonu desteklediğinden dolayı bakteri ile mücadele zorlaşmaktadır (Wang ve diğerleri, 2020). *K. pneumoniae*; 2020 yılında Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) hazırlamış olduğu rapora göre ülkemizdeki *K. pneumoniae* suşlarında %39 oranında karpenem direncinin varlığı bildirilmektedir. *Hipervirülant K. pneumoniae* (HvKp), sağlıklı bireylerde bile ağır invaziv enfeksiyonlara neden olabilen yüksek virülansa sahip bir alt tür olarak tanımlanmaktadır (Abbas, ve ark 2024). Hipervirülant 1980’lerde Tayvan’da bildirilen vakalar, sağlıklı bireylerde hipervirulan *K. pneumoniae* (hvKp) kaynaklı karaciğer apseleri ve eşzamanlı menenjit, endoftalmi gibi ciddi komplikasyonları ortaya koymuştur. O tarihten bu yana, özellikle Asya’da yüksek yaygınlıkla, dünya genelinde hvKp vakaları artmaktadır.



Şekil 5. hvKp'nin yayılımı (Abbas, ve diğerleri 2024).

2.3. *K. pneumoniae* enfeksiyon kaynaklı hastalıkları:

K. pneumoniae, hem toplum kökenli hem de hastane ilişkili enfeksiyonların etiolojisinde önemli yer tutan, Gram-negatif, kapsüllü bir fırsatçı patojendir (Effah ve diğerleri, 2020). Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde; akciğer, üriner sistem, kan dolaşımı ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olarak ciddi klinik tablolara yol açabilmektedir (Li ve diğerleri, 2014). Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar, artan antibiyotik direnci ile küresel düzeyde önemli bir halk sağlığı sorunu hâline gelmiştir (Chen ve diğerleri, 2023). Bakteri pnömoni, karaciğer absesi, bakteriyemi, yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları (İYE), endoftalmi ve menenjit gibi çok çeşitli klinik tablolara neden olabilmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda bulaş yolları arasında; hastalar arası doğrudan temas, sağlık personelinin elleriyle çapraz bulaş, steril olmayan tıbbi cihazlar ve kontamine yüzeylerle temas önemli rol oynamaktadır.



Şekil 6. *K. pneumoniae* (Kp) enfeksiyonlarının anatomik yerleşim bölgeleri (Gonzalez-Ferrer ve ark 2021)

Hipervirülan K. pneumoniae enfeksiyonları (Şekil 6) genellikle merkezi sinir sistemi, gözler, karaciğer, dalak ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Klasik *K. pneumoniae* enfeksiyonları ise sıklıkla çoklu antibiyotik direnci geliştirir ve genellikle hastane ortamında ortaya çıkmaktadır.

Her iki form, yani klasik ve *hipervirülan K. pneumoniae*, bakteriyemi, pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalık tablolarına neden olabilmektedir (Gonzalez-Ferrer ve diğerleri, 2021; Kumkar ve diğerleri, 2023). Bu türün diğer Gram-negatif fırsatçı patojenlere kıyasla daha yaygın enfeksiyon etkeni olmasının arkasında; besin yetersizliğine karşı dayanıklılığı doğal antibiyotik direnci diğer bakterilerle rekabet üstünlüğü, insan mikrobiyotası üyeleriyle genetik materyal alışverişi yapabilme kapasitesi ve mobil genetik elemanlar aracılığıyla çok sayıda antibiyotik direnç ve virülans geni kazanma yeteneği gibi mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, ESKAPE patojenleri arasında yer alması ve sıklıkla çoklu ilaç direnci (MDR) göstermesi, bu bakteriyi hem tedavi hem de enfeksiyon kontrolü açısından daha da problematik hâle getirmektedir (Martin ve diğerleri, 2016).

2.3.1.1. Tedavisi ve Antibiyotik direnci

K. pneumoniae, antimikrobiyal direnç kazanma ve bunu hızla yayma kapasitesi nedeniyle küresel sağlık açısından önemli bir tehdit olmaya devam etmektedir. Multidrog dirençli (MDR) ve karbapenem dirençli suşların giderek daha yaygın hale gelmesi, mevcut antibiyotiklerin etkinliğini ciddi biçimde zayıflatmakta ve yeni tedavi yaklaşımlarına olan acil ihtiyacı ortaya koymaktadır (Navon-Venezia, ve ark 2017). Gram-negatif bakteriler, özellikle *K. pneumoniae*, β -laktam antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirme yetenekleriyle dikkat çeker. Bu direnç, yalnızca β -laktamlara değil, aynı zamanda florokinolonlar ve aminoglikozidler gibi diğer antibiyotik sınıflarına da yayılmaktadır (Tacconelli ve diğerleri, 2018). Geniş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) ve karbapenemazlar, üçüncü kuşak sefalosporinlerin ve karbapenemlerin etkinliğini önemli ölçüde azaltmakta ve tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır (Bonomo, 2017). *K. pneumoniae* gibi patojenlerin neden olduğu karbapenem dirençli suşların (CRKP) artışı, özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi klinik sorunlara yol açmaktadır. Bu gibi durumlarda başvuru tedavi seçenekleri; kolistin, fosfomisin, gentamisin gibi ajanlarla monoterapi,

karbapenem içermeyen kombinasyonlar ya da MİK değeri düşük olan karbapenemlerle sinerjistik kombinasyon tedavileri olarak sıralanabilir (Tzouvelekis ve diğerleri,2012). Son yıllarda FDA ve EMA onayı alan seftazidim/avibaktam (CAZ-AVI) kombinasyonu, GSBL, AmpC ve bazı karbapenemazlara karşı etkili bir tedavi seçeneği olarak öne çıkmıştır (van Duin ve Bonomo, 2016). Bu kombinasyon, Enterobacteriaceae ailesine mensup dirençli suşlara karşı geniş spektrumlu aktivite göstermekte ve klinik başarı oranlarını artırmaktadır. Geleneksel antibiyotiklere alternatif olarak, anti-virülans stratejiler de giderek önem kazanmaktadır. Özellikle DsbA/DsbB disülfid bağ sisteminin inhibisyonu, bakteriyel adezin, toksin ve dış membran proteinlerinin doğru katlanmasını engelleyerek virülansı düşürmektedir. Bu yaklaşım, aynı zamanda bakterinin antibiyotiklere karşı duyarlılığını da artırabilmektedir (Ireland ve diğerleri,, 2014). Genel olarak değerlendirildiğinde, klasik antibiyotiklerin yetersiz kaldığı MDR ve XDR bakterilere karşı hem yeni nesil β -laktamaz inhibitör kombinasyonları hem de bakteriyel patojenitenin temel faktörlerini hedefleyen anti-virülans yaklaşımlar umut verici stratejiler sunmaktadır (Mulani ve diğerleri,2019; Carneiro ve ark,2022)).

2.4. Tedavi Yaklaşımlarında Adezyon Mekanizmalarının Hedeflenmesi

2.4.1. Adezyon Proteinleri

Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunarak orada yaşamlarını sürdürebilmeleri için kullandıkları en önemli araçlardan biri, adezin adı verilen özel proteinlerdir. Bu proteinler, bakterilerin ya da diğer mikropların bulundukları ortama sıkıca tutunmasını sağlar. Bu tutunma özelliği özellikle önemlidir çünkü zararlı bakterilerin vücuda veya tıbbi yüzeylere yerleşip enfeksiyona yol açmasını engellemek için bu bağlanmanın hedeflenip durdurulması mümkündür (Guglielmo ve diğerleri,, 2023). Fibriller adezinler, birçok bakteri türü tarafından üretilen ve mikroorganizmaların bağlanma yeteneğini sağlayan önemli yüzey proteinleridir. Bu proteinler, özellikle konak canlıya ait hücre dışı matriks (ECM) proteinleri gibi yapılarla etkileşime girerek bakterilerin yüzeylere tutunmasına aracılık eder (Khan ve ark.,, 2023). Bakterilerin bu şekilde yüzeye bağlanması, zamanla patojenik kolonizasyona ve enfeksiyonlara yol açabilir. Bu nedenle, özellikle tekli fibriller adezinler bilim insanlarının dikkatini çekmiş; ayrıntılı olarak incelenmiş ve antiadezyon temelli tedavi stratejileri geliştirilmesinde hedef

alınmıştır. Çünkü bu yapılar engellendiğinde, bakterilerin konağa tutunması ve enfeksiyon oluşturmaları da büyük ölçüde önlenir.

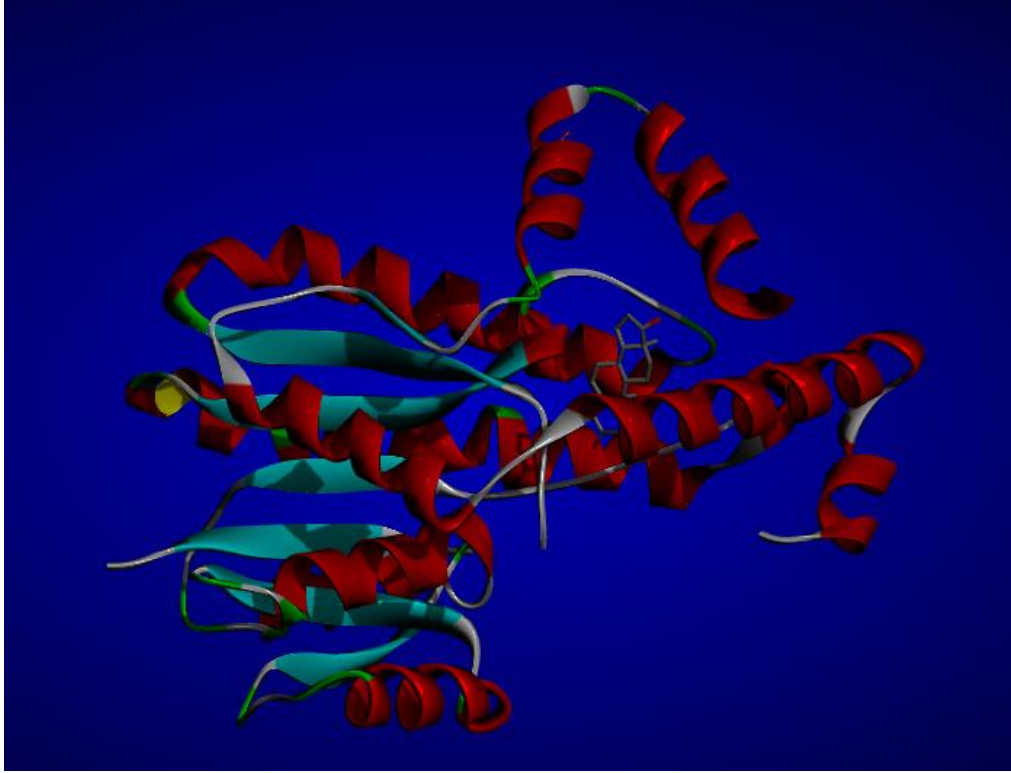
2.4.2. Adezyon ve Enfeksiyon Arasındaki İlişki

Bakteriyel patojenlerin konak organizmalarda enfeksiyon oluşturabilmesi en kritik adımlardan biri olan adezyon, bakteri hücrelerinin konak doku yüzeylerine tutunması olarak tanımlanmaktadır. Adezyon olayı genellikle bakterinin yüzeyinde bulunan adezin adı verilen protein yapıları sayesinde gerçekleşmektedir. Adezinler, konak hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptör molekülleri tanıyarak konak hücrelere bakterilerin tutunmasını sağlamaktadır (Kline ve diğerleri,2009). Böylece bakteri konak hücrede tutunarak, bağışıklık sisteminden kaçabilir ve sonrasında bakterinin enfeksiyon oluşturmaları ise kolaylaşmaktadır. Adezyon sadece enfeksiyonun başlamasını değil, aynı zamanda patojenin invazyon, immün yanıtta kaçınma ve antibiyotiklere direnç kazanma gibi ileri evrelerini de etkilemektedir. Bu sebeplerden dolayı bakteriyel adezyon mekanizmalarının anlaşılması hem enfeksiyonların patogenezi açısından hem de yeni tedavi hedeflerinin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır (Hultgren ve diğerleri,, 2006)

Konak Hücrelere Tutunmada Fimbrial Proteinlerin Rolü

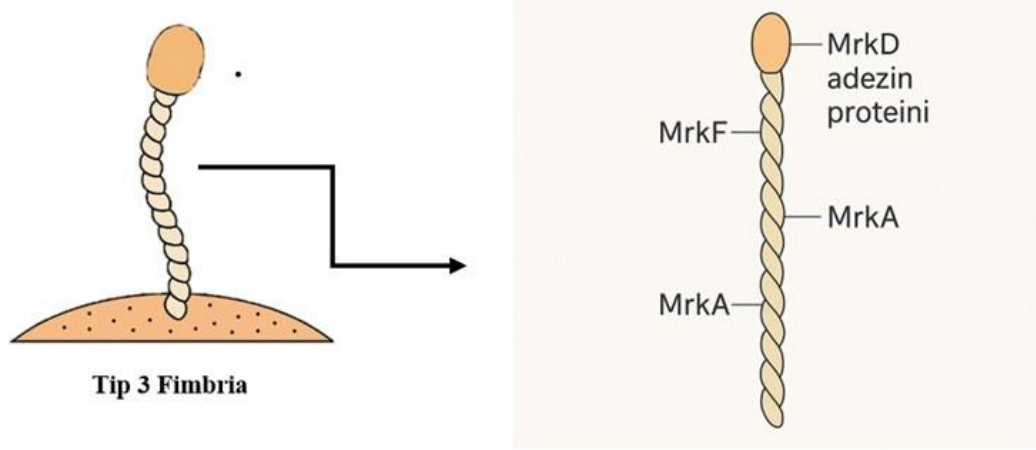
Fimbrialar, bakteriyel dış zar üzerine yerleşmiş, çubuk benzeri bir iskeletten ve bu yapının ucunda bulunan özel adezin proteinlerinden oluşmaktadır. Uç bölgede bulunan bu adezinler, konak hücre üzerindeki özgül reseptörlere bağlanmaktadır. (Proft & Baker, 2009). Bakterilerin konak hücrelere veya yüzeylere tutunması, bakterinin hayatta kalması ve enfeksiyon oluşturabilmesi açısından oldukça önemli bir faktördür. Özellikle konak hücrelere veya hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerine tutunma, patojen mikroorganizmaların doku kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır (Monzon ve Bateman, 2022).

2.5. MrkD Adezini:



Şekil 1. Discovery Studio 2019 ile çizilen tahmini MrkD proteini 3B yapısı

MrkD proteini, *K. pneumoniae* tarafından ifade edilen Tip 3 fimbriaların uç bileşenidir ve bakterinin konak dokulara yapışmasında (adezyon) görev alan bir adezin proteinidir (Li, ve ark 2010). Bu protein, özellikle biyofilm oluşumu, doku kolonizasyonu ve enfeksiyon sürecinde kritik rol oynamaktadır (Alwan, ve Abass, 2016). MrkD proteini, 29–31 kDa büyüklüğünde olup, fimbrial altbirimlerden farklı olarak fimbrial yapının en uç kısmında yer alır. Genellikle bir β -sandwich yapıya sahiptir ve lektin benzeri bir bağlanma bölgesi içerir. Bu bağlanma bölgesi sayesinde çeşitli konak moleküllerini, özellikle tip IV ve tip V kolajenleri, tanıyarak onlara bağlanabilir. Yapısal analizler (ör. homoloji modelleme, cryo-EM ve X-ray kristalografi çalışmaları) MrkD'nin, fimbrial yapıların stabilitesini koruduğu gibi, spesifik bağlanma motifleri içerdiğini de göstermektedir.



Resim 1. *mrkD* geninin lokasyonu

Stahlhut ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada *mrkD* lokusunun tüm *K. pneumoniae* izolatlarının neredeyse %95'inde çoğaltılabildiğini ve bu izolatların tip 3 fimbriaların varlığını göstermekte olduğunu bildirmektedir (Stahlhut ve diğerleri,2013). *K. pneumoniae*'nin en uç kısmında bulunan ve bağlanma işlevini yürüten MrkD lokusu, özellikle N-terminal bölgesinde kolajen V'e bağlanmayı sağlayan özgül bir alan bulunduğu görülmektedir; bu bölge literatürde “reseptör bağlanma bölgesi” ya da MrkDrd olarak adlandırılır. C-terminal kısmı ise fimbrial shaftla bağlantı kurar (Bellifa ve diğerleri, 2013).

2.6. Rekombinant DNA Teknolojileri

Rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi, farklı organizmalara ait genetik materyallerin laboratuvar ortamında birleştirilerek yeni DNA molekülleri oluşturulmasını ve bu moleküllerin konak organizmalara aktarılmasını temel alan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Bu teknoloji, ilk kez 1970'li yıllarda Paul Berg, Stanley Cohen ve Herbert Boyer tarafından geliştirilmiş olup, günümüzde genetik mühendisliğinin temel taşı haline gelmiştir (Watson ve diğerleri,2020).

Son yıllarda yaşanan biyoteknolojik ilerlemeler, rekombinant DNA teknolojisinin daha hassas, hızlı ve güvenilir hale gelmesini sağlamıştır. CRISPR-Cas9 sistemi gibi genom düzenleme teknikleri ile birlikte kullanıldığında, genetik manipülasyonlar artık sadece model organizmalarla sınırlı kalmayıp, insan hücrelerinden mikroorganizmalara kadar geniş bir yelpazede uygulanabilir hale gelmiştir (Doudna & Charpentier, 2014).

Güncel olarak rDNA teknolojisi; sağlık, tarım, endüstri ve çevre alanlarında geniş uygulama alanlarına sahiptir:

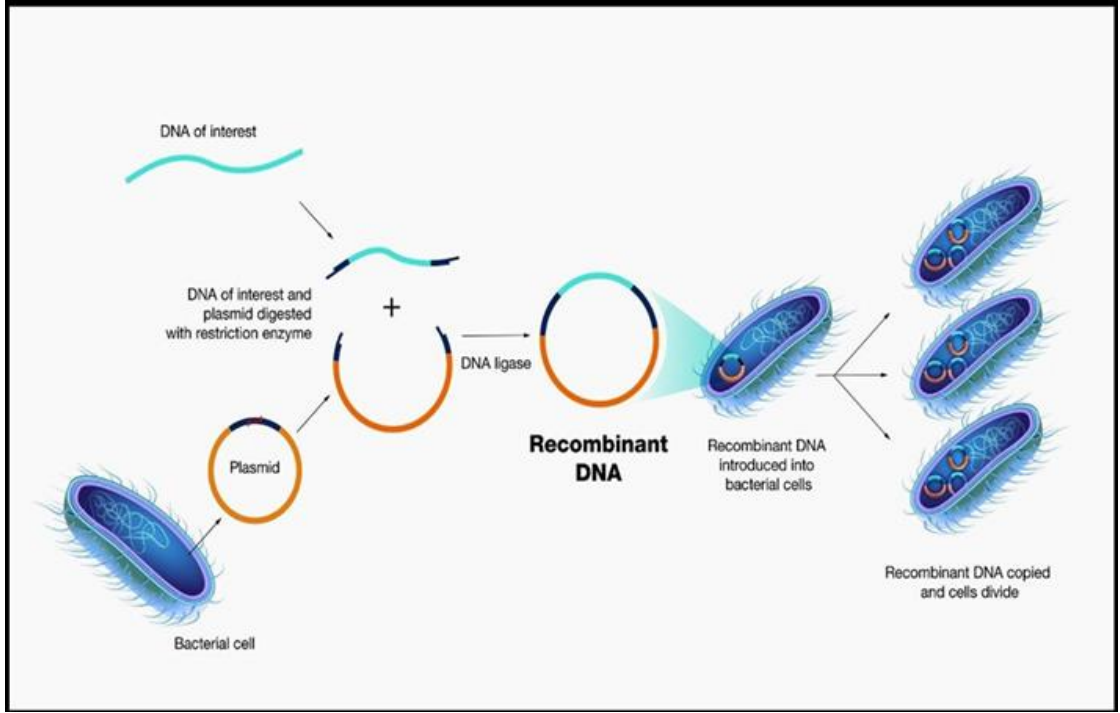
Sağlık alanında, rekombinant protein üretimi (örneğin insülin, büyüme hormonu, interferonlar), monoklonal antikorlar ve rekombinant aşılar (örneğin HPV ve hepatit B aşıları) bu teknolojinin temel uygulamaları arasında yer alır (Walsh, 2018). Ayrıca, kanser ve genetik hastalıkların tedavisinde hedefe yönelik moleküllerin tasarımı da kullanılmaktadır.

Tarım sektöründe, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar) aracılığıyla böceklerle, hastalıklara ve herbisitlere dirençli bitkilerin geliştirilmesi mümkün olmuştur. Bu yaklaşım, verimlilik artışı sağlarken çevresel sürdürülebilirliği de desteklemektedir (ISAAA, 2023).

Endüstriyel biyoteknolojide, mikroorganizmaların rekombinant enzimler üretmesi sayesinde biyoyakıtlar, biyoplastikler ve çevre dostu deterjanlar gibi pek çok ürün üretilmektedir. Özellikle E. coli ve Saccharomyces cerevisiae gibi sistemler, rekombinant ekspresyon için sıklıkla tercih edilmektedir (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Çevresel biyoteknolojide, ağır metal ve toksik madde detoksifikasyonunda kullanılmak üzere rekombinant mikroorganizmaların geliştirilmesi, kirlenmiş alanların biyoremediasyonunda yeni çözümler sunmaktadır (Singh ve diğerleri,2022).

Bu teknoloji sayesinde istenilen bir gen, bir taşıyıcı vektöre (genellikle plazmid) klonlanarak uygun bir konak hücreye aktarılır ve burada ifade ettirilerek rekombinant protein elde edilir. Genellikle bu süreç, genetik materyalin izolasyonu, restriksiyon enzimleriyle kesilmesi, ligasyon ile vektöre bağlanması, konak hücreye transformasyonu ve sonrasında ürünün elde edilmesi gibi temel adımlardan oluşur (Watson ve diğerleri,2020).



Şekil 7. Rekombinant DNA Teknolojileri (Ahmed, S., ve Riaz, M. 2020).

1.Gen klonlaması ve rekombinant DNA'nın geliştirilmesi: Kaynaktaki yabancı DNA (ilgi duyulan gen) enzimatik olarak kesilerek rDNA üretmek için klonlama vektörüne (plazmid vb.) aktarılmaktadır.

2. Vektörün konakçıya transferi: rDNA içeren klonlama vektörü bir konakçı hücreye transfer edilir ve içinde tutulur. rDNA'yı bir konakçı hücreye sokma yöntemine transformasyon denir.

3. Dönüştürülmüş hücrelerin (konakçı) seçimi: rDNA'yı alan konakçı hücreler tanınır ve havuzdan seçilir.

4. Eklenen genin transkripsiyonu ve translasyonu: Gerekliyse, klonlanmış DNA dizisi tarafından kodlanan protein ürününün konakçı hücre tarafından üretildiğini doğrulamak için bir rDNA yapısı formüle edilebilir (Ahmed, S., ve Riaz, M. 2020).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Thermal Cyclers (LONGGENE A300):

PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek ve gen bölgelerini çoğaltmak için kullanıldı.

Thermo Shaker (MSC-100 Thermo Shaker Incubator):

Reaksiyonlar sırasında gerekli sıcaklığı sağlamak amacıyla kullanıldı.

Elektroforez Cihazı (Thermo Electron Corporation EC330):

DNA örneklerini boyutlarına göre ayırmak için kullanıldı.

Otoklav (Hirayama HV-50L):

Besiyeri ve kimyasalların steril edilmesi için kullanıldı.

Distile Su Cihazı (Sartorius Arium Pro):

Deneylerde kullanılmak üzere saf su üretilmek için kullanıldı.

Santrifüj (Hettich MIKRO 200):

Bakteri çöktürmek ve DNA izolasyonu işlemlerinde kullanıldı.

Sonikatör / Homojenizatör (BANDELİN SONOPULS):

Hücreleri parçalamak için kullanıldı.

Etüv (Mettler Incubator Oven INB200):

Bakteri kültürlerinin inkübasyonunu için kullanıldı.

Hücre Kültürü Steril Kabin (ESCD Class II BSC):

Hücre kültürlerinde steril çalışma ortamı için kullanıldı.

pH Metre (HANNA Instruments HI2211):

Çözeltilerin pH değerini ölçmek için kullanıldı.

Hassas Terazı (KERN ABJ-220-4NM):

Çözelti hazırlarken hassas miktar ölçümleri yapıldı.

3.1.2. Besiyerleri Çözeltiler ve Tamponlar**Trypton-Kazein Soy Agar (TSA)**

12 g TSA (Biokar, Fransa) hassas terazide tartılıp 300 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır. 121 °C’de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilip steril petri kaplarına aktarılmıştır. Bu besiyeri, stok bakteri suşlarını aktiveştirmek amacıyla kullanılmıştır.

Trypton-Kazein Soy Broth (TSB)

9 g TSB (Biokar, Fransa), 300 mL distile suda çözülmüş ve 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sıvı ortamda bakteri çoğaltımı için kullanılmıştır.

EcoRI ve HindIII Restriksiyon Enzimleri

EcoRI ve HindIII (10 U/μL, Thermo Scientific) enzimleri, FastDigest buffer ile birlikte plazmit ve genomik DNA’dan hedef gen bölgelerini kesmek amacıyla kullanılmıştır.

SDS Stok Solüsyonu

100 g SDS distile su içerisinde çözülerek 1 L’ye tamamlanmış ve pH 6.6’ya ayarlanmıştır. SDS-PAGE jel hazırlığında kullanılmıştır.

Separasyon Buffer

18.25 g Tris Base 40 mL distile suda çözülüp pH 8.8’e ayarlanmış ve 50 mL’ye tamamlanmıştır. SDS-PAGE jelinde separasyon jelinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Stacking Buffer

3 g Tris Base 10 mL distile suda çözülüp pH 6.8’e ayarlanarak 50 mL’ye tamamlanmıştır. SDS-PAGE jelinin stacking kısmı için hazırlanmıştır.

Sample Buffer (Numune Yükleme Tamponu)

Çeşitli bileşenler karıştırılarak hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. Protein örneklerinin jel öncesi hazırlanmasında kullanılmıştır.

Running Buffer

- Glisin: 7,2 g
- Tris: 1,5 g
- SDS (%10): 10 mL

500 mL'ye tamamlanarak pH:8,3'e ayarlanmıştır. Tris Base, glisin ve SDS içeren çözelti 1 L'ye tamamlanarak elektroforez koşulları için uygun çalışma tamponu hazırlanmıştır.

Destaining Solüsyonu

100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL distile su karıştırılarak jel boyasını uzaklaştırmak için kullanılmıştır.

Coomassie Brilliant Blue Boyama Solüsyonu

Coomassie boyası, metanol, glasiyel asetik asit ve distile su ile çözülerek jel boyama işlemi için hazırlanmıştır.

2X YT (Yeast Extract-Trypton) Ortamı Hazırlığı

Protein ekspresyon çalışmalarında, hedef rekombinant bakterilerin yüksek yoğunlukta üretimi için 2X YT ortamı kullanılmıştır. Bu ortam, aşağıdaki içeriklerin 1 L distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı:

- 16 g Trypton
- 10 g Maya özütü (Yeast extract)
- 5 g NaCl

Hazırlanan karışım, 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edildi.

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi

75 mg APS 5 mL distile suda çözülerek jel polimerizasyonu için taze hazırlanmıştır.

TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Tamponu

10X stok solüsyon hazırlanmış, ardından 0.5X kullanım tamponu elde edilmiştir. DNA elektroforezi uygulamalarında kullanılmıştır

Skim Milk (%10):

Skim milk tozu distile suyla %10'luk çözeltisi hazırlanmış, 110°C'de 5 dakika sterilize edilmiştir. Bakteri izolatlarının -20 ve -80°C'de saklanması için kullanılmıştır.

EDTA (0,5 M):

186,1 g EDTA, 800 mL distile suda çözülerek pH:8'e NaOH ile ayarlanmış, 1 L'ye tamamlanıp sterilize edilmiştir.

Tris-HCl (1 M, pH 7.4):

121 g Tris Base, HCl ile pH 7,4'e ayarlanarak 1 L'ye tamamlanmış, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

NaCl (5 M):

146,1 g NaCl 500 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

%1 Agaroz Jel:

Agaroz: 1 g

0,5X TBE: 100 mL

Safeview: 10 µL

Agaroz, TBE içinde mikrodalgada eritilmiş ve 50-60°C’de Safeview eklenerek jel tablasına dökülmüştür.

DNA Marker Hazırlığı:

PstI enzimi ile kesilmiş λ DNA marker olarak kullanılmıştır. Hazırlanan karışım 37°C’de 1 saat inkübe edilip, 30 μ L yükleme boyası eklenmiştir.

TE Tamponu:

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA

İzole edilen DNA ve RNA’nın çözülmesinde kullanılmıştır.

CaCl₂ ve MgCl₂ (1 M):

İlgili hidratlar distile suda çözülerek 121°C’de otoklavlanmıştır. Transformasyon işlemlerinde seyreltme sonrası kullanılmıştır.

%10 ve %80 Gliserol:

Transformasyon ve SDS-PAGE yükleme tamponlarında kullanılmıştır.

SDS-PAGE için Jel Tamponları ve Bileşenleri:

Ayırma ve yoğunlaştırma jellerinin hazırlanmasında Tris-HCl (pH 8,8 ve 6,8), %10 SDS, %10 APS, TEMED, akrilamid-bisakrilamid karışımı kullanılmıştır. Gliserol, bromfenol mavisi ve β -merkaptoetanol içeren 2X Laemmli tamponu örneklerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Protein Standardı:

10 mg/mL BSA stokundan, 0,05–1 mg/mL aralığında standartlar hazırlanmıştır.

IMAC Tamponları:

Protein saflaştırma işlemlerinde lizis, yıkama ve elüsyon için hazırlanmış tamponlar; NaCl, NaH₂PO₄ ve imidazol içermekte, pH:8'e ayarlanarak kullanılmaktadır.

PBS ve PBS-T:

PBS tabletleri ile hazırlanan çözelti pH:7,4'e ayarlanmış ve sterilize edilmiştir. PBS-T (PBS + %0,05 Tween-20) ise ELISA yıkama tamponu olarak kullanılmıştır.

Luria-Bertani (LB) Broth

Maya ekstraktı 5,0 g/L; pepton 10,0 g/L; NaCl 10,0 g/L olacak şekilde yeterli miktarda distile su ile çözdürüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi: 25 mg

Sükroz: 4 g

H₂O:10 ml Karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

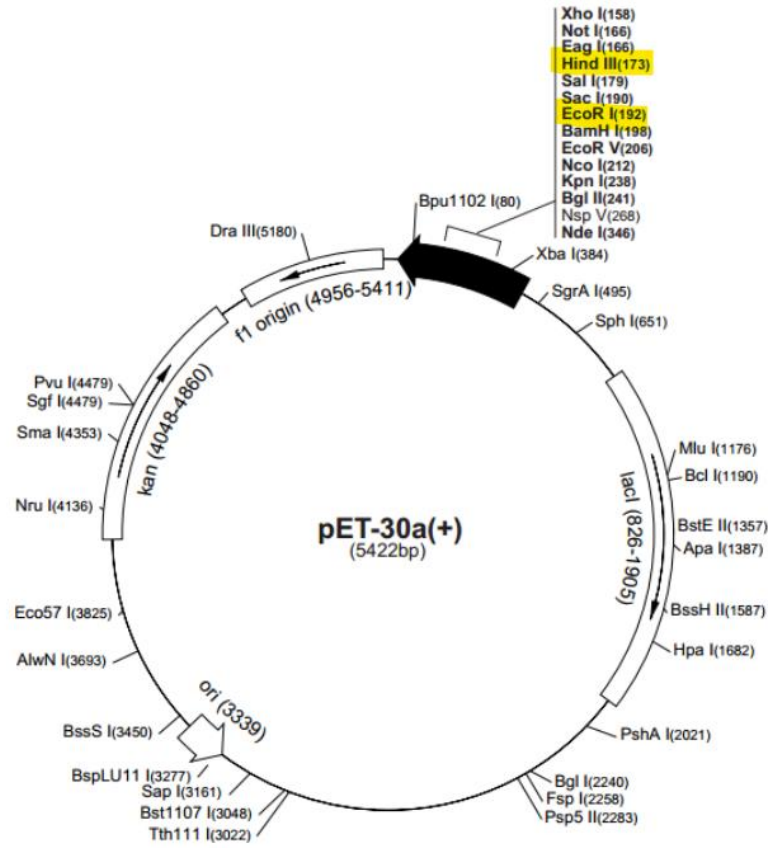
3.2.1 *K. pneumoniae* mrkD genine spesifik primer tasarımı

PZR için kullanılacak primerler <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> GenBank veritabanında bulunan *K. pneumoniae* izolatına ait *mrkD* geni kullanılarak tasarlanmıştır (Resim 2). *mrkD* geni üzerindeki kesim bölgeleri (Resim 3) ve klonlamada kullanacağımız pET30-a(+) plazmidi üzerindeki kesim bölgeleri (Resim 4) araştırılmış ve dizayn edilen primere restriksiyon enzim kesim bölgeleri eklenmiştir. Klonlacak *mrkD* geninin içerisinden kesmediği ve pET30-a(+) yer aldığı için primerler EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimlerine göre tasarlanmıştır. (Resim 3-4)

type 3 fimbria adhesin subunit MrkD [*K.K. pneumoniae*]

```
LOCUS       KF777787                996 bp    DNA        linear    BCT 27-NOV-2013
DEFINITION   Klebsiella pneumoniae strain 128 MrkD (mrkD) gene, complete cds.
ACCESSION    KF777787
VERSION      KF777787.1
KEYWORDS     .
SOURCE       Klebsiella pneumoniae
  ORGANISM   Klebsiella pneumoniae
             Bacteria; Pseudomonadati; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria;
             Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Klebsiella/Raoultella group;
             Klebsiella; Klebsiella pneumoniae complex.
REFERENCE    1 (bases 1 to 996)
AUTHORS      Stahlhut,S.G., Chattopadhyay,S., Kisiela,D.I., Hvidtfeldt,K.,
             Clegg,S., Struve,C., Sokurenko,E.V. and Krogfelt,K.A.
TITLE        Structural and Population Characterization of MrkD, the Adhesive
             Subunit of Type 3 Fimbriae
JOURNAL      J. Bacteriol. 195 (24), 5602-5613 (2013)
PUBMED       24123820
REFERENCE    2 (bases 1 to 996)
AUTHORS      Stahlhut,S.G., Chattopadhyay,S., Kisiela,D.I., Hvidtfeldt,K.,
             Struve,C., Clegg,S., Sokurenko,E.V. and Krogfelt,K.A.
TITLE        Direct Submission
JOURNAL      Submitted (08-OCT-2013) Department of Microbiology and Infection
             Control, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, Copenhagen S 2300,
             Denmark
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..996
                       /organism="Klebsiella pneumoniae"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /strain="128"
                       /isolation_source="water"
                       /db_xref="taxon:573"
     gene              1..996
                       /gene="mrkD"
     CDS               1..996
                       /gene="mrkD"
                       /note="adhesin subunit of type 3 fimbriae"
                       /codon_start=1
                       /transl_table=11
                       /product="MrkD"
                       /protein_id="AGZ83319.1"
                       /translation="MSLRKLLTLFIVLMALGTTSSNASCTRLSSPTVMILDMVGRVWV
PPDLPVGSVILTRDHTMSAPGGASYRCTSGTNRFPAKIVSPGATDLGNKIYSTNVPGI
GHRFSRGGATVNIYVPDVFSSRVYNTTMSLEGSRFTLEIIKTAATTGSGTLAAGKYT
SYDWESGGNPILLETYLSANAITVVSPPSCSVLSGKNMNVGVGSIIRDTLKGVGTTAGGK
DFNIDLQCSGGLSETGYANISTFSFGTLATSTTATMGALLNEKAGSGMAKGIGIQVLK
DGSPLQFNKKYTVGRLNNQETRYITILHARFYQYGPPTSTGVEVSHMIFNLTYD"
```

Resim 2 *K. pneumoniae* ait *mrkD* gen dizisi



Resim 4 pET-30a (+) üzerindeki klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon kesim bölgeleri

Tablo 2. *mrkD* için tasarlanan primer sekansları

Primer	Primer sekansı
mrkD Forward primeri	5'-ATAGAATTCATGTCGCTGAGGAAATTAC-3'
mrkD Reverse primeri	5'-ATAAAGCTTAATCGTACGTCAGGTAAAG-3'

Forward primer için EcoRI ve Reverse primer için HindIII enzim kesim bölgeleri kalın font olarak primerlerde belirtilmiştir.

3.2.2. *mrkD* Geninin PZR ile Çoğaltılması ve Elektroforez

Bu çalışmada Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Uygulama ve Araştırma Merkezinde (REDPROM) bulunan *K. pneumoniae* izolatları kullanılmıştır. İzolatlar öncesinde LB-Agar besiyerine ekilmiş ve 1 gece inkübasyona

birakılmıştır. İzolatlardan koloni PZR yöntemi ile *mrkD* geni çoğaltılmıştır. PZR kurulurken kullanılan konsantrasyonlar ve miktarları Tablo 2’de belirtilmiştir. Amplifikasyon sonucunda elde edilen ürün, safeview içeren %1’lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

Tablo 2 . PZR Reaksiyonun hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	1 örnek için alınan miktar (µl)
%1,5 MgCl ₂ Buffer(10X)	1x	5 µl
dNTP (10 mM)	0,2 Mm	1 µl
Primer-F (100 pmol)	0,4 pmol	0,2 µl
Primer-R (100 pmol)	0,4 pmol	0,2 µl
Taq Polimeraz (5U)	0,3 µl/50 µl	0,3 µl
ddH ₂ O		41,3 µl
Toplam		50 µl

3.2.3. *mrkD* Geninin pET30-a(+) Plazmidine Klonlanması

Klonlama için sırasıyla restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim, DNA presipitasyonu, ligasyon, kimyasal transformasyon için kompetan hücre (BL21) hazırlığı ve kimyasal transformasyon yapılmıştır.

3.2.3.1. Restriksiyon

mrkD ampikonu ve pET30-a(+) vektörünün restriksiyonu için aşağıda verilen tablodaki karışım hazırlanmış ve 37 °C’ de 1 saat inkübe edilmiştir.

Tablo 3. Kesim reaksiyonun hazırlanma oranları

	Ampikon (<i>mrkD</i>)	Plazmid (pET-30a (+))
DNA	10µl	10µl
Su	6µl	6µl
Thermo Scientific 10X Fast Digest Buffer	2µl	2µl
Thermo Scientific Restriksiyon Enzimi (EcoR1)	1µl	1µl

Thermo Scientific Restriksiyon Enzimi (HindIII)	1µl	1µl
Total	20µl	20µl

3.2.3.2. Presipitasyon

Elektroforez analizi için enzim kesimi sonrası, toplam reaksiyon hacminden 5 µl'lik bir örnek ayrılmıştır. Geriye kalan 15 µl'lik DNA/plazmid karışımına, 85 µl saf su eklenerek hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır. Karışıma 100 µl Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1) çözeltisi ilave edilip iyice karıştırılmış ve ardından 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı (sulu faz) yeni bir eppendorf tüpüne dikkatlice aktarılmıştır. (Bu aşamada kesilmiş DNA ve plazmid tek tüpte birleştirilmiştir.) Üst faza, toplam hacmin %10'u kadar 3 M sodyum asetat (pH 5.2) eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra hacmin 2-3 katı kadar %100 etanol (veya eşdeğer oranda izopropanol) ilave edilip, tüp ters düz edilerek homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu karışım -20°C'de yaklaşık 20 dakika boyunca çöktürme işlemi için bekletilmiştir. Ardından 10.000 rpm'nin üzerinde, +4°C'de 20-30 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Üstte kalan sıvı dikkatlice uzaklaştırılmış ve pellete 300 µl %70 etanol eklenerek yeniden yüksek devirde (≥ 10.000 rpm), 10 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak, etanol uzaklaştırılmış, pellet bir süre kurutulmuş ve 17 µl steril saf su içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.3. Ligasyon

Presipitasyon aşamasının ardından ligasyon reaksiyonu uygulanmıştır. Ligasyonda kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları tablo 5'te belirtilmiştir. Hazırlanan reaksiyon, 22 °C'de 1 saat bekletildikten sonra 16 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ligaz enziminin inaktivasyonunun sağlanması amacıyla 65°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 4. Ligasyon reaksiyon hazırlanma oranları

Plazmid-DNA Karışımı	17µl
Thermo Scientific 10X T4 Ligaz Buffer	2µl
Thermo Scientific T4 Ligaz Enzim	1µl
Total	20µl

3.2.3.4. Kompetan Hücrenin Hazırlanması

Klonlama işlemlerinde kullanılacak olan *E. coli* BL21 suşuna ait kimyasal kompetan hücreler, standart kompetan hücre hazırlama protokolüne uygun şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla, bir gece önceden katı besiyerinden izole edilen tek bir BL21 kolonisi 10 mL sıvı besiyerine eklenmiştir. Ertesi gün bu kültürden 1 mL alınarak 50 mL'lik taze sıvı besiyerine aktarılmış ve yaklaşık 4 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılarak log fazına ulaşması sağlanmıştır. Log fazına ulaşan kültür 35 dakika boyunca buzda bekletildikten sonra 5000 rpm'de, +4 °C'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 10 mL steril su ile resüspansiyon edilmiştir. Su ile yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra elde edilen hücre pellet'i, 10 mL %10 gliserollü su ile süspanse edilmiş ve aynı şartlarda yeniden santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış, hücreler bu kez 30 mL 80 mM MgCl₂ – 20 mM CaCl₂ çözeltisi ile resüspansiyon edilmiştir. Ardından 5000 rpm'de, +4 °C'de 10 dakika daha santrifüj uygulanmış ve son olarak pellet 1 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisinde süspanse edilmiştir. Hazırlanan kompetan hücreler 100 µL'lik alikotlar halinde eppendorf tüplerine dağıtılmıştır.

3.2.3.5. Transformasyon

Transformasyon işlemi kapsamında, 10 µL ligasyon karışımı ve kontrol amaçlı ayrı bir eppendorf tüpüne ise 10 µL pET30(+) plazmidi eklenmiştir. Her iki eppendorf 20 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler 42 °C'de 2 dakika boyunca thermoshaker cihazında inkübe edilmiş ve ardından 5 dakika süreyle tekrar buzda bekletilmiştir. Inkübasyon işlemlerinin ardından her bir tüpe 900 µL LB-Broth besiyeri ilave edilmiştir. Eppendorflar , 37 °C'de 1 saat boyunca thermoshaker'da çalkalanarak inkübe edilmiştir. Inkübasyon tamamlandıktan sonra 100'er µL örnek alınarak, kanamisin içeren LB-Agar besiyerine steril öze yardımıyla yayma ekimi yapılmıştır. Plakalar 37 °C'de en az 24 saat sürecek şekilde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.6. İnsert Alan Rekombinant Plazmidleri İçeren Kolonilerin Seçimi ve Doğrulanması

Koloni PZR metodu kullanılmıştır. *mrkD* geninin çoğaltılması için spesifik tasarlanan primerleri aracılığı ile insert alan koloniler seçilmiştir. Aynı zamanda 10 ml sıvı kültürden üreyen kolonilerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak; *mrkD* geni için restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.7. Sekans Analizi

Seçici besiyerinde seçilen klonların doğrulanma yapıldıktan sonra elde edilen klonlardan T7 primerleri ile PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi için özel bir firmaya gönderilmiştir. Analiz sonucunda belirlenen DNA sekansı BLAST ile karşılaştırılmıştır. Tablo 6'da T7 primerlerinin gen sekansları belirtilmektedir.

Tablo 5. T7 primerlerinin gen sekansları

Primer	Primer sekansı
T7 - Forward:	5'- TAATACGACTCACTATAGGG- 3',
T7 - Reverse:	5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG- 3'

3.2.4. Protein Analizi

3.2.4.1. Rekombinant MrkD proteinin indüklenmesi ve SDS-PAGE jel ile gösterilmesi

Doğrulan koloni, 50 µg/ml kanamisin içeren 10 ml 2X-YT besiyerine gecelik ekilmiştir. Gecelik kültürden 1 ml alınıp 50 µg/ml kanamisin içeren 50 ml 2X-YT besiyerine ekilmiş ve OD_{600nm} 0.8 olduğunda 10 g/l laktoz ile indüklenmiştir. İndükleme öncesi 1 ml örnek alınıp santrifüjlenmiş ve 500 µl 1X PBS ile çözülmüştür. İndükleme sonrası ertesi gün örnekten tekrar 1 ml alınıp santrifüjlenmiştir. Üst sıvı atılıp 500 µl 1X PBS ile çözülmüş ve oanikasyon işlemi ile hücreler parçalanmıştır. Parçalama sonrası süpernant ayrı bir ependorfa ayrılmış ve pellet üzerine 500 µl 1X PBS eklenmiştir. Elde edilen indükleme öncesi pellet, indükleme sonrası ayrılmış supernatant ve indüklenme sonrası pellet %10 SDS-PAGE (Sodyum Dodesil

Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) (Tablo 6) jele yüklenmiş ve rekombinant proteinin indüklenmesi kontrol edilmiştir.

Tablo 6 SDS-PAGE hazırlanması için gerekli ürünler ve oranları

Ayırma jeli (%10)		Yoğunlaştırma jeli (%4)	
H ₂ O	4.1 mL	H ₂ O	6.1 mL
Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	2.5 mL	Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8)	2.5 mL
Acrylamide/bis (30% 37.5:1)	3.3 mL	Acrylamide/bis (30%, 37.5:1)	1.3 mL
SDS, 10%	100 µL	SDS, 10%	100 µL
Ammonium persulfate (APS), 10%	32 µL	Ammonium persulfate (APS), 10%	100 µL
TEMED	10 µL	TEMED	10 µL

3.2.4.2. rMrkD'nin *E.coli* BL21 hücrelerinde kültürlenmesi

Rekombinant antijenlerin saflaştırılması, immobilize metal afinitesi kromatografisi (IMAC) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. PZR ve plazmid ekstraksiyonları sonrası yapılan restriksiyon işlemlerinin ardından doğrulanan koloniler sıvı besiyerine ekilmiştir. Rekombinant *E.coli* BL21 hücresi, 10 ml 2X-YT besiyerinde gecelik 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün 1 L 2X-YT besiyerine inoküle edilerek ve OD₆₀₀ 0.8 olana kadar inkübe edilmiştir. Ardından son konsantrasyonu 10 g/L olacak şekilde laktoz eklenerek indüklenmiştir. 16 saat oda sıcaklığında havalandırılarak inkübe edilmiştir. Sonraki gün santrifüj yardımıyla hücreler toplanmıştır. Hücre pelleti yeterli miktarda liziz tamponu (% 1 Triton X-100, 50 mM sodyum fosfat, 400 mM sodyum klorür, 20 mM İmidazol pH 8.0) ile süspanse edilerek sonikatör yardımıyla hücreler parçalanmıştır. Santrifüj yardımıyla hücre kalıntıları çöktürülerek süpernatanttaki çözüner formdaki proteinler elde edilmiştir.

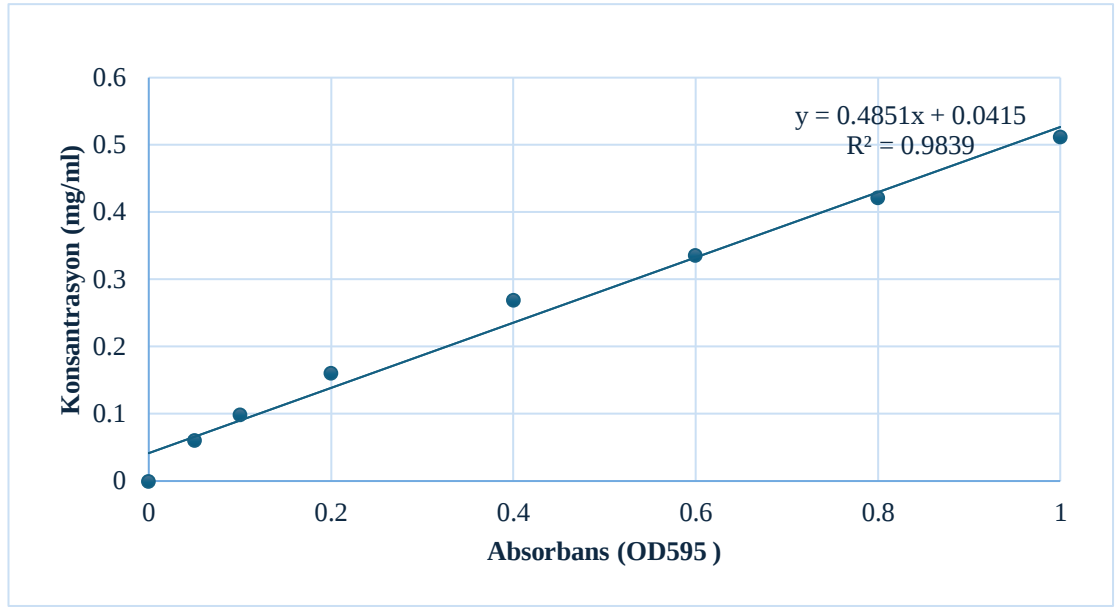
3.2.4.3. IMAC yöntemi ile rMrkD'nin Saflaştırılması ve SDS-PAGE ile Gösterilmesi

6xHis etiketli rekombinant MrkD proteininin saflaştırılması IMAC yöntemiyle saflaştırılmıştır. Yıkama işlemi, yıkama tamponu (50 mM sodyum fosfat, 0.5 M sodyum klorür, 0-80 mM imidazol, pH 8.0) kullanılarak gradient olarak yapılmıştır. MrkD proteini içeren hücre lizatı kolona yüklenmiştir. Lizat yüklemesini takiben, kolona on kolon hacmi %4 elüsyon tamponu içeren bağlanma tamponu uygulanarak kolondaki safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kolon hacminin 5 katı kadar elüsyon tamponu (50 mM sodyum fosfat, 0.5 M sodyum klorür, 500 mM imidazol, pH 8.0) kolondan geçirilerek kolona bağlanmış olan rekombinant MrkD protein fraksiyonları toplanmıştır. Elde edilen elüsyon fraksiyonlarından imidazol uzaklaştırmak ve tampon değişimi sağlamak amacıyla örnekler desalting kolonu (desalt column) üzerine yüklenmiş ve 1x PBS tamponu kullanılarak buffer değişimi yapılmıştır.

MrkD proteininin saflık derecesini değerlendirmek amacıyla fraksiyonlar %10'luk SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. Jel boyaması için Coomassie Brilliant Blue kullanılmıştır. SDS-PAGE jel sistemi hazırlanırken, reaksiyon karışımı (Tablo 7) oluşturulmuş, ardından jel kasetine önce ayırma jeli dökülmüş ve yüzeyi %96'luk etanol ile kaplanarak polimerizasyonun tamamlanması beklenmiştir. Ayırma jeli polimerleştikten sonra etanol uzaklaştırılmış, yoğunlaştırma jeli dökülmüş ve örnek yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiş, ardından proteinler liyofilize edilerek kullanım öncesi istenilen konsantrasyonda yeniden süspanse edilecek şekilde saklanmıştır.

3.2.4.4. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Standart olarak 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan sığır serum albümini (BSA) stok çözeltisinden 0,05–1 mg/mL aralığında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir standarda ve numuneye 100 µL örnek ve 5 mL Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisi eklenerek 2 dakika inkübasyon yapılmıştır. Absorbanslar 595 nm'de ölçülmüş ve standart eğriye göre protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.



Şekil 8. Bradford grafiği

3.2.5. Tip V Kolajen ve rMrkD Proteini Arasındaki Etkileşimin ELISA ile Doğrulanması

Saflaştırılan MrkD proteininin N-terminalinde bulunan 6xHis etiketine özgül afinite gösteren HRP-konjuge anti-6xHis antikoru kullanılarak hücreye özgü doğrudan ELISA (C-ELISA) yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla, 96 kuyucuklu bir ELISA plakası, kaplama tamponu (8.5 g/L NaCl, 1.4 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L NaH₂PO₄) içerisinde çözünmüş insan Tip V kolajeni (Southern Biotech) ile kaplanmış ve plaka 4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, kuyucuklar yıkama tamponu (%0,05 Tween 20 içeren 1X PBS) ile yıkanmış ve test edilecek kuyucuklara saflaştırılmış MrkD proteini ve kontrol olarak PBS ve BSA eklenmiştir. Plaka 37°C’de 2 saat boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası kuyucuklar üç kez yıkanmış ve 200 µL/kuyu bloklama tamponu (%1 BSA içeren yıkama tamponu) eklenerek 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bloklama sonrasında plak tekrar üç kez yıkanmış ve her bir kuyucuğa 100 µL HRP-konjuge anti-6xHis antikoru (yıkama tamponunda 1/1000 dilüsyon) eklenmiştir. Plaka 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiş ve ardından beş kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL TMB (tetrametilbenzidin) substratı eklenmiş ve renk değişimi gözlenene kadar 10–15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, 100 µL 1M HCl içeren durdurma tamponu ile sonlandırılmış ve optik yoğunluk 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu ile ölçülmüştür.

Tablo 7. ELISA Deney Grupları

Deney Grupları :
MrkD 50 µg/ml
MrkD 200 µg/ml
BSA 50 µg/ml (negatif)
PBS (kontrol)

3.2.6.1. Fibroblast BJ Hücre Hattının Kültürlenmesi

Tez çalışmasında fibroblast BJ (ATCC® CCL-2™) hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü, %10 fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penisilin , 100 µg/mL streptomisin LG-Sp yaz içeren Minimum Essential Medium (MEM) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler, çalışma süresince %5 CO₂ ve %95 nemli hava içeren inkübatörde, 37°C’de kültürlenmiştir. Sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücreler, 37°C’de su banyosunda hızlıca çözündürülmüş ve 5 mL taze besiyeri içerisine aktarılmıştır. Kriyoprotektanların uzaklaştırılması amacıyla hücre süspansiyonu 400×g’de, 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pellet’i 12 mL taze besiyeri içinde çözündürülerek 75 cm²’lik kültür kabına aktarılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Deney süresince antibiyotik içermeyen besiyeri kullanılmıştır .

Thoma lamı ile hücre sayımı formülü:

$$\text{Hücre sayısı (adet/mL)} = \frac{\text{Sayım alanında sayılan hücre sayısı} \times \text{Seyreltme katsayısı} \times 10^4}{\text{Sayım yapılan kare sayısı}}$$

3.2.6.2. Hücre Canlılığı Testi

96 kuyucuklu plakaya her bir kuyuya 100 µl hücre süspansiyonlarından eklenmiş ve 24 saat boyunca 37°C, %5 CO₂ ’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün besiyerleri uzaklaştırılıp ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Kuyulara MEM besiyeri içerisinde süspanse edilmiş 50µg/ml MrkD proteini 100 ul eklenmiştir. Kontrol grubu olarak PBS kullanılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, MrkD

proteinin Bj Fibroblast hücrleri üzerisindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla için WST-1 assay gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa WST-1 solüsyonunda 10 µl eklenerek ve 1-4 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 1. 2. ve 4. saatlerde 450 nm’de optik dansite (absorbans) spektrofotometre ile ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri kontrol grubuyla karşılaştırılmış, MrkD’nin hücreye olan sitotoksik etkisinin varlığı değerlendirilmiştir.

3.2.6.3. MrkD Proteininin Fibroblast BJ Hücrelerine Bağlanmasının *K. pneumoniae* Bağlanmasına Etkisi

Bj Fibroblast hücreleri kültürün ardından 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. 1 günlük inkübasyonun ardından besiyerleri uzaklaştırılmış PBS ile yıkanmıştır. Rekombinant olarak saflaştırılmış MrkD proteini, besiyeri içerisinde 50 ug/ml konsantrasyonunda hücre süspansiyonuna eklenmiş ve hücreler 96 kuyucuklu plakalarda 45 dk boyunca 37°C’de, %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

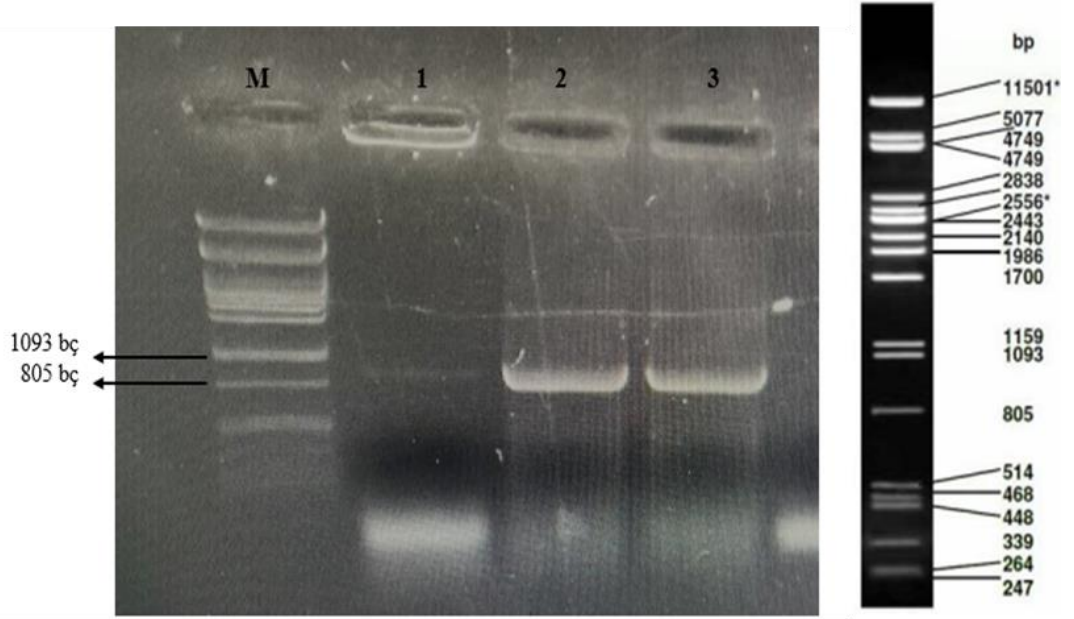
Ardından besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında 10⁵ bakteri/mL yoğunluğundaki *K. pneumoniae* sıvı kültüründen her kuyucuğa 100 µl eklenmiş, hücreler 45 dk 37°C’de inkübe edilmiştir. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılmış, kuyucuklar PBS ile yıkanmış ve hücrelere yapışan bakteriler kuyucuklardan kazınarak PBS içinde homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlardan uygun dilüsyonlar hazırlanarak LB-Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve plakalar 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Koloni sayımları gerçekleştirilerek bağlanma düzeyleri logaritmik değerlendirilmiştir.

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Koloni sayısı}}{\text{inoküle edilen hacim (ml)}} \times \text{seyreltme katsayısı}$$

4. BULGULAR

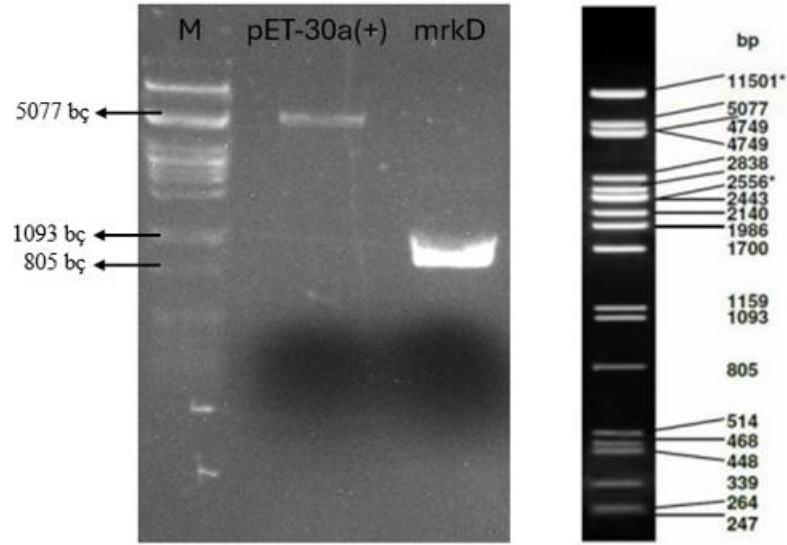
4.1. *mrkD* genin PZR sonucu

PZR sonucunda elde edilen amplikon, safe view içeren %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiş ve amplikonun yaklaşık 1014 bç büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir (Resim 5). Marker olarak; lambda DNA/Pst markır kullanılmıştır. 3 adet *K. pneumoniae* klinik suşu kullanılmış ve 1,2 ve 3 olarak belirtilmiştir. Markır M ile gösterilmiş ve amplikon boyutu 1014 bç. olarak kullanılan suşlardan elde edilmiştir.



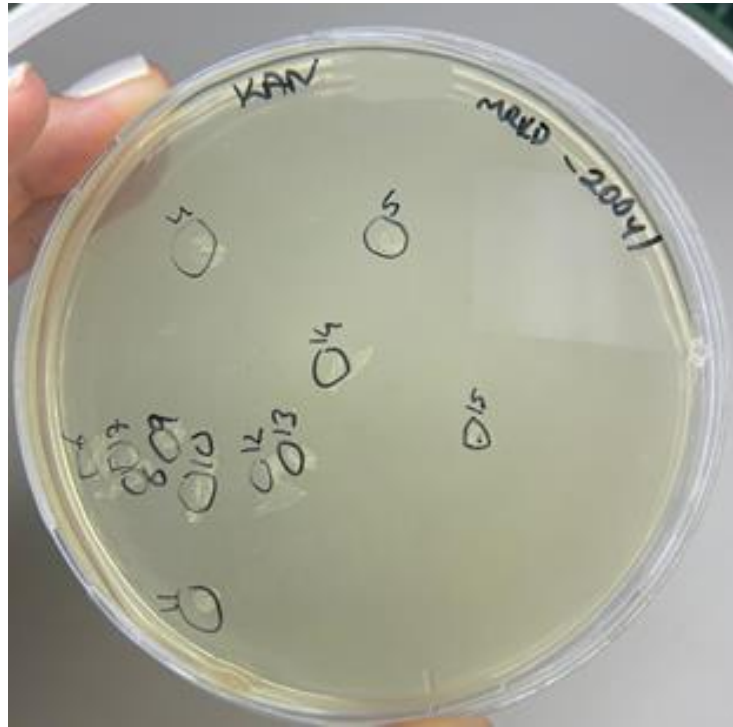
Resim 5 *mrkD* geni PZR sonucu agaroz jelde görüntüsü.

4.2. mrkD amplikonun pET30a-(+) vektörüne klonlanması ve transformasyonu



Resim 6 *mrkD* amplikonu ve pET-30 a (+) vektörünün EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesim sonucu

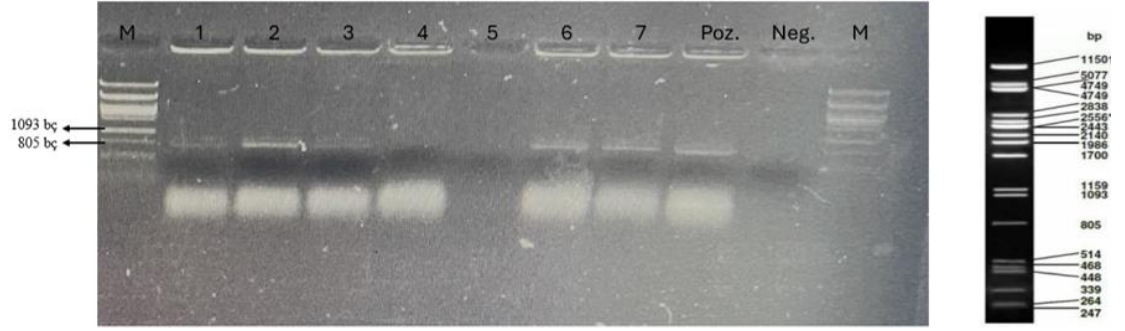
mrkD amplikonu ve pET-30 a (+) vektörünün EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesim sonucu agaroz jel görüntüsü. Marker M ile gösterilmiştir.



Resim 7 Tranformasyon Sonucu Petri Görüntüsü

Transformasyon sonucunda elde edilen kanamisin (50 µg /ml) ortamında büyüyen kolonilerin petri görüntüsü.

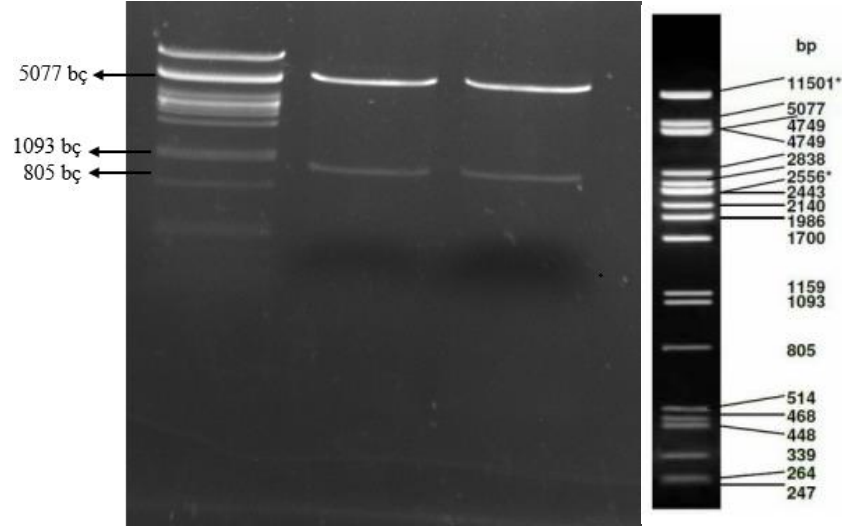
4.3.1.İnsert alan rekombinant plazmidleri içeren kolonilerin seçimi ve doğrulanması



Resim 8 Koloni PZR metodu ile mrkD amplikonlarını taşıyan kolonilerin elektroforez sonucu

Resim 7.'de daire içlerinde belirtilen 15 koloniden 7 tanesi seçilip Tablo 1.'de belirtilen primer çifti ile belirtilen koşullarda koloni PZR yapılmıştır (Resim 8). Seçilen 7 koloniden 5 tane pozitif sonuç elde edilmiştir. Bir tane *K. pneumoniae* suşu pozitif örnek olarak ve bir tane negatif kullanılmıştır. Markır M ile belirtilmiştir. Pozitif kolonilerden 1014 bç boyutunda amplikon elde edilmiş ve doğrulanmıştır.

Koloniler 50 µg/ml kanamisin içeren sıvı besiyerine gecelik ekilmiştir. Sonraki gün plazmit izolasyonu yapılmış ve EcoRI – HindIII enzimleriyle Tablo 3.'deki gibi enzim kesim işlemi yapılmıştır. Kesim sonucu %1'lik agaroz jel ile gösterilmiştir (Resim 9). 2 koloninin kesim sonucu gen boyutu (1014 bç) ve pET30a-(+) vektörünün (5422 bç) boyutları gösterilmiş ve vektörün mrkD amplikonunu içerdiği doğrulanmıştır.



Resim 9 Kolonilerden elde edilen plazmitlerin enzimler ile kesim sonucu agaroz jel görüntüsü.

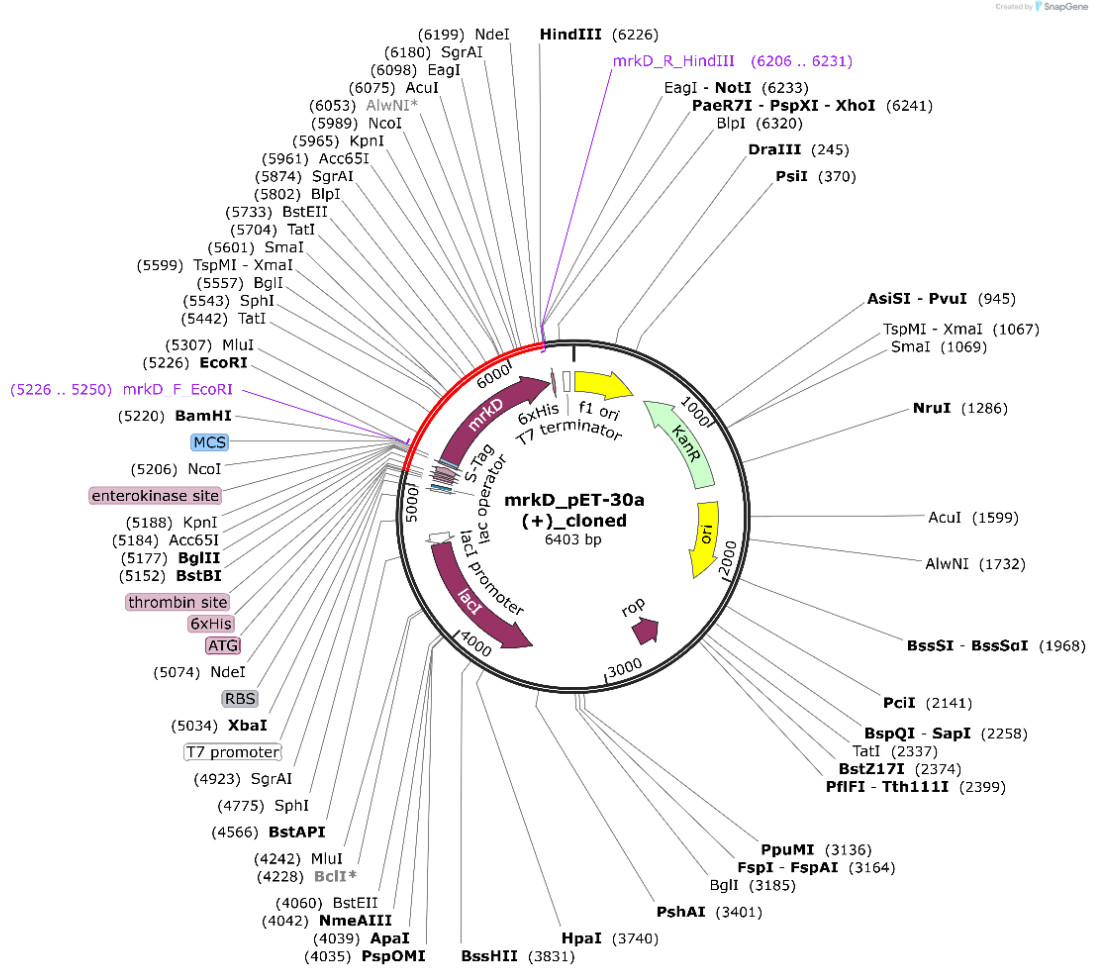
4.3.2.T7 primerleri PZR kurulması ve DNA Dizi Analizi ve Karşılaştırma Sonucu

Koloni PZR ve restriksiyon analizleri ile doğrulanan genlere ait birer adet amplikon DNA sizi analizinin yapılması amacıyla T7 primerleri kullanılarak hizmet alımı ile firmaya gönderilmiştir. Fasta formatında tarafımıza gönderilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla Nucleotidnucleotide BLAST programı aracılığı ile *mrkD* genine ait sekans değerlendirilmiş olup %99.80 oranında *K. pneumoniae* izolatlarında bulunan *mrkD* genleri ile elde ettiğimiz amplikonun sekansının eşlendiği doğrulanmıştır.

Klebsiella pneumoniae isolate 326 genome assembly, chromosome: main									
Sequence ID: QW959546.1 Length: 5323918 Number of Matches: 1									
Range 1: 85117 to 896112 Back Graphics View Next Match & Previous Match									
Score	Expect		Identities		Gaps		Strand		
1829 bits(990)	0.0		995/997(99%)		1/997(0%)		Plus/Minus		
Query 218	ATGTGCTGGAGAAATTA	ACTAAGCTGTTTAT	TGCTTTAATGGCTGCTGGGAACACCT	TCG	277				
Sbjct 895117	ATGTGCTGGAGAAATTA	ACTAAGCTGTTTAT	TGCTTTAATGGCTGCTGGGAACACCT	TCG	895176				
Query 278	TCTTGGGCTCTCTTG	ACGCGTCTCT	CTATCGCCACAGGTGATGCTGGACATGTGGTGGG	337					
Sbjct 895177	TCTTGGGCTCTCTTG	ACGCGTCTCT	CTATCGCCACAGGTGATGCTGGACATGTGGTGGG	895236					
Query 338	AGGGTGGTGGTGGCCCC	GGATTCGTCGGTGGGCTGGGATGCTT	ACCCGCGATGGACG	397					
Sbjct 895237	AGGGTGGTGGTGGCCCC	GGATTCGTCGGTGGGCTGGGATGCTT	ACCCGCGATGGACG	895296					
Query 398	ATGAGCGTCTCCGGCGGGG	CAGGTATCGCTGATCTCCGGCACACACCG	TTTCGGCGG	457					
Sbjct 895297	ATGAGCGTCTCCGGCGGGG	CAGGTATCGCTGATCTCCGGCACACACCG	TTTCGGCGG	895356					
Query 458	AAGATGCTGTCCGGCGGAC	CAGCGATCTTGGAAATAATCTT	CACTCCACACGTCGG	517					
Sbjct 895357	AAGATGCTGTCCGGCGG	ACGATCTTGGAAATAATCTT	CACTCCACACGTCGG	895416					
Query 518	GGAAATCGCATGCGTTT	CASGCGCGGGCGGCACAGCGTAAATCT	GTCTATCTCCGACGTC	577					
Sbjct 895417	GGAAATCGCATGCGTTT	CASGCGCGGGCGGCACAGCGTAAATCT	GTCTATCTCCGACGTC	895476					
Query 578	TTTTCTCGCCGGGTATA	AACACCAACCAATATTCCTT	CAGAGGGTTCGGCGTTTACGCTG	637					
Sbjct 895477	TTTTCTCGCCGGGTATA	AACACCAACCAATATTCCTT	CAGAGGGTTCGGCGTTTACGCTG	895536					
Query 638	GAAGATTATCAAAACCG	GGGACACACCGGCGGCGGACCTCTGGGCGGGTGAATGACAC	997						
Sbjct 895537	GAAGATTATCAAAACCG	GGGACACACCGGCGGCGGACCTCTGGGCGGGTGAATGACAC	895596						
Query 698	TGCTACGATGGGAGAGCG	GGGCGGTAACCGTATCTGAAACATATCT	GTAGCGCGACACCG	757					
Sbjct 895597	TGCTACGATGGGAGAGCG	GGGCGGTAACCGTATCTGAAACATATCT	GTAGCGCGACACCG	895656					
Query 758	ATCATCGTGGTCTCGCT	CTCTTCTTGCTGGTGCGGAGGAAAAATGAAT	GTGATGCTGATG	817					
Sbjct 895657	ATCATCGTGGTCTCGCT	CTCTTCTTGCTGGTGCGGAGGAAAAATGAAT	GTGATGCTGATG	895716					
Query 818	GGTTTCATCCGCGGCAC	CGAGCTGAAGGGGTGGGACACACCGCCGGCGGAGGAATTTT	877						
Sbjct 895717	GGTTTCATCCGCGGCAC	CGAGCTGAAGGGGTGGGACACACCGCGGCGGAGGAATTTT	895776						
Query 878	AATATGACGCTGAGTG	CGGCGGCGCTGAAGTGAACAGGATATGCAACATATGACAGC	937						
Sbjct 895777	AATATGACGCTGAGTG	CGGCGGCGCTGAAGTGAACAGGATATGCAACATATGACAGC	895836						
Query 938	TGTTCTCGGTCAGT	GGGCGACACGACTACCGCTACATGGGCGCTTGC	GAATGAAG	997					
Sbjct 895837	TGTTCTCGGTCAGT	GGGCGACACGACTACCGCTACATGGGCGCTTGC	GAATGAAG	895896					
Query 998	AAGACGGGACGAGGAT	TGGCGAAGGAGTTGGCATCGAGTGTGAAGGATGGCTCCCG	1057						
Sbjct 895897	AAGACGGGACGAGGAT	TGGCGAAGGAGTTGGCATCGAGTGTGAAGGATGGCTCCCG	895956						
Query 1058	CTCAGATTAAT	AAGAAATGAATACAGGCTCTGGATTAATGATGAGGAGAGGCTATAC	1117						
Sbjct 895957	CTCAGATTAAT	AAGAAATGAATACAGGCTCTGGATTAATGATGAGGAGAGGCTATAC	896016						
Query 1118	ACCATACCGCTGCACG	CGCTTTTTATCAGTATGGCCCGACGACACGACCGCGAGTG	1177						
Sbjct 896017	ACCATACCGCTGCACG	CGCTTTTTATCAGTATGGCCCGACGACACGACCGCGAGTG	896076						
Query 1178	GGAGTGCATATGATCTT	TAACTTGACGTACGATTAAT	1214						
Sbjct 896076	GGAGTGCATATGATCTT	TAACTTGACGTACGATTAAT	896132						

42

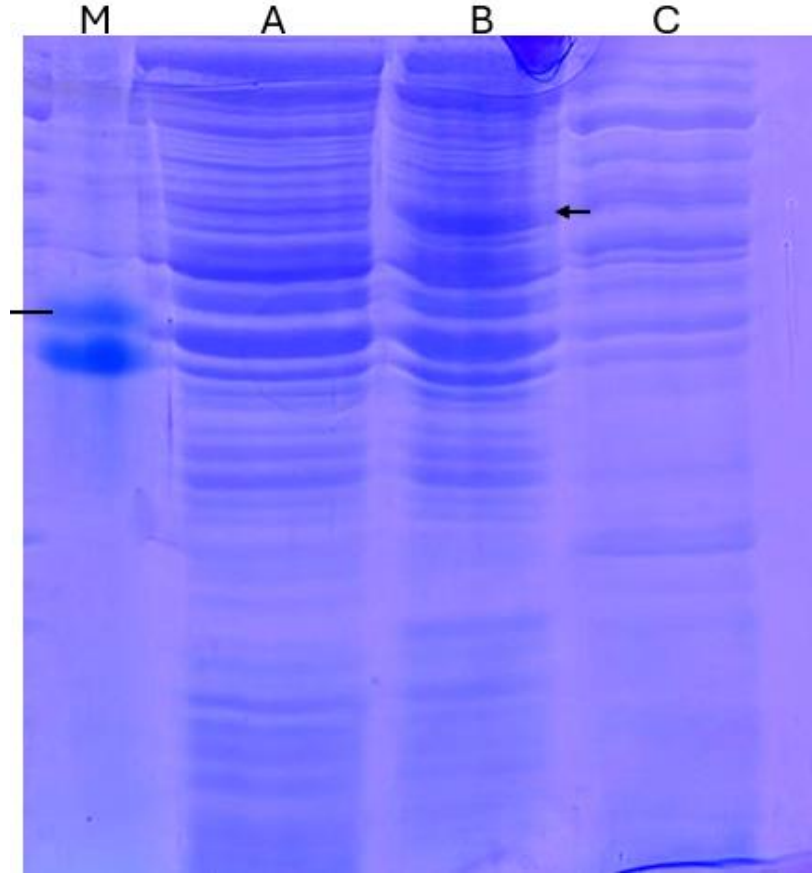
4.3.3.Şematik olarak MrkD'nin pET30a-(+) vektörüne klonlanması



Resim 11. *mrkD* genin pET30-a(+) plazmidine klonlanmasının şematik olarak gösterilmesi

SnapGene uygulaması kullanılarak NCBI sisteminden *mrkD* geninin sekansı fasta formatında indirilmiş ve pET30-a(+) vektörüne biyoinformatik yöntem ile klonlanmıştır. pET30-a(+) plazmidine klonlama sonrası, MrkD için beklenen proteinin moleküler ağırlığı 40.8 kDa olarak hesaplanmıştır (Resim 11).

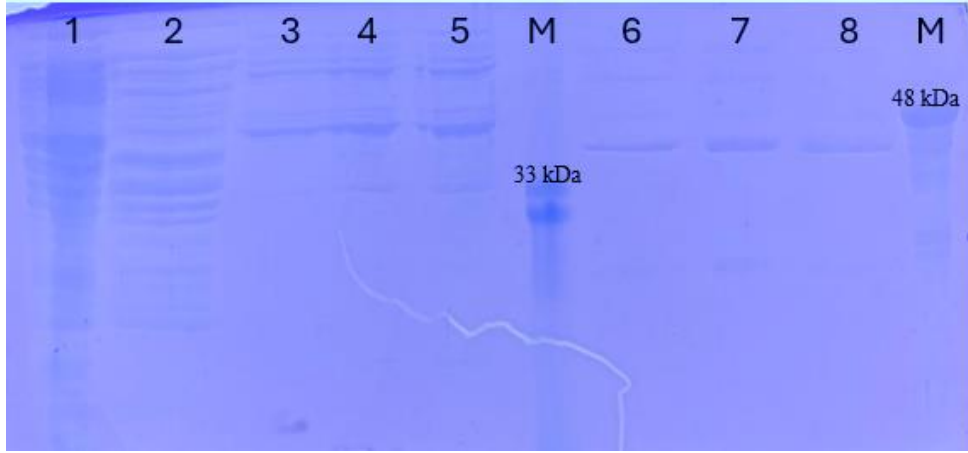
4.4.1.rMrkD'nin protein ekspresyonu sonucu



Şekil 9 MrkD proteinin indüklenmesinin SDS-PAGE ile gösterimi

rMrkD içeren *E.coli* hücresi laktoz (10 g/L) ile indüklenerek, lizat hazırlanmış ve SDS-PAGE yapılmıştır. SDS-PAGE sonuçları Şekil 10 'de verilmiştir. M ile belirtilen markır 33 kDa boyutundadır. A ile belirtilen indüklenme sonrası süpernatant, B indüklenme sonrası pellet ve C indüklenme öncesi pelleti ifade etmektedir. Ok ile işaretlenen MrkD proteinin indüklendiğini ve pellette kaldığını göstermektedir.

4.4.2.rMrkD'nin IMAC yöntemi ile saflaştırılması sonucu



Şekil 10 Saflaştırma sonrası elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE ile gösterimi.

M ile gösterilenler 33 kDa ve 48 kDa boyutunda farklı markerlardır. 1 parçalama sonrası liziz tampon ile elde edilen lizat, 2 kolona bağlanmayan proteinlerdir. 3, 4 ve 5 yıkama tamponu ile elde edilen fraksiyonları ifade etmektedir. 6, 7 ve 8 elüsyon tamponu ile elde edilen MrkD proteinini göstermektedir. MrkD proteini 40,8 kDa boyutundadır. Elüsyon tamponu ile elde edilen fraksiyonlar 33 kDa ve 48 kDa markırlar arasında bulunmaktadır ve MrkD proteinin saflaştığını ve boyutunu doğrulamaktadır.

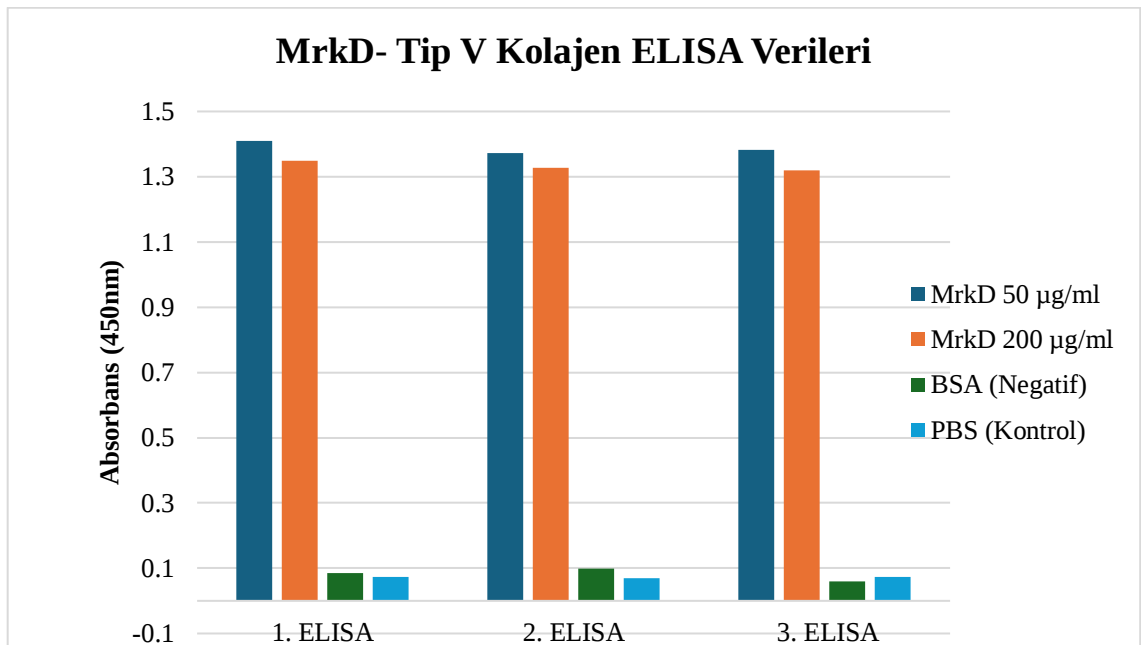
4.5. Tip V Kolajen ve rMrkD Proteini Arasındaki Etkileşimin ELISA ile İncelenmesi

Deney kapsamında 3 farklı zamanda ELISA analizleri gerçekleştirilmiş olup, MrkD proteinin uygulanma konsantrasyonları 50 µg/ml ve 200 µg/ml olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik yöntem kullanılarak her bir grubun OD₄₅₀ değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerler şekil 13'te görüldüğü üzere grafik halinde belirtilmiştir.

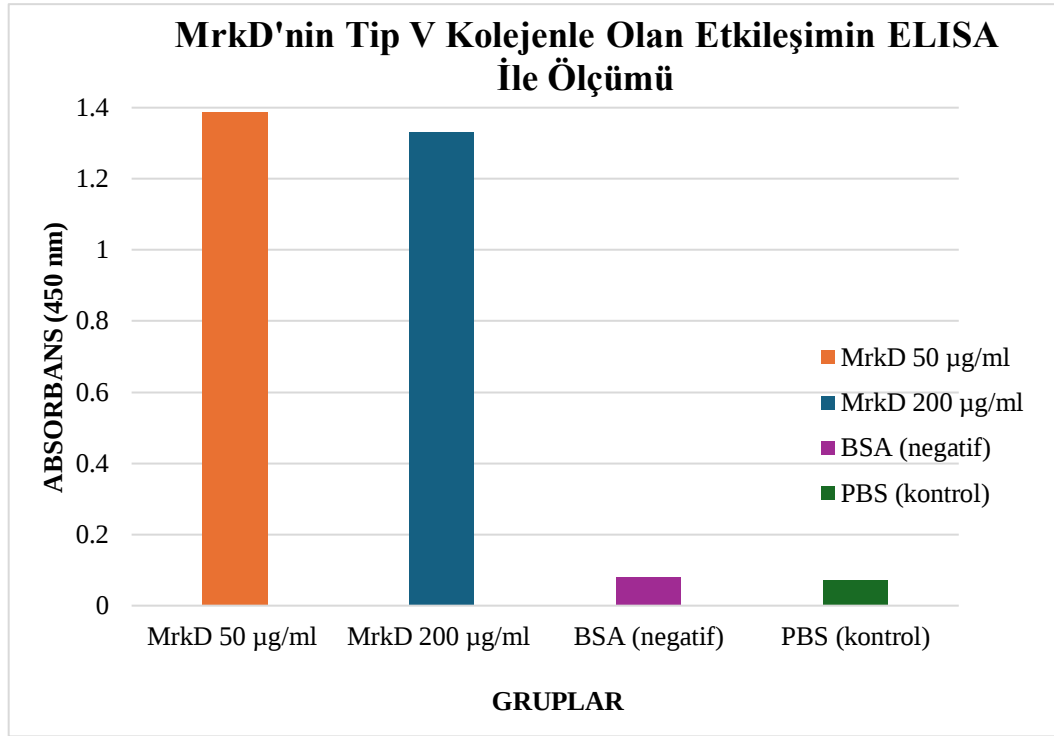
Tablo 8. MrkD'nin Tip V kolejenle Etkileşim seviyelerinin ELISA ile ölçümü

GRUP	1.ELISA	2. ELISA	3. ELISA
MrkD 50 µg/ml	1,41	1,372	1,382
MrkD 200 µg/ml	1,349	1,328	1,319
BSA (Negatif)	0,085	0,098	0,06
PBS (Kontrol)	0,074	0,069	0,073

Farklı zamanlarda gerçekleştirilen üç bağımsız ELISA analizinin sonuçlarına göre, 50 µg/ml konsantrasyonundaki MrkD proteini ile yapılan ölçümlerde absorbans değerleri sırasıyla 1. ELISA'da 1,41, 2. ELISA'da 1,372 ve 3. ELISA'da 1,382 olarak belirlenmiştir. 200 µg/ml MrkD konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerleri sırasıyla 1,349, 1,328 ve 1,319'dur. Negatif kontrol olarak kullanılan BSA'nın absorbans değerleri zaman sırasına göre 0,085 (1. ELISA), 0,098 (2. ELISA) ve 0,06 (3. ELISA) olarak ölçülmüştür. PBS kontrol grubunda ise aynı sıralamayla 0,074, 0,069 ve 0,073 absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bu veriler, MrkD proteininin farklı konsantrasyonlarda belirgin bağlanma düzeyi gösterdiğini ve negatif kontrollerle karşılaştırıldığında özgül etkileşim sergilediğini göstermektedir. Elde edilen verilerin ortalamaları Şekil 13 grafiğinde belirtilmiştir



Şekil 11 ELISA sonuçlarının grafik olarak gösterimi



Şekil 12. MrkD'nin Tip V Kolejenle Etkileşim seviyelerinin ELISA ile ölçümünün ortalaması

Tablo 9. MrkD'nin Tip V Kolejenle Etkileşim seviyelerinin ELISA ile ölçümünün ortalama değerleri

MrkD 50 µg/ml	MrkD 200 µg/ml	BSA (negatif)	PBS (kontrol)
1,388	1,332	0,081	0,072

MrkD proteininin Tip V kolajen proteinine bağlanma potansiyelini değerlendirmek amacıyla yapılan ELISA testinde, 50 µg/ml MrkD uygulanan grupta ortalama absorbans değeri 1,388, 200 µg/ml MrkD uygulanan grupta ise 1,332 olarak ölçülmüştür. Buna karşılık, negatif kontrol olarak kullanılan BSA grubunda bu değer 0,081, PBS kontrol grubunda ise 0,072 olarak kaydedilmiştir.

4.6.BJ Fibroblast Hücre Hattının Kültürlenmesi



Resim 12 Bj Fibroblast hücrelerinin 400X mikroskop görüntüsü

Bj fibroblast hücrelerinin monolayer (tek katmanlı) kültür formasyonunda düzgün şekilde yüzeye tutunduğu, iğsi (fusiform) morfolojilerini korudukları ve hücre-hücre temaslarının belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerin sağlıklı morfolojide olduğu ve kültür yüzeyine yayılım gösterdiği belirlenmiştir.

4.6.1.Thoma Lamı Kullanılarak Hücrelerin Sayılması



Resim 13 Bj Fibroblast hücre sayımı için kullanılan Thoma Lamı görüntüsü

Tripsin kullanılarak kaldırılan hücreler santrifüj edilip elde edilen pelet 1 mL besiyeri ile çözülmüştür. 10ul hücre süspansiyonundan, 10ul de Tripan Blue boyası kullanılarak karıştırılmış ve Thoma lamına alınarak aşağıdaki formüle göre hücre sayımı yapılmıştır.

$$\text{Hücre sayısı (adet/mL)} = \frac{\text{Sayım alanında sayılan hücre sayısı} \times \text{Seyreltme katsayısı} \times 10^4}{\text{Sayım yapılan kare sayısı}}$$

4.6.2.Hücre Canlılığı Testi

Sitotoksosite testinde farklı zaman noktalarında fibroblast hücrelerine uygulanan MrkD proteininin etkisini değerlendirmek amacıyla elde edilen OD₄₅₀ değerleri Tablo 10 ve Tablo 11’de verilmiştir . Kontrol grubunda (PBS ile muamele edilen fibroblastlar) 1. saatte 0.2703, 2. saatte 0.2870 ve 4. saatte 0.3233 absorbans değeri ölçülmüştür. MrkD proteini ile muamele

edilen fibroblast grubunda ise 1. saatte 0.2603, 2. saatte 0.2743 ve 4. saatte 0.2910 değerleri elde edilmiştir. Bu veriler doğrudan sitotoksisite değerlendirmesinde kullanılmıştır.

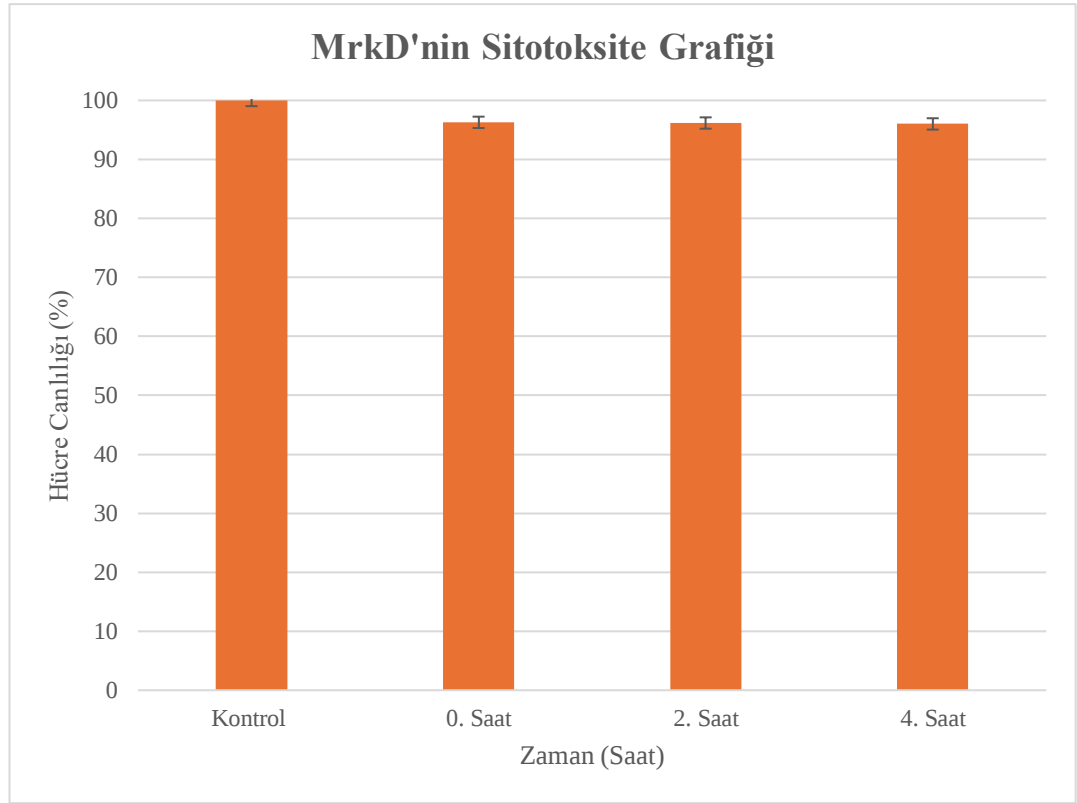
Tablo 10. BJ Fibroblast hücre hattına MrkD ve PBS uygulama sonrası OD₄₅₀ lm

	Fibroblast + PBS (Kontrol) OD₄₅₀	Fibroblast +MrkD OD₄₅₀
1. Saat	0.2703	0.2603
2. Saat	0.2870	0.2743
4. Saat	0.3233	0.2910

Tablo 11. BJ Fibroblast hücre hattına MrkD uygulama sonrası yüzde olarak hücre canlılığı

	1.Saat	2.Saat	4.Saat
Kontrol/MrkD*100	%96.26	%95.57	%94.02

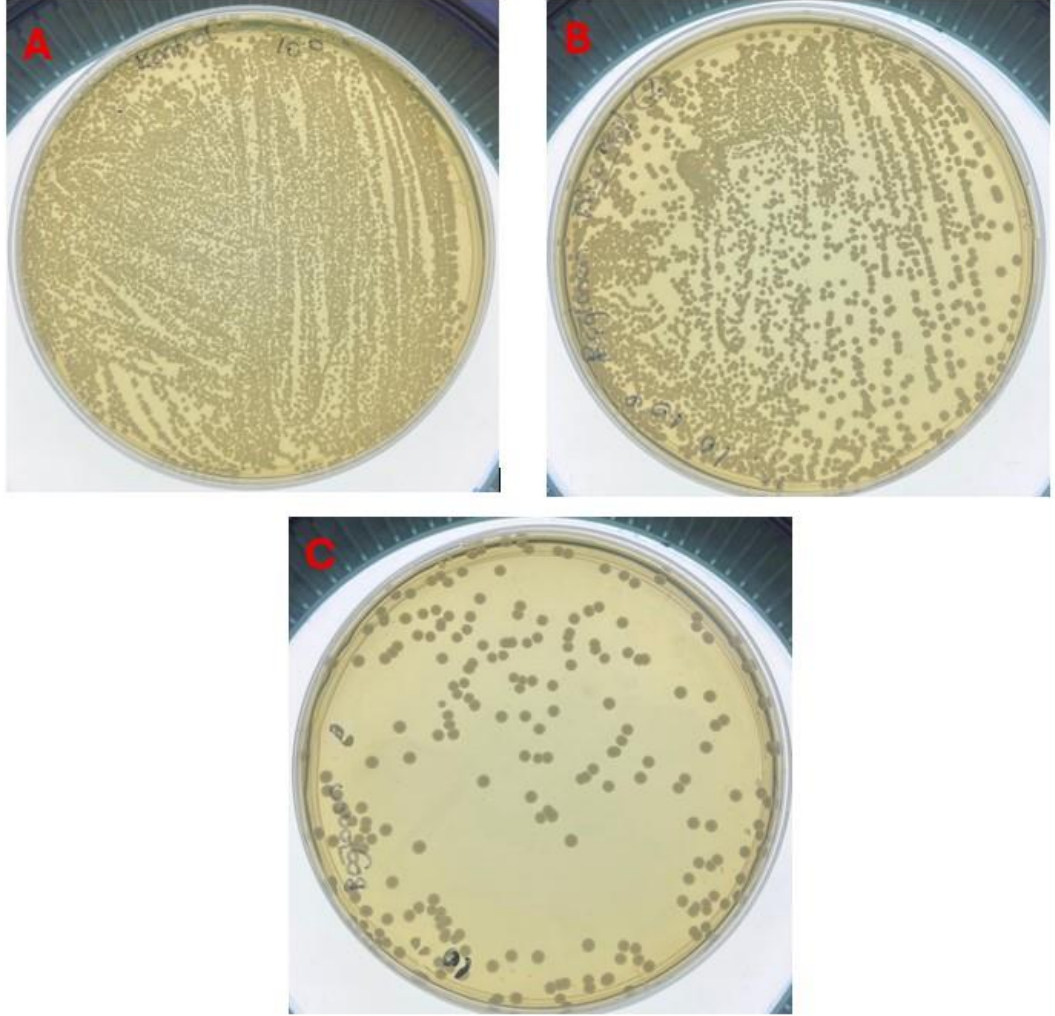
Kontrol grubuna kıyasla MrkD proteini uygulanan fibroblastlarda hücre canlılığı; 1. saatte %96.26, 2. saatte %95.57 ve 4. saatte %94.02 olarak belirlenmiştir.



Şekil 13. MrkD'nin BJ Fibroblast Hattına Karşı Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

WST-1 hücre canlılığı testi sonuçlarına göre, MrkD proteini uygulanan fibroblast hücrelerinde canlılık oranı kontrol grubuna kıyasla 0. saatte %96,26, 2. saatte %95,57 ve 4. saatte %94.02 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, MrkD proteininin kısa süreli uygulamalarda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir toksik etki oluşturmadığını göstermektedir.

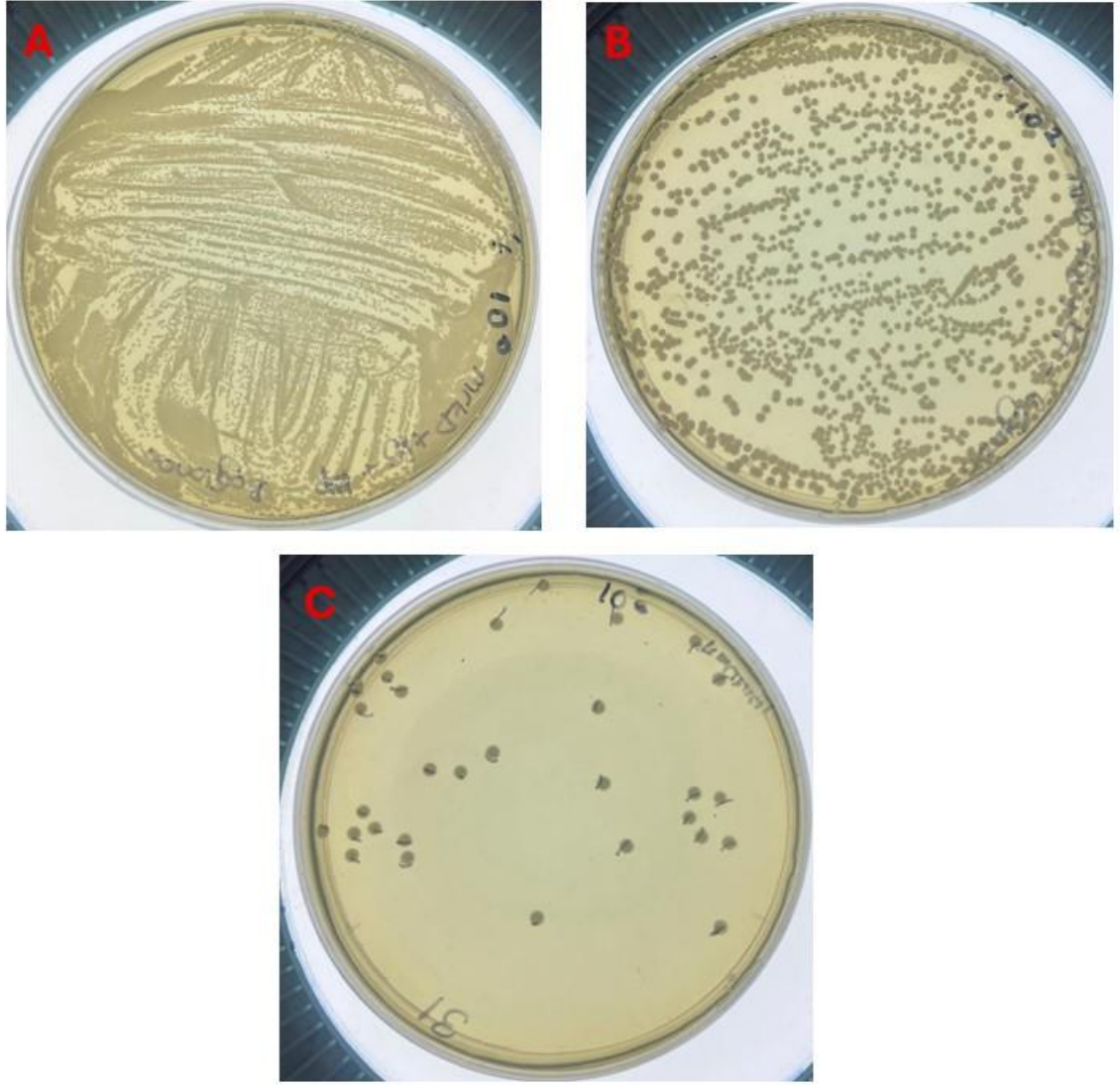
4.6.1 MrkD Proteininin Fibroblast BJ Hücrelerine Bağlanması'nın *K. pneumoniae* Bağlanmasına Etkisinin İncelenmesi



Resim 14 LB-Agar besiyerine ekilen dilüsyonlar, PBS uygulanan kontrol grubu

A) 10^0 bakteri dilüsyonunun LB - Agarda görüntülenmesi, B) 10^{-2} bakteri dilüsyonunun LB- Agarda görüntülenmesi, C) 10^{-4} bakteri dilüsyonunun LB- Agarda görüntülenmesi

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, PBS uygulanan kontrol grubunda *K. pneumoniae*'nin koloni oluşumu sayılmıştır. Bu bakımdan C'de belirtilen 10^{-4} dilüsyon örneğinde toplamda 219 koloni sayılmıştır.



Resim 15. LB-Agar besiyerine ekilen dilüsyonlar, MrkD uygulanan deney grubu

A) 10^0 bakteri dilüsyonunun LB - Agarda görüntülenmesi, B) 10^{-2} bakteri dilüsyonunun LB- Agarda görüntülenmesi, C) 10^{-4} bakteri dilüsyonunun LB- Agarda görüntülenmesi,

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, MrkD uygulanan deney grubunda *K. pneumoniae*'nin koloni oluşumu sayılmıştır. Bu bakımdan C'de belirtilen 10^{-4} dilüsyon örneğinde toplamda 31 koloni sayılmıştır.

Log₁₀ Bakteri Sayımı (CFU/mL) Hesaplanması:

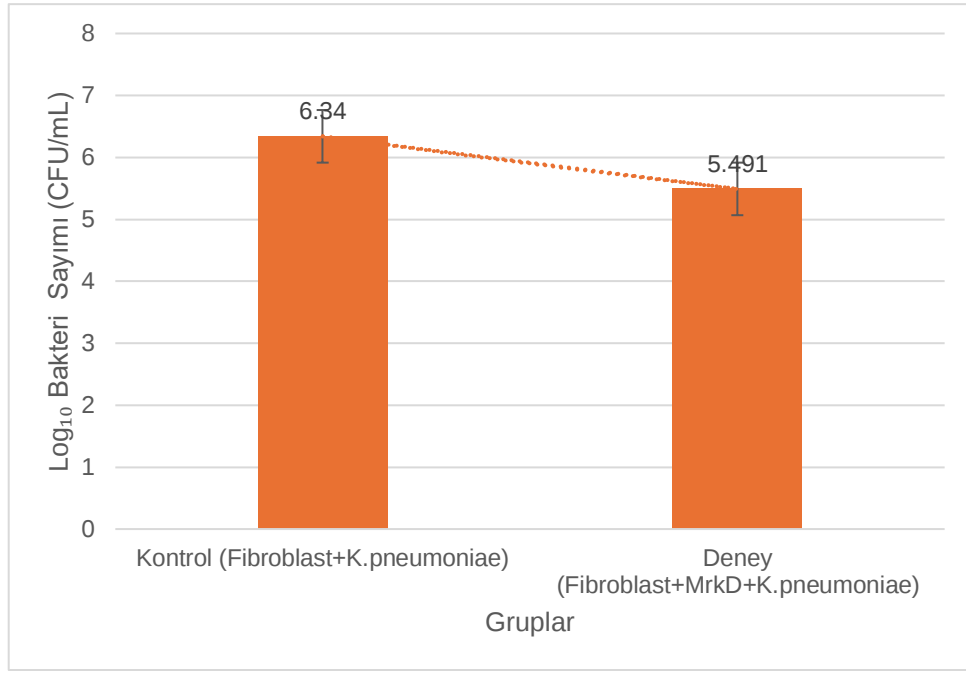
Elde edilen koloni miktarlarının deney ve kontrol grubu olarak Log₁₀ bakteri sayısının hesaplanması aşağıda belirtilmektedir.

Yapılan bakteriyel sayım sonucunda, deney grubunda (MrkD uygulanan fibroblast + *K. pneumoniae*) elde edilen koloni sayısı 31 olarak belirlenmiştir. Bu değere göre CFU/mL hesaplaması $31 \div 0,1 \times 10^4 = 3,1 \times 10^5$ CFU/mL şeklinde yapılmıştır. Elde edilen bu değer logaritmik karşılığı ise $\text{Log}_{10}(3,1 \times 10^5) = \text{Log}_{10}(3,1) + \text{Log}_{10}(10^5) = 0,491 + 5 = 5,491 \text{ log}_{10}$ CFU/mL olarak hesaplanmıştır.

Kontrol grubunda (PBS uygulanan fibroblast + *K. pneumoniae*) ise toplam koloni sayısı 219 olarak bulunmuştur. CFU/mL değeri $219 \div 0,1 \times 10^4 = 2,19 \times 10^6$ CFU/mL olarak hesaplanmış; bu değer logaritması $\text{Log}_{10}(2,19 \times 10^6) = \text{Log}_{10}(2,19) + \text{Log}_{10}(10^6) = 0,340 + 6 = 6,340 \text{ log}_{10}$ CFU/mL şeklinde bulunmuştur.

GRUPLAR	Koloni Sayısı (10^4)	Log_{10} Bakteri Sayımı (CFU/mL)
Kontrol (Fibroblast+ PBS+ <i>K.pneumoniae</i>)	219	$\approx 6,340$
Deney (Fibroblast+MrkD+ <i>K.pneumoniae</i>)	31	$\approx 5,491$

Kontrol grubunda (Fibroblast + PBS + *K. pneumoniae*) toplam koloni sayısı 219 olarak belirlenmiş olup, bu değer yaklaşık olarak $6,340 \text{ log}_{10}$ CFU/mL'ye karşılık gelmektedir. Deney grubunda (Fibroblast + MrkD + *K. pneumoniae*) ise koloni sayısı 31 olarak tespit edilmiş ve bu değer yaklaşık $5,491 \text{ log}_{10}$ CFU/mL olarak hesaplanmıştır.



Yukarıdaki grafiğin sonuçlarına bakıldığında, Bj fibroblast hücre hattına MrkD uygulandığında, kontrol grubuna kıyasla *K. pneumoniae*'nin Bj hücrelerine bağlanma potansiyelinin yaklaşık 0,85 log azaldığı gösterilmektedir. Bu durum 1 log'luk bir düşüş ile bakterinin hücrelere bağlanma potansiyelinin yaklaşık $\approx$ %90 oranında azalmış olduğunu belirtmektedir.

5.TARTIŞMA

Bakteriyel adezinler, mikroorganizmaların konak hücrelere veya yüzeylere tutunmasını sağlayan özelleşmiş yüzey bileşenleridir. Pek çok bakteriyel adezin, özellikle Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde, fimbrialar (pili) adı verilen ince ipliksi yapılar şeklinde organize olmuştur. Bu ipliksi uzantılar; konjugasyon, adezyon (yapışma), biyofilm oluşumu ve konak bağışıklık sisteminin modülasyonu gibi çeşitli süreçlerde kritik rol oynar. Adezinlerin enfeksiyon süreçlerindeki kilit rolü ve hücre yüzeyinde dışa maruz olmaları, onları geleneksel antibiyotiklere alternatif terapötik hedefler olarak öne çıkarmaktadır. Adezinleri hedef alan stratejiler, bakterinin konak hücreye yapışmasını engelleyerek enfeksiyon döngüsünü baştan kesebilir. Nitekim adezin proteinleri genelde kuvvetli immünojenik özelliklere sahiptir; bu da onları aşı geliştirme açısından da cazip kılar. Enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi için adezinlere karşı antikor geliştirme, moleküler inhibitörler kullanma gibi anti-adezyon yaklaşımları, bakteri öldürmeye odaklanan antibiyotiklere göre direnç gelişimini yavaşlatabilecek bir antivirülans stratejisi sunar.

Tablo 12’de, Gram-negatif bakterilerde yer alan başlıca adezin proteinleri, hedef molekülleri, bunlara yönelik tedavi yaklaşımları ve ilgili literatür kaynakları özetlenmiştir.

Tablo 12 Bakteriyel adezinleri hedefleyen tedavi yaklaşımları

Bakteri & Adezin	Hedef Molekül / Sistem	Tedavi Stratejisi	Kaynaklar
<i>Escherichia coli</i> (UPEC, FimH)	Mannoz reseptörleri	D-mannoz türevleri (mannozidler), glikomimetikler	(Cusumano,2011)
<i>K.K. pneumoniae</i> (MrkD, Tip-3 pili)	Tip IV/V kolajen	Anti-MrkD monoklonal antikorlar, rekombinant aşılar	(Sebghati ,1998; Jagnow ve Clegg 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LecA / LecB)	Galaktoz / fukoz reseptörleri	Lektin inhibitörleri, glikomimetikler, nanoteknolojik taşıyıcı sistemler	(Tielker ve ark.,. 2005; Pecoraro ve diğerleri, 2023)

Genel Gram-negatif (DsbA enzim sistemi)	Disülfid bağ katalizi (adezin katlanması/direk düzenlenme)	Küçük molekül inhibitörleri (örneğin feniltiyofen), DsbA/DsbB engelleyiciler	Pecoraro ve diğerleri,2023; Soares-da-Silva ve diğerleri,2022; McMahon ve diğerleri,2021).
<i>Acinetobacter baumannii</i> (AtaA benzeri TAA)	Otomotriker adezin yapısı	Anti-AtaA protein inhibitörleri, gen terapötik yaklaşımlar	Smith et al. (2024)
<i>Salmonella enterica</i> (DsbA homologları)	DsbA ile virülans protein düzenlemesi	Feniltiyofen bazlı inhibitörler, antivirülans ajanlar	McMahon et al. (2021)
<i>Yersinia enterocolitica</i> YadA	Kolajen, fibronektin, integrinler	YadA inhibitörleri, geniş spektrumlu antiadezin ajanlar	Leo ve diğerleri,2011; El Tahir & Skurnik, 2001

Üropatojenik *E. coli*'de tip 1 fimbria adezini olan FimH için geliştirilmiş D-mannoz türevleri (mannositler), konak hücre yüzeyindeki mannoz reseptörlerine bağlanarak FimH'nin mesane epiteline tutunmasını engellemiştir (Sarshar, ve diğerleri, 2020). Bu küçük moleküllu FimH inhibitörleri, kronik ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarını (İYE) tedavi etmede ve profilaksisinde başarılı bulunmuş; ayrıca direnç gelişimi potansiyelini azaltan bir mekanizma ile etki göstermiştir (Foroogh,ve diğerleri,2021). Bu örnek, pilus uç adezinlerini hedef almanın, bakterileri öldürmeksizin enfeksiyonu kontrol altına alabileceğini gösterir.

Benzer şekilde, *Pseudomonas aeruginosa*'nın lektin tipi adezinleri LecA ve LecB, konak epitel hücreler üzerindeki galaktoz ve fukoz kalıntılarına bağlanarak bakterinin tutunmasını ve biyofilm oluşumunu destekler. Bu adezinlere karşı geliştirilen glikomimetik inhibitörler, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına karşı yeni nesil tedavi yaklaşımlarının önünü açmaktadır (Tielker ve diğerleri,2005; Pecoraro ve diğerleri,2023). Yine *Acinetobacter baumannii*'deki trimerik autotransporter adezin (AtaA proteini) örneğinde olduğu gibi, Gram-negatif ve Gram-pozitif patojenlerde farklı adezin tiplerini hedefleyen non-antibakteriyel, antivirülans tedavi stratejileri üzerine araştırmalar bulunmaktadır.

K. pneumoniae, yoğun bakım ünitelerinde kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonları, ventilatör ilişkili pnömoniler, sepsis ve yara enfeksiyonları gibi durumlarda sık izole edilen bir patojendir. Bu enfeksiyonların gelişiminde, bakterinin konak mukozal yüzeylere ve tıbbi cihazların (ör. idrar sondaları, endotrakeal tüpler) yüzeylerine sıkı tutunması önemli bir adımdır. Tip 3 fimbrialar ve MrkD adezini, özellikle hasarlı veya yapay yüzeylerde kolonizasyonu kolaylaştırmaktadır. Örneğin, idrar sondalarının ve diğer implant yüzeylerinin vücut sıvılarıyla kaplanması sonucu bu yüzeylerde fibronektin, kollajen gibi konak ECM proteinleri birikir (Donlan, 2001). MrkD'ye sahip fimbriyalı bakteriler, bu kaplanmış yüzeylere kollajen bağlayıcı

etkinlikleri sayesinde etkin biçimde tutunarak biyofilm oluşturabilirler (Jagnow & Clegg, 2003). Nitekim, yapılan çalışmalar Tip 3 fimbriaların abiyotik yüzeylerde biyofilm gelişimini teşvik ettiğini, ancak bunun özellikle yüzeyin kollajen gibi ECM proteinleriyle kaplı olduğu durumlarda belirgin olduğunu göstermiştir (Langstraat ve diğerleri, 2001; Jagnow & Clegg, 2003). Langstraat ve diğerleri, (2001), *K. pneumoniae*'nın plastik yüzeylerde biyofilm oluşturma kapasitesinin Tip 3 fimbria varlığına bağlı olduğunu ancak MrkD proteininin yokluğunda da (sadece MrkA şaft proteiniyle) bir miktar biofilm oluşabildiğini raporlamıştır. Buna karşılık Jagnow ve Clegg (2003), kollajen kaplı yüzeylerde MrkD aracılı bağlanmanın biyofilm oluşumunu anlamlı derecede artırdığını göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda planlanan çalışmada, MrkD proteininin insan BJ fibroblast hücre hattına bağlanma potansiyeli ile saf kolajenle olan etkileşimi araştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, *K. pneumoniae* suşuna ait mrkD genine özgü primerler tasarlanmış ve PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen amplikon, pET30a(+) vektörü ile uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiş ve ardından ligasyon işlemi uygulanmıştır. Bu rekombinant yapı, *E. coli* BL21 hücrelerine transforme edilmiştir. İnsan tip V kolajen, ticari olarak temin edilmiştir. Rekombinant olarak üretilen MrkD proteini, yapısına eklenen 6x His etiketi sayesinde IMAC (İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografi) yöntemi kullanılarak HPLC sistemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan proteinin Tip V kolajene bağlanabilirliği, HRP-konjuge anti-His antikoru kullanılarak doğrudan ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Böylece MrkD proteininin insan Tip V kolajene olan bağlanma kapasitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Buna ek olarak, MrkD proteininin BJ fibroblast hücrelerine bağlanma potansiyeli ve sitotoksik etkisi de hücre canlılığı testi (WST-1) analiz edilmiştir. Böylece hem bağlanma düzeyi hem de hücre sağkalımı üzerindeki etkiler ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Literatürde MrkD'nin, özellikle kolajen tip IV ve V gibi ECM proteinlerine spesifik olarak bağlanarak enfeksiyonların ilk basamağı olan kolonizasyona katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir (Tarkkanen ve diğerleri, 1990; Sebghati ve diğerleri, 1998). Nitekim *K. pneumoniae* gibi fırsatçı patojenlerin idrar yolu enfeksiyonları ve pnömoni gibi hastane kaynaklı enfeksiyonlarında Tip 3 fimbriaların önemli bir adezin komponenti olan MrkD, konak doku yüzeylerine tutunmayı sağlayarak bakterinin uzaklaştırılmasını veya fagositoza maruz kalmasını zorlaştırır (Hornick ve diğerleri, 1995; Jagnow & Clegg, 2003). Çalışmamızda, saflaştırılmış MrkD proteininin BJ fibroblast hücrelerinde uygulamasının belirgin bir sitotoksik etki yaratmadığı gözlenmiştir. WST-1 canlılık testinde MrkD uygulanan BJ fibroblast hücrelerinde canlılık oranları 4 saat sonunda kontrol grubunun yaklaşık %94'ü düzeyinde

kalmıştır. Bu sonuç, MrkD'nin doğrudan hücre ölümüne veya zarara yol açmadığını, yani esas işlevinin bir toksin değil, yapışma sağlayıcı adezin olarak rol aldığını göstermektedir. Literatürde de benzer şekilde, bakteriyel adezin ve fimbria proteinlerinin genellikle konak hücrelere doğrudan sitotoksik olmadığı, bunun yerine bakterinin hücrelere/ECM'e tutunmasını kolaylaştırdığı belirtilmektedir. Bir diğer bulgumuz ise hücre hatlarına uygulandığında reseptörlerin saturasyonuna neden olan rMrkD proteininin *K. pneumoniae*'nin fibroblast hücrelere yapışmasını belirli bir ölçüde engellediğinin gösterilmesidir. MrkD ile muamele edilmiş BJ fibroblast hücrelerine bakterinin bağlanma potansiyeli yaklaşık 1 log ($\approx$ %90) oranında azalmıştır. Bu düşüş, *K. pneumoniae*'nin bu hücre hattına tutunmasında MrkD aracılı bir mekanizmanın baskın olduğunu göstermektedir. Ortama eklenen saf MrkD proteini, konak hücre yüzeyindeki MrkD'nin hedef reseptörlerine bağlanarak, bakterinin kendi fimbrialarındaki MrkD ile yarışmalı olarak etkileşime girmesini engellemiştir olabilir. Böylece, bakteriyel adezin-reseptör etkileşimi bloke edilmiş ve bakterinin hücreye tutunması büyük oranda önlenmiştir. Hornick ve arkadaşları (1995), *mrkD* geninin silindiği mutant *K. pneumoniae* suşlarının epitel hücrelere ve diğer yüzeylere yapışma yeteneğinin vahşi tipe kıyasla ciddi oranda azaldığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Jagnow ve Clegg (2003) de Tip 3 fimbriyalı ancak yapışma yeteneği olmayan mutantların kollajen kaplı yüzeylerde biyofilm oluşturma ve tutunma kapasitesinin, adezin-yeterli suşlara göre zayıf olduğunu göstermiştir. Bizim rekombinant MrkD proteinini kullanarak elde ettiğimiz rekabetçi inhibisyon deney sonuçları, MrkD'nin konak dokudaki özgül ligandlarına (örn. kolajenlere) bağlanmasının, bakterinin yapışması için elzem olduğunu güçlü biçimde teyit etmektedir. MrkD proteininin kolajen bağlama aktivitesini doğrudan gösteren ELISA sonuçlarımız yalnızca hücrelere değil kollajen içeren yüzeylere bağlanmada da MrkD'nin etkili olduğunu göstermiştir. Saf MrkD, tip V kollajene yüksek düzeyde bağlanmış; 50 μ g/ml ve 200 μ g/ml konsantrasyonlarında elde edilen yüksek absorban değerleri ($\approx$ 1,3 ve üzeri), kollajen-MrkD etkileşiminin spesifik ve doymuş olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın BSA veya PBS ile kaplı kontrol kuyucuklarında minimal sinyal görülmüştür. Bu veriler, MrkD'nin tip V kollajene özgül bir afiniteye sahip olduğunu göstermektedir (Rêgo, ve diğerleri, 2012). Sebghati ve diğerleri, (1998), *Klebsiella* cinsinde *mrkD* geninin üç farklı aleli olduğunu ve bunların farklı bağlanma özellikleri sergilediğini bildirmiştir. Plazmid kodlu MrkD1P proteini özellikle Tip V kollajene yüksek afiniteyle tutunurken, kromozomal MrkD1C1 varyantı Tip IV ve Tip V kollajene bağlanabilmekte; buna karşılık MrkD1C2 varyantı kollajenlere bağlanamayıp sadece tannik asitle işlenmiş eritrositlere yapışarak mannoz-dirençli hemaglütinasyona neden olabilmektedir (Sebghati ve diğerleri, 1998).

Benzer şekilde, MrkD'nin adezyon engelleyici etkisi başka araştırmalarda da ortaya konmuştur. Örneğın Cui ve arkadaşları (2021), bir sığır mastiti kökenli *K. pneumoniae* suşundan klonlayıp ürettikleri rekombinant MrkD proteininin, bovin meme epitel hücrelerine bakteriyel yapışmayı anlamlı düzeyde engellediğini bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada rekombinant MrkD ile ön muamele, *K. pneumoniae*'nin epitel hücrelerine tutunmasını belirgin şekilde azaltmış; ayrıca MrkD'ye karşı geliştirilen spesifik antiserumun, bakterinin adezyonunu toplu antiseruma kıyasla daha etkin biçimde bloke ettiğini gösterilmiştir (Cui ve diğerleri,, 2021). Bizim insan fibroblast modelimizde gözlemlediğimiz yapışma azalması, bu bulgularla paralellik göstermekte ve MrkD'nin farklı konak hücre tiplerinde benzer adezyon mekanizmalarıyla bağlandığını işaret etmektedir. Kısa süreli temaslarda bile sitotoksisite oluşturmaması, MrkD bazlı aşı ya da immünoprofilaksi stratejilerinde bu antijenin güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. MrkD adezini, gerek yapısal özellikleri gerekse konak bağışıklığı tarafından tanınması bakımından, *K. pneumoniae* enfeksiyonlarına karşı aşı geliştirme çalışmalarında ilgi çekmektedir. Özellikle patojenitenin ilk adımı olan bakterinin konak dokulara tutunması, engellenebilir bir hedef olarak görölmektedir. Bu bağlamda, fimbrial adezinleri hedefleyen aşılar ve pasif immünizasyon yaklaşımları literatürde destek bulmuştur. Örneğın, *in vivo* çalışmalar *K. pneumoniae* tip 3 fimbrialarının (Mrk fimbriaları) saflaştırılmış preparatları ile aşılanan farelerin, öldürücü dozda bakteri ile yapılan solunum yolu enfeksiyonlarına karşı daha dirençli olduğunu göstermiştir (Lavender ve diğerleri,, 2005; Assoni ve diğerleri,, 2021). Benzer şekilde, rekombinant fimbria alt birimleriyle (örn. MrkA proteini) aşılanmanın da akciğer enfeksiyonu modelinde belirli düzeyde koruma sağladığını bildirilmiştir (Wang ve diğerleri,, 2016; Assoni ve diğerleri,, 2021). MrkD proteini özelinde, bu adezine karşı gelişen antikorların koruyucu olabileceğini farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Li ve arkadaşları (2009), MrkD'nin güçlü bir immünodominant antijen olduğunu ve MrkD'ye özgöl monoklonal antikorların farelerde *K. pneumoniae* enfeksiyonuna karşı korunma ile ilişkili bulunduğunu rapor etmişlerdir. Hatta MrkD proteininden belirli T-hücre epitopları da izole edilmiş; bu epitopların bazıları Th1 tipinde (örneğin IFN- γ üreten), bazılarının ise Th2 tipinde (IL-4 gibi sitokinler üreten) bağışıklık yanıtlarını uyardığını gösterilmiştir (Li ve diğerleri,, 2010)..*K. pneumoniae*'ye karşı koruyucu bağışıklığın tam olarak hangi Th yanıtlarına ihtiyaç duyduğı henüz netleşmemiş olsa da (bazı araştırmalar hem hücresel Th1 hem de humoral Th2 yanıtlarının birlikte gerektiğini önermektedir), MrkD'nin bu açıdan uygun epitoplar taşıdığı ve geniş bir immünojenik etki oluşturabildiğini anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, MrkD'yi hedef alan aşı çalışmalarında, adezine karşı dengeli bir Th1/Th2 yanıtı oluşturmak, hem antikor üretimini hem de hücresel immüniteyi tetikleyerek enfeksiyona karşı daha etkili bir koruma sağlayabilir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, *K. pneumoniae*'nin Tip 3 fimbrial adezini olan MrkD proteininin, konak hücrelere tutunma ve ECM (ekstraselüler matriks) bileşenlerine bağlanma yoluyla bakterinin virülansında kritik bir rol oynadığını desteklemektedir. Elde ettiğimiz bulguları *K. pneumoniae*'nin patogenezi bağlamında değerlendirdiğimizde, MrkD aracılı yapışmanın enfeksiyonlarda oynadığı kilit rol netlik kazanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *K.K. pneumoniae*'nin önemli adezinlerinden biri olan MrkD proteini rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak üretilip insan BJ fibroblast hücreleri ile Tip V kolajen üzerindeki biyolojik etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, MrkD proteininin hem dokuya özgü bağlanmada hem de potansiyel terapötik hedef olarak önemini ortaya koymaktadır. Rekombinant MrkD proteininin fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi WST-1 yöntemi ile değerlendirilmiş ve 1., 2. ve 4. saatlerde sırasıyla %96,26, %95,57 ve %94,02 oranlarında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, MrkD'nin insan fibroblast hücreleri üzerinde anlamlı bir toksisite oluşturmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, MrkD proteini ile muamele edilen fibroblast hücrelerinde *K. pneumoniae*'nin adezyon kabiliyeti kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 0,85 log (yaklaşık %90) oranında azalmıştır. Bu bulgu, rekombinant MrkD'nin, konak hücre üzerindeki özgül bağlanma bölgelerini işgal ederek bakteri bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ettiğini düşündürmektedir. Ayrıca, yapılan ELISA analizlerinde 50 ve 200 µg/mL MrkD uygulanan gruplarda yüksek absorbans değerleri (sırasıyla 1,388 ve 1,332) elde edilirken, negatif kontrol gruplarında bu değerlerin oldukça düşük olması (PBS: 0,072; BSA: 0,081) MrkD'nin Tip V kolajene yüksek afiniteyle bağlandığını göstermiştir. Bu kapsamda, bu çalışmada ilk kez rekombinant MrkD proteini kullanılarak insan fibroblast hücre hattında yapılan in vitro analizlerle bu proteinin spesifik bağlanma kapasitesi, sitotoksik etkisizliği ve kolajene afinitesi gösterilmiştir. Ayrıca, MrkD'nin hücrelere bakteriyel tutunmayı engelleyici etkisi doğrudan sayısal olarak ortaya konmuştur. Bu sonuçlara dayanarak, MrkD proteini hem adezin inhibitörleri geliştirilmesi hem de aşı stratejileri için değerlendirilebilecek potansiyel bir biyolojik hedef olarak öne çıkmaktadır. İlerleyen çalışmalarda MrkD'nin *in vivo* hayvan modellerinde immünojenik ve koruyucu etkilerinin test edilmesi bu hedefin klinik uygulamalara aktarılması açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca, rekombinant MrkD ile geliştirilecek antikörlerin, yüksek virülansla *K. pneumoniae* suşlarında terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi, anti-adezyon temelli yenilikçi tedavi yaklaşımlarına zemin hazırlayabilir.

Bu bulgular, MrkD'nin gelecekte yapışma önleyici tedaviler veya *K. pneumoniae* enfeksiyonlarına karşı aşı geliştirme için umut verici bir aday olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, R., Chakkour, M., Zein El Dine, H., Obaseki, E. F., Obeid, S. T., Jezzini, A., & Ezzeddine, Z. (2024). General overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the role of siderophores in its pathogenicity. *Biology*, 13(2), 78. <https://doi.org/10.3390/biology13020078>
- Ahmed, S., & Riaz, M. (2020). Recombinant DNA technology: Technique and applications in modern era. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00055-1>
- Alasedi, K., Almurisi, S. H., & Yahya, E. B. (2021). The epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: A review. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/351117474>
- Aloke, C., & Achilonu, I. (2023). Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. *Microbial Pathogenesis*, 175, 105963. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.105963>
- Alwan, A. H., & Abass, S. M. (2016). The effects of UV light on *mrkA*, *mrkD* genes in local isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 27(4), 1–7.
- Ansari, S., Hameed, A., Fatima, F., & Qureshi, M. A. (2024). Study of virulence factors and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Indian Journal of Microbiology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01247-0>
- Assoni, L., Siqueira, N. M., Martins, F. H., Dambrozio, J. A., Valiatti, T. B., & Ferreira, R. S. (2021). Protection against pneumonia induced by vaccination with fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Vaccines*, 9(5), 464. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050464>
- Bellifa, S., Hassaine, H., Balestrino, D., Charbonnel, N., M'hamedi, I., Terki, I. K., & Forestier, C. (2013). Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(49), 5558–5564. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6191>
- Bhukta, P., Dey, S., & Mandal, S. M. (2022). Antibiotic resistance mechanism of ESKAPE pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1029098.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1029098>

- Carneiro, V. A., Cunha, M. T. S. S., Lopes, F. F., & Albuquerque, R. C. (2022). Antibacterial resistance and the use of antimicrobial peptides as an alternative therapy in ESKAPE pathogens. *Antibiotics*, 11(8), 1160. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081160>
- Chang, D., Sharma, L., Dela Cruz, C. S., & Zhang, D. (2021). Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662>
- Chen, T.-A., Chuang, Y.-T., & Lin, C.-H. (2023). A decade-long review of the virulence, resistance, and epidemiological risks of *Klebsiella pneumoniae* in ICUs. *Antibiotics*, 12(9), 1401. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091401>
- Cui, Q., Zhou, Y., Guo, T., Wu, C., Wang, Y., Tian, G., & Hao, Y. (2021). Prokaryotic expression of MrkD gene of *Klebsiella pneumoniae* isolated from cow mastitis and its effect on adhesion to mammary epithelial cells. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 43(12), 1312–1318.
- Cusumano, C. K., Pinkner, J. S., Han, Z., Greene, S. E., Ford, B. A., Crowley, J. R., & Hultgren, S. J. (2011). Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Science Translational Medicine*, 3(109), 109ra115. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003021>
- Dale, J. L., Cagnazzo, J., Phan, C. Q., Barnes, A. M., & Dunny, G. M. (2015). Multiple roles for *Enterococcus faecalis* glycosyltransferases in biofilm-associated antibiotic resistance, cell envelope integrity, and conjugative transfer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 4094–4105. <https://doi.org/10.1128/aac.00344-15>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Douradinha, B. (2024). Exploring the journey: A comprehensive review of vaccine development against *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiological Research*, 287, 127837. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127837>
- Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00359-9>
- Fliss, M., van den Berg, C. H., Kuijper, E., Notermans, D. W., Hendrickx, A. P., Schoots, M.

- H., & Bathoorn, E. (2022). Brief report: Community-acquired Friedlander's pneumonia and pulmonary metastatic *Klebsiella pneumoniae* infection caused by hypervirulent ST23 in The Netherlands. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(8), 1133–1138. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04470-z>
- Foroogh, N., Rezvan, M., Ahmad, K., & Mahmood, S. (2021). Structural and functional characterization of the FimH adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* and its novel applications. *Microbial Pathogenesis*, 161, 105288. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105288>
- Friedländer, C. (1882). Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Virchows Archiv*, 87, 319–324. <https://doi.org/10.1007/BF01881043>
- Gonzalez-Ferrer, S., Peñaloza, H. F., Budnick, J. A., Bain, W. G., Nordstrom, H. R., Lee, J. S., & Van Tyne, D. (2021). Finding order in the chaos: Outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 17(12), e1010151. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010151>
- Guglielmo, A., Ascenzioni, F., & Colone, M. (2023). Targeting bacterial adhesins: An anti-virulence strategy for the prevention and treatment of biofilm-associated infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4872. <https://doi.org/10.3390/ijms24054872>
- Hakansson, A. P., Orihuela, C. J., & Bogaert, D. (2018). Bacterial-host interactions: Physiology and pathophysiology of respiratory infection. *Physiological Reviews*, 98(2), 781–811. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2016>
- He, M., Li, H., Zhang, Z., Jiang, J., Li, H., Yang, W., & Wang, F. (2022). Microbiological characteristics and pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Hainan black goat. *Veterinary Sciences*, 9(9), 471. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090471>
- Hornick, D. B., Thommandru, J., Smits, W., & Clegg, S. (1995). Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 63(5), 2026–2032. <https://doi.org/10.1128/iai.63.5.2026-2032.1995>
- Hultgren, S. J., Arvidson, S., & Normark, S. (2006). Bacterial adhesins and their role in pathogenesis. *Cell*, 124(4), 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
- Ireland, P. M., McMahon, R. M., Marshall, L. E., et al. (2014). Disarming *Burkholderia pseudomallei*: Structural and functional characterization of a DsbA enzyme required for

- bacterial virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 29270–29285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587063>
- ISAAA. (2023). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2022. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. <https://www.isaaa.org>
- Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1991). More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1697–1704. <https://doi.org/10.1128/aac.35.9.1697>
- Jagnow, J., & Clegg, S. (2003). *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix and collagen-coated surfaces. *Microbiology*, 149(9), 2397–2405. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26241-0>
- Khan, S., Tzitzilonis, C., Maresca, A., Faisal, M., Saeed, M., Tserkezou, P., & Papageorgiou, A. C. (2023). Structure-based analysis of type 3 fimbrial major subunit MrkA from *Klebsiella pneumoniae* reveals potential binding sites and conservation hotspots. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 91(9), 1014–1025. <https://doi.org/10.1002/prot.26689>
- Krachler, A. M., & Orth, K. (2013). Targeting the bacteria–host interface: Strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*, 4(4), 284–294. <https://doi.org/10.4161/viru.24606>
- Kumkar, S. N., Kamble, E. E., & Pardesi, K. R. (2023). Recent advances and strategies to combat the ESKAPE pathogens. *Microorganisms*, 12(12), 2548. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122548>
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>
- Li, Y., Han, W., Li, Z., & Lei, L. (2009). *Klebsiella pneumoniae* MrkD adhesin-mediated immunity to respiratory infection and mapping the antigenic epitope by phage display library. *Microbial Pathogenesis*, 46(3), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.12.010>
- Li, Y., Li, Z. J., Han, W. Y., Lei, L. C., Sun, C. J., Feng, X., & Gu, J. M. (2010). Identification and characterization of Th cell epitopes in MrkD adhesin of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 49(1–2), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.04.002>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2020). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Frontiers in Microbiology*, 11, 928.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>

- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology*, 26(12), 944–956. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.005>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2021). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662>
- Martin, R. M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., Malani, P. N., Rao, K., & Bachman, M. A. (2016). Antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 63(7), 952–959. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw411>
- McMahon, R. M., Premkumar, L., Martin, J. L., & Adler, B. (2021). Disulfide bond forming pathways in Gram-negative bacteria: Role of DsbA and potential as a target for antivirulence therapeutics. *Future Microbiology*, 16, 349–364. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0296>
- Mendes, G., Santos, M. L., Ramalho, J. F., Duarte, A., & Caneiras, C. (2023). Virulence factors in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1325077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1325077>
- Miller, W. R., & Arias, C. A. (2024). ESKAPE pathogens: Antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nature Reviews Microbiology*, 22(10), 598–616. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-00856-2>
- Monteiro, A. d. S. S., Cordeiro, S. M., & Reis, J. N. (2024). Virulence factors in *Klebsiella pneumoniae*: A literature review. *Indian Journal of Microbiology*, 64, 389–401. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01345-z>
- Monzon, V., & Bateman, A. (2022). Large scale discovery of microbial fibrillar adhesins and identification of novel members of adhesive domain families. *Journal of Bacteriology*, 204(6), e0010722. <https://doi.org/10.1128/jb.00107-22>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Joseph, J., & Patil, S. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Murphy, C. N., & Clegg, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: Nosocomial

- infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiology*, 7(8), 991–1002. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- NCBI Taxonomy Browser. (2024). *Klebsiella pneumoniae* taxonomy ID: 573. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=573>
- Oliveira, J., & Reygaert, W. C. (2025). Gram-negative bacteria. In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538213/>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Patil, S., Deshmukh, R., Jagtap, P., & Pawar, S. (2022). Recent advances to combat ESKAPE pathogens with special emphasis on biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1029098. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1029098>
- Pecoraro, M. G., Maiorano, G., Giannossa, L. C., Verri, T., & Amodeo, V. (2023). Anti-adhesion and antivirulence approaches against Gram-negative pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4872. <https://doi.org/10.3390/ijms24054872>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Rana, S., Fatima, N., Yaqoob, S., Hameed, A., Mirza, M. R., Jabeen, A., & Iqbal, J. (2022). Probing photoprotection properties of lipophilic chain conjugated thiourea-aryl group molecules to attenuate ultraviolet-A induced cellular and DNA damages. *Scientific Reports*, 12(1), 20907. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24420-4>
- Rêgo, A. T., Johnson, J. G., Geibel, S., Enguita, F. J., Clegg, S., & Waksman, G. (2012). Crystal structure of the MrkD1P receptor binding domain of *Klebsiella pneumoniae* and

- identification of the human collagen V binding interface. *Molecular Microbiology*, 86(4), 882–893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08229.x>
- Roque-Borda, C. A., Primo, L. M. D. G., Franzyk, H., Hansen, P. R., & Pavan, F. R. (2024). Recent advances in the development of antimicrobial peptides against ESKAPE pathogens. *Heliyon*, 10(11), e23047. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e23047>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Russo, T. A., Olson, R., MacDonald, U., Beanan, J., Davidson, B. A., & Baker, P. J. (2014). Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron limitation in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*, 5(3), e01035-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.01035-13>
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). *Sherris medical microbiology* (4th ed.). McGraw Hill.
- Sarshar, M., Behzadi, P., Ambrosi, C., Zagaglia, C., Palamara, A. T., & Scribano, D. (2020). FimH and anti-adhesive therapeutics: A disarming strategy against uropathogens. *Antibiotics*, 9(7), 397. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070397>
- Sebghati, T. A., Korhonen, T. K., Hornick, D. B., & Clegg, S. (1998). Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection and Immunity*, 66(6), 2887–2894. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2887-2894.1998>
- Shokri, M. S., Abbas, H. A., Yousef, N., & Saleh, M. M. (2023). Crippling of *Klebsiella pneumoniae* virulence by metformin, N-acetylcysteine and secnidazole. *BMC Microbiology*, 23, 229. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03094-z>
- Shon, A. S., Bajwa, R. P. S., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
- Singh, J. S., Pandey, V. C., Singh, D. P., & Singh, R. P. (2022). Environmental biotechnology: Current advances and future prospects. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102127. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102127>
- Smith, C. A., Jones, R. M., & Wang, J. (2024). Targeting trimeric autotransporter adhesins for novel anti-virulence therapy against *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Immunity*, 92(1), e00348-24. <https://doi.org/10.1128/iai.00348-24>

- Soares-da-Silva, I., Santos, M. M. M., & Salvador, J. A. R. (2022). The DsbA–DsbB system as a target for the development of novel anti-virulence agents. *Biochemical Pharmacology*, 195, 114842. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114842>
- Stahlhut, S. G., Chattopadhyay, S., Kisiela, D. I., Hvidtfeldt, K., Clegg, S., Struve, C., Sokurenko, E. V., & Krogfelt, K. A. (2013). Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. *Journal of Bacteriology*, 195(11), 2452–2463. <https://doi.org/10.1128/JB.00173-13>
- Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and Immunity*, 76(9), 4055–4065. <https://doi.org/10.1128/IAI.00459-08>
- Tacconelli, E. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., ... & Magrini, N. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tarkkanen, A. M., Virkola, R., Korhonen, T. K., Holthofer, H., Parkkinen, J., Finne, J., & Clegg, S. (1990). Type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*: Molecular cloning and role in bacterial adherence to collagen. *Molecular Microbiology*, 4(8), 1311–1318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00603.x>
- Telli, M. (2022). *Klebsiella pneumoniae* klinik suşlarında, 2012–2020 yılları arasında karbapenem direnç oranlarındaki değişimin ve direnç genlerinin araştırılması. *Turkish Journal of Medical Microbiology*, 52(2), 95–102. <https://doi.org/10.5222/turkjm.2022.65202>
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., & Tümmler, B. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, 151(5), 1313–1323. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27701-0>
- Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012).

- Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682–707. <https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>
- van Duin, D., & Bonomo, R. A. (2016). Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam: Second-generation β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Clinical Infectious Diseases*, 63(2), 234–241. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw243>
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, 36(12), 1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- Wang, L., Jiang, S., Wang, J., & Xu, Y. (2016). Assessment of protective efficacy induced by intranasal immunization with MrkA, the major subunit of type 3 fimbriae from *Klebsiella pneumoniae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(10), 836–844. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0143>
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2020). *Recombinant DNA: Genes and genomes – A short course* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2020). *Molecular biology of the gene* (7th ed.). Pearson.
- World Health Organization. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>
- Wu, C. C., Lin, C. T., Cheng, W. Y., & Huang, C. F. (2010). *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae contribute to bacterial biofilm formation and resistance to environmental stress. *Microbial Pathogenesis*, 49(2), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.04.001>
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>

Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence factors in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 751913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751913>

National Cancer Institute. (2019). *Taking time: Support for people with cancer* (NIH Publication No. 18-2059). U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Rekombinant MrkD Proteininin Fibroblast Hücrelerine ve Kolajene Adezyondaki Rolünün Belirlenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Asya Gülistan ORBAYOĞLU

... / ... / ...