



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

LOKAL PSEUDOMONAS SUŞUNDAN ANTİKANSER PROTEİNİ
KODLAYAN AZURİN GENİNİ (AZU) MOLEKÜLER TARAMA VE
KLONLAMA

SHYMAA FADHEL ABBAS AL-ANBAGI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2022



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

LOKAL PSEUDOMONAS SUŞUNDAN ANTİKANSER PROTEİNİ
KODLAYAN AZURİN GENİNİ (AZU) MOLEKÜLER TARAMA VE
KLONLAMA

SHYMAA FADHEL ABBAS AL-ANBAGI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr.Murat ÇANLI
İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Abdulameer M. GHAREEB

KIRŞEHİR / 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

SHYMAA FADHEL ABBAS AL-ANBAGI



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Başlangıçta, hamd ve şükür Allah'a mahsustur, bu işi tamamlamanın tüm itibarı O'na aittir. Bu tezin hazırlanmasından tamamlanmasına kadar geçen süreçte bana yardımcı olan herkese ve tamamlanmasında emeği geçen herkese teşekkür ve teşekkürlerimi sunarım. Bana öğrettiğiniz her şey için çok minnettarım sevgili hocalarım

Doç. Dr.Murat ÇANLI, Dr. Öğr. Üyesi. Abdulameer M. GHAREEB, Dr. Öğr. Üyesi Saif ALAHMER, Prof. Dr. Ahmed JASIM

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen saygıdeğer aileme teşekkür ve teşekkürlerimi sunarım. Sevgili kocam, sen benim nimetim, saadetim, gönlümün esenliği ve ruhumun güvencesi oldun. Allah, canım annem ve babam sizi benim adıma mükafatlandırın. Sevgili çocuklarım Son olarak yakın arkadaşlarım Mohammed Qasim ve Dr. Ahmed Hussein'e emekleri için teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum. Yanımdaki güçlü duruşlarını ve çalışma aşamalarındaki desteklerini asla unutmayacağım. Hayatımdaki varlığınız için her zaman Tanrı'ya şükrettim.

Mart, 2022

SHYMAA FADHEL ABBAS ALANBAGI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ BİLDİRİMİ	i
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
1.1.Çalışmanın Amacı.....	3
1.2. Tezin Önemi	4
2. LİTERATÜR İNCELEMESİ	5
2.1. Pseudomonas Geçmişi:	5
2.1.1. Pseudomonas Aeruginosa'nın Epidemiyolojisi.....	5
2.1.2. Pseudomonas Aeruginosa: Tehlikeli Bir Fırsatçı Patojen	6
2.1.3. Pseudomonas Aeruginosa'nın Genetiği	6
2.1.4. P. Aeruginosa Ve Enfeksiyonlar:.....	7
2.1.5. P. Aeruginosa'nın Patojenitesi Ve Virülans Faktörleri	7
2.1.6. Bakteriyel Proteinler/Peptitler	9
2.1.7. Bakır Protein Sınıfları	10
2.1.8. Mavi Bakır Proteinlerinin Özellikleri	11
2.1.9. Tür I Bakır Proteininin Sınıflandırılması.....	11
2.2. AZURİNLER.....	11
2.2.1. Azurin Bakır Merkezinin Mutajenezi.	12
2.2.2. Azurin	13
2.2.3. P28	14
2.2.4. Azurin'in Potansiyel Terapötik İlacı	14
2.3. Dünyada Kanser Prevalansı	15
2.3.1. Kanser Nedenleri:	15
2.3.2. Kanser Türleri:	15
2.3.3. Büyüyen Kanser:.....	16

2.3.4. P53 Tümör Baskılayıcı Gendeki Mutasyonlar.....	16
2.3.5. Kanser Yayılımı:.....	17
2.3.6. Kanser Tedavisi Türleri:	17
2.3.7. Kanser Tedavisinde Azurin Uygulaması	20
2.4. Azurin Ve Kanser	20
2.4.1. Bakteriyel Protein Azurin	20
2.4.2. Azurin Salgılanması Ve Konak Hücrelerle Etkileşimi	21
2.4.3. Azurin'in Kanser Hücrelerine Etkisi	22
2.4.4. Azurin Ve P53 Etkileşimi	22
2.4.5. Azurin Ve Eph Reseptör Etkileşimi.....	23
3. MATERYALLER VE YÖNTEM:.....	24
3.1. Malzemeler	24
3.1.1 Konu:	24
3.1.2. Ekipman ve Aletler	24
3.1.3.Kimyasallar	26
3.1.4. Kültür Medyası	28
3.1.5. Kitler	29
3.1.6. Çözümler Ve Tamponlar	29
3.1.6.1. Oksidaz Reaktifi:	29
3.1.6.3. Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi (10N)	30
3.1.6.4. Etidyum Bromür Solüsyonu	30
3.1.6.5. Standart Bulanıklık Çözümü (Mcfarland Tüp No. 0.5).....	30
3.1.6.7. Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (50mm).....	30
3.1.6.8. Tris Borat Edta Tampon 1x (Tbe 1x).....	30
3.1.6.9. Protein Saflaştırma Tamponları Ve Çözümleri	30
3.1.6.10. İyonik Değişim Çözümleri.....	31
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Sterilizasyon Yöntemleri	31
3.2.2. Kültür Medyasının Hazırlanması	31
3.2.3. Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarının Korunması.....	31
3.2.3. Numunelerin Toplanması	32
3.2.4. Pseudomonas Aeruginosa Teşhisi	32
3.2.4.1. Manuel Teşhis.....	32
3.2.4.2. Hızlı Otomatik Teşhis.....	33
3.2.4.3. Pseudomonas Aeruginosa'nın Moleküler Tanımlanması.....	33

3.2.5. Pseudomonas Aeruginosa'nın Antibiyotik Duyarlılığı	34
3.2.6. Moleküler Analiz	34
3.2.6.1. Dna Ekstraksiyonu	34
3.2.6.2. Tris Borat Edta Tampon 1x (Tbe 1x).....	35
3.2.6.3. Agaroz Jelin Hazırlanması (Sambrook Ve Diğerleri, 1989).....	35
3.2.6.4. DNA Merdiveni	35
3.2.6.5. Astar Hazırlama ve Saklama.....	36
3.2.6.6. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Tahmini.....	36
3.2.7. Pseudomonas Aeruginosa'nın Azu Geninin Moleküler Taraması.	36
3.2.7.1. PCR Programı	37
3.2.7.2. Primer Seçimi	37
3.2.8. Bakteriyel Suşlar ve Vektörler.....	38
3.2.9. E. Coli Kimyasal Olarak Yetkin Hücrelerin Hazırlanması.....	39
3.2.10. E. Coli'nin Kimyasal Olarak Yetkin Hücrelerinin Dönüşümü	39
3.2.11. Pseudomonas Aeruginosa Yerel Suşundan Azurin (Azu) Kodlayan Genin Klonlanması	40
3.2.12. Pet-28a (+) /Azu Yapılarının E. Coli BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerine Dönüştürülmesi.....	40
3.2.13. Pet-28a (+) /Azu Yapılarını Barındıran E. Coli BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerinin Transformantlarının Taranması	41
3.2.14. Azu Geninin Aşırı İfadesi	41
3.2.15. Azurin Proteininin Saflaştırılması	41
3.2.15.1. Hücre Hasadı ve Bozulması.....	41
3.2.15.2. Dietil Kullanarak İyon Değişimi İle Ayırma Aminoetil-Selüloz (DEAE- Selüloz)	42
3.2.16. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.	42
3.2.17. Standart Eğri Sığır Serum Albümini (Bsa).....	42
3.2.18. İstatistiksel Analiz.....	43
4. BULGULAR	43
4.1. Bakteriyel İzolasyon Ve Tanımlama:	43
4.1.1. Numunelerin Toplanması Ve İzolasyonu:	43
4.2. Pseudomonas Aeruginosa'nın Tanımlanması	44
4.2.1. Geleneksel Tanı.	44
4.2.2 Vitek2 Sistemini Kullanarak Tanımlama	45
4.2.3. Pseudomonas Aeruginosa'nın Antibiyotik Duyarlılığı	45
4.2.4. Pseudomonas Aeruginosa'nın Moleküler Tanımlaması.....	47

4.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	47
4.2.4.2. DNA Konsantrasyonu Ve Saflığının Tahmini.....	48
4.2.4.3. Temizlik Gyra Genini Hedefleyen PCR Tespiti.....	48
4.2.4.4. Azu Geninin Moleküler Tespiti.....	49
4.3. PCR Ürünlerinin Sıralanması (azu geni):.....	50
4.3.1. Pet-28a (+) /Azu Yapılarının Sırası.....	57
4.3.2. PET-28a (+) /Azu Yapılarının Mlu1 Ve Xho1 İle Çift Kısıtlamalı Sindirim Modeli.....	62
4.3.3. Azurin Proteininin Saflaştırılması.....	62
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	65
6. KAYNAKLAR.....	67
EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1	Yapı modeli: (a) Azurin; (b) s28	10
Şekil 2	Süperoksit dismutaz ve galaktoz oksidazın tip II bakır pozisyonları.....	10
Şekil 3	azurin geni hakkında yapısal bilgi.....	12
Şekil 4	Kanser yayılımı	17
Şekil 5	Pseudomonas aeruginosa'dan azurinin Apo formu	21
Şekil 6	Azurin yapısı: (A) azurin proteininin üç boyutlu yapısı. (B) Azurin proteininin bakır içeren alanı	22
Şekil 7	Azurin etki mekanizması.....	23
Şekil 8	Meme kanseri hücrelerinde büyüme inhibisyonunun indüklenmesinde azurinin mekanizmalarının türü.	24
Şekil 9	pET-28a vektörü için şematik yapı	39
Şekil 10	Sığır Serum Albümin Konsantrasyonunun Standart Eğrisi, 595 nm'de Absorbans	43
Şekil 11	Pseudomonas aeruginosa izolatları için antibiyotik duyarlılık kalıpları	47
Şekil 12	Pseudomonas aeruginosa izolatlarının ekstrakte edilmiş DNA'sının jel elektroforezi. Şerit 1: DNA merdiveni, Şerit 2-5: Çıkarılan DNA. (1 saat boyunca 5 volt/cm'de %1 agaroz jeli	47
Şekil 13	gyrA geni için PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit M: 100bp DNA merdiveni; şeritler (SH3, SH5, SH10, SH19 ve SH30) (%2 Agarose, 5V/cm ve 2 saat için. Beklenen boyut 120 bp)	49
Şekil 14	azu geni için PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit M: 100bp DNA merdiveni; şeritler (SH3, SH5, SH10, SH19 ve SH30) (%2 Agarose, 5V/cm ve 2 saat için. Beklenen boyut 500 bp)	49
Şekil 15	rekombinant yapı pET-28a'nın haritası (+)	60
Şekil 16	GenScript Co., tarafından sentezlenen rekombinant yapı pET-28a (+) /Azu referansının haritası. Azu geninin eklenmesinden sonra rekombinant plazmitin tam uzunluğu 5677 bp'dir.....	61
Şekil 17	Agaroz jel elektroforezi (%1), MluI ve XhoI ile lokal olarak pET-28a (+)/Azu'nun kısıtlama sindirimi modelini gösterir	62
Şekil 18	Yabani suştan saflaştırılmış (Azurin proteini) için UV-Vis Spektrofotometre tepe grafiği DEAE selüloz kolonu (2 X 8) cm aracılığıyla İyon değişim kromatografisi üzerine (Sütun 50 mM Tris-baz pH 8, akış hızı 60 ml/saat ve 5 ml fraksiyon ile kalibre edilmiştir).	63
Şekil 19	Lokal suşlardan saflaştırılmış (azurin proteini) için UV-Vis Spektrofotometre tepe noktaları.....	63
Şekil 20	SDS-PAGE analizi, aşırı ekspresyonun ardından BL21/DE3-(pET28a-azu)'dan azu aşırı ekspresyonu. şerit 3-8 - indüksiyondan 1, 2, 3, 4, 6 ve 16 saat sonra. Elektroforez, 80 dakika boyunca 60 mA'da %15 poliakrilamid jel içinde gerçekleştirildi.....	64

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1 P. aeruginosa'nın bazı virülans faktörleri	9
Çizelge 2 Bakteri proteinleri/peptidleri olarak azurin ve p28'in kökeni ve antikanser aktivitesi	9
Çizelge 3 tür bakır 1 proteinlerinin bazı kategorileri	11
Çizelge 4 Tanımlanan Azurinlerin Özellikleri	12
Çizelge 5 P. aeruginosa'da azurinin metiyonin mutantları arasındaki spektroskopik varyasyonlar	13
Çizelge 6 Bu çalışmada kullanılan ekipman ve enstrümanlar ile firmalar ve menşei.....	25
Çizelge 7 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ile firmalar ve menşei	26
Çizelge 8 Bu çalışmada kullanılan kültür ortamları ile firmalar ve menşei.....	28
Çizelge 9 Bu çalışmada kullanılan kitler firmalar ve menşei ile birlikte	29
Çizelge 10 aeruginosa'nın azu geninin saptanması için PCR programı	37
Çizelge 11 Azu geninin primerlerinin adı, dizisi ve beklenen boyut ürünü.....	38
Çizelge 12 Pseudomonas aeruginosa aeruginosa izolatları için antibiyotik duyarlılık paternleri	45
Çizelge 13 Lokal P. Aeruginosa'da azu gen dizisindeki mutasyonlar.....	50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
DEAE	: Diethylaminoethyl cellulose
LB	: Luria- Bertani
IPTG	: Isopropyl B-D-1-Thiogalactopyranoside
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
UTI	: Urinary Tract İnfection
CF	: Cystic Fibrosis
MDR	: Multiple Drug Resistance
LPS	: Lipopolysaccharide
T3SS	: Type Three Secretion System
EPhB2	: Ephrin Type-B Receptor 2
MCF	: Michigan Cancer Foundation-7
CDK2	: Cyclin-Dependent Kinase 2
CNS	: Central Nervous System
Anti HIV	: Anti-Human Immunodeficiency Virus
HLA	: Human Leukocyte Antigen System
PTD	: Protein Transduction Domain
BAX	: Bcl-2-Associated X Protein
NRTK	: Non-Receptor Tyrosine Kinase

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LOKAL PSEUDOMONAS SUŞUNDAN ANTİKANSER PROTEİNİ KODLAYAN AZURİN GENİNİ (AZU) MOLEKÜLER TARAMA VE KLONLAMA.

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES GENETICS AND
BIOENGINEERING DEPARTMENT

Danışman: Doç. Dr. Murat ÇANLI

Kanser dünyada önde gelen ölüm nedenidir. Yaygın tedavi protokollerinin çoğunun sınırlamaları ve sakıncaları vardır. Bu nedenle, etkili kanser tedavileri bulmak birçok araştırmacının hedefidir. Terapötik peptitler, proteinler, antikolar dahil olmak üzere geleneksel farmasötiklere göre sayısız fayda sağlayan umut verici bir ilaç sınıfıdır. Özellikle *Pseudomonas aeruginosa*'dan üretilen Azurin, çeşitli kanser hücrelerinde antikanser etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Klinik örnekleri, Nisan 2021'in başından Temmuz 2021'in sonuna kadar Bağdat'taki ana hastanelerden toplandı. Hem cinsiyet hem de farklı yaş gruplarını içeren 150 hastadan yanık, kulak, yara sürüntüsü, balgam ve idrar örnekleri alındı, hastaların yaşları 10-68 arasındaydı. Daha önce konvansiyonel biyokimyasal testler ile tanımlanmış olan *P.aeruginosa* izolatlarının tanımlanmasını doğrulamak için VITEK 2 kompakt sistem ve PCR kullanılmıştır. Bu çalışma için bakteriyel izolatların konvansiyonel teşhisinin sonuçları, numunelerden 30'unun (%20) *P.aeruginosa* enfeksiyonları için pozitif sonuç verdiğini göstermiştir. Bu çalışmanın antibiyotik duyarlılık testi sonuçları, 16'sının (%44,44) 12 farklı antibiyotiğe dirençli olduğunu gösterdi. Bu çalışmada, bir Irak yerli suşu *Pseudomonas aeruginosa*'dan (Shiraq2) spesifik primerler ile PCR kullanarak azu genini bir ekspresyon vektörüne (pET28a) klonlayabildik ve IPTG ile indüksiyon olduktan sonra onu *E. coli* (BL-21/DE3) Rosetta'da eksprese edebildik. Azu dizisini sağlamak için amplikon azu geni (~500 bp) dizilendi ve Genscript Co., ABD tarafından sentezlenmeye gönderildi. Azu gen dizisinin, *P. aeruginosa* türü PA01 ile yüzde 99 özdeş olduğu bulundu. Protein saflaştırması, İyonik değişim kromatografisi (DEAE-selüloz) kullanılarak yapıldı. Proteinin aşırı eksprese edildiğini göstermek ve moleküler ağırlığını ölçmek için SDS-PAGE analizi kullanıldı. 14 kDa'ya tekabül eden kalın bir bandın görünümü, azurin proteininin etkili aşırı ekspresyonunu doğruladı. Saflaştırılmış azurin, sırasıyla 1637.35 cm⁻¹ ve 1641.5 cm⁻¹ civarında bir zirveye sahiptir. Sonuç olarak, azurin geni başarıyla klonlandı ve eksprese edildi. Yerel *Pseudomonas aeruginosa*'dan türetilen Azurin, gelecekte antikanser ve antibakteriyel araştırmalarda kullanılacaktır

2022, 95.Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas*; Rekombinant proteinler; Azurin

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

Molecular screening and cloning the Azurin gene (*azu*) encoding Anticancer Protein from local *Pseudomonas* strain

SHYMAA FADHEL ABBAS AL-ANBAGI

Kırsehir Ahi Evran University

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES GENETICS AND
BIOENGINEERING DEPARTMENT

Supervisor: Prof. Dr. Assoc. Dr. Murat ÇANLI

Cancer is the leading cause of death in the world. Most of the common treatments' protocols have limitations and drawbacks. Thus, finding effective cancer treatments is the goal of many researchers. Therapeutic peptides are a promising class of medicines that offer numerous benefits over traditional pharmaceuticals including proteins, antibodies. Azurin, in particular produced from *Pseudomonas aeruginosa* has been shown to have anticancer action in a variety of cancer cells. The clinical specimens were collected from main hospitals in Baghdad from beginning of April 2021 to end of July 2021. burn, ear, wound swabs, sputum and urine samples were obtained from 150 patients include both gender and different age groups, the patient's age was between 10-68 years. VITEK2 compact system and PCR was employed for confirming the identification of *P. aeruginosa* isolates that were previously identified by conventional biochemical tests. The results of conventional diagnosis of bacterial isolates for the present study showed that 30 (20%) out of specimens were given a positive result for *P. aeruginosa* infections. The results of antibiotic susceptibility test of this study showed that 16 (44.44%) were resistant for 12 different types of antibiotics. In this study, we were able to clone the *azu* gene using PCR with specific primers from an Iraqi indigenous strain *Pseudomonas aeruginosa* (Shiraq2) into an expression vector (pET28a) and express it in *E. coli* (BL-21/DE3) Rosetta after induction with IPTG. The amplicon *azu* gene (~500 bp) was sequenced to provide the *azu* sequence and submitted to synthesized by Genscript Co., USA. The *azu* gene sequence was found to be 99 percent identical to that of *P. aeruginosa* strain PA01. Protein purification was done using Ionic exchange chromatography (DEAE-cellulose). SDS-PAGE analysis was used to show that the protein was overexpressed and to quantify its molecular weight. The appearance of a thick band corresponding to 14 kDa confirmed the effective overexpression of azurin protein. Purified azurin has a peak near 1637.35 cm⁻¹ and 1641.5 cm⁻¹, respectively. As a result, the azurin gene was successfully cloned and expressed. Azurin derived from local *Pseudomonas aeruginosa* will be employed in anticancer and antibacterial investigations in the future.

2022, 95. Pages

Keywords. *Pseudomonas*; Recombinant proteins; Azurin

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa önemli bir fırsatçı patojendir ve solunum yolu enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları dahil olmak üzere hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olarak kabul edilir [1]. *Pseudomonas* cinsi yüzden fazla türden oluşur, Bununla birlikte, *aeruginosa* türleri en sık insan enfeksiyonu ile ilişkilidir. *P. aeruginosa*, vücudu ve bağışıklık sistemini istila eden ve tedavisi neredeyse zor olan enfeksiyonlarla sonuçlanan çeşitli hastalıklara neden olabilir [2]. Bu patojen, çeşitli virülans faktörlerine sahip olması nedeniyle yüksek düzeyde patogenez sergiler. Bu faktörler iki ana gruptan oluşmaktadır; birinci grup hücre ile ilişkili faktörleri (örneğin adezyonlar, aljinat ve lipopolisakkaritler) içerirken, ikinci grup hücre dışı faktörleri (örneğin ekzotoksin A, hemolizinler, demir bağlayıcı proteinler ve proteazlar) içerir [3]. *P. aeruginosa* üreten çoklu ilaca dirençli suşlar arasında antibiyotik direncinin artırılması Hastanelerde farklı birimler arasında bu tip suşların görülme sıklığı artmıştır [4]. Psödomonaslarda virülans sistemlerine ait temel unsurlardan biri de protein ve peptit üretmektir. Ancak bu moleküller antikanser ve antimikrobiyal etki gibi biyolojik aktiviteye sahiptirler Spesifik protein grubu, elektron taşıma sistemlerinde çalışarak temel biyokimyasal amaçları gerçekleştiren bakır iyonlarını, amino asit metabolizmasındaki bazı enzimleri içerir [5]. Tip 1 bakır proteinleri elektron değişimi olan temel özelliği gösteren küçük mavi bakır proteinleri [6]. Bu grup proteinlerde azurin ve pseudoazurin gibi incelenmiş ve önemli önem gösterilmiş çok sayıda protein bulunmaktadır. Molekül kütlesi 14 kDa olan *P. aeruginosa*'dan ayrılan ve 447 bp ve 128 amino asit ile kompleman zinciri üzerinde yer alan en çok incelenen azurinler [7]. Azurin, bir tarafta iki yüklü küme içerir. Ek olarak, başka bir bölge, belirgin bir nötr aromatik zengin hidrofobik parçaya sahiptir. Azurin, tümör proteini p53 ile kompleksler oluşturarak antikanser molekülü olarak hareket eden farklı mekanizmalar gösterdi. Ek olarak azurin, reseptör tirozin kinazın içine müdahale ederek çoğu tümör hücresinin büyümesini engeller. VEGFR-2 tirozin kinaz hobisini azaltarak anjiyogenezi durdurarak kanser hücresi büyümesinin inhibisyonu. Ayrıca, P-cadherin protein ekspresyonuna müdahale ve meme kanser hücrelerinin çoğunun patlamasının inhibisyonu [8]. Bu nedenle, azurinin temel özellikleri, ilgisiz çeşitli memeli proteinlerini kansere bağlama yeteneğidir ve ona normal platform proteininin sahipliğini verir. Bu aynı zamanda kanser hücresi büyümesi, hayatta kalma ve/veya saldırı sunan farklı belirteç segmentlerinin bloke olmasına da yol açar. Bu özellikler, rekombinant zurin üretmek için optimal protokolü inceleyerek bu proteinde yoğun ilgiye yol açan Azurin'in potansiyel terapötik ilacını destekler [9]. *E. coli*'de aşırı ifade

edilme olasılığı, direncin sağlanması zor olan birden fazla hedefle ilişki kurma yeteneği de dahil olmak üzere azurin üretiminin etkinliğini farklı gerçekler destekledi. In vitro ve vivo testler, azurinlerin küçük yan etkilerini doğruladı. Güvenli saldırıya karşı savunmasız bir bakteri proteini olmasının yanı sıra, hazırlık niteliğindeki kanıtlar, azurinin, antikordan tanınmayabilen düz bir protein olduğu için immünojenezden muzdarip olduğunu göstermektedir [10]. Bu nedenle, bir bakteriyel proteinin, hastalığın farklı aşamaları ile kanser gelişimine müdahale edebilmesi, ayrıca farklı ilgisiz hedefleri hedefleyebilmesi, tıbbi faydalarını desteklemektedir. p28'in kanser hücreleri içinde yük proteinlerinin taşınması için bir araç olarak hareket etme yeteneği ve azurinlerin farklı yapıları nedeniyle birçok farklı proteini bağlama yeteneği, azurini onarıcı amaçlar için kritik olabilecek normal bir platform proteini yapar [9]. Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde temel ölüm nedenidir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı 2018'de dünya çapında 18 milyon kanser vakası bildirmiştir. Radyasyon, Kimyasal kanserojenler ve Beslenme faktörleri dahil olmak üzere kanser gelişimine karşılık gelen çeşitli faktörler vardır. Gen değişiklikleri veya mutasyon, esas olarak hücre bölünmesi sırasında ve sigara içmek gibi kimyasal değişikliklerle meydana gelir. Mutasyonun anlamı, hücrelerin büyümesinin düzenlenmesini kaybetmesi ve gereksiz yere büyümesidir. Ayrıca hücre, hücre bölünmesinin hızla gerçekleştiği ve tümör oluşturacağı çok fazla protein üretebilir [11]. P53 geni, insan karsinogenezi ile ilişkili temel bir faktör olarak kabul edilir. Normal rolü gen transkripsiyonu, apoptoz ve DNA onarımı ile ilgilidir [12]. p53'teki mutasyonlar, birincil tümörlerin gelişmesine yol açar. Kanser tedavisi tümörün histolojik yapısına, hastalığın evresine ve metastaz olup olmamasına göre iyileşme, kontrol veya palyatif tedavi olmak üzere üç hedefe ayrılır. Günümüzde en sık kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve kök hücre naklidir [13]. Teknolojinin kanser tedavisinde kullanılması ve ilaç tedavisindeki gelişmeler kanserde yaşam süresinin uzamasını hızla artırmıştır. Kanser hastaları zamanlarının çoğunu hastanede geçirirler. Bu tür terminal hastalarda tedaviye yönelik en önemli müdahale yaşam kalitesini artırmaya yönelik her türlü uygulamadır. Kanser hastalarının ve toplumun bilinçlenmesiyle birlikte alternatif tıbbın yaygın olarak kullanılmasına rağmen yetersizliğinin fark edilmesi, kemoterapinin toksik etkileri ve uzun süreli çabalara rağmen yeni ve en etkili kanser tedavilerinin bulunamaması, birçok hasta ve doktorun hastalanmasına neden olmuştur. Geleneksel kanser ilaçlarını bırakın ve diğer tedavi yöntemleriyle uğraşın. Birçok ülkede alternatif tıp araştırma merkezleri kurulmuş ve hastaların “inançlarının” kullanılan ilacın doğrudan etkisinden daha önemli olduğu düşünülmeye başlanmıştır [14]. Kanser tedavisinde yeni yaklaşımların yanı

sıra tedavi planında beş yöntem kullanılmaktadır. Azurinin diğer antikanser ajanlarla eş zamanlı ekspresyonu da incelenmiştir [15]. Azurin ve Mammaglobin-A'yı eksprese etmek ve meme kanseri tümörlerine karşı bağışıklık tepkilerini indüklemek için bir vektör tasarlarlarken Mehta ve ark. (2017), hipoksik bir promotörün kontrolü altında aynı anda azurin ve p53'ü eksprese eden bir bakteri vektörü tasarladı. Peptidlerin diyabet, bulaşıcı hastalıklar (bakteriyel, fungal ve viral), onkoloji ve osteoporoz gibi birçok hastalıkta faydalı olduğu zaten gösterilmiştir [16]. Bu peptitlerin çoğu, bazıları temel alınarak tasarlanmış olmasına rağmen, aktif proteinlerden türetilmiştir. Genetik, rekombinant ve kimyasal kütüphaneler [17]. Azurin, proteinin farklı bölgeleriyle ilişkili antikanser, antiparaziter ve anti-HIV özelliklerine sahip olduğu için umut verici bir terapötik peptit kaynağıdır [18]. Gerçekten de antikanser aktivitesi göz önüne alındığında, çalışmalar azurinin tercihen meme kanseri hücrelerine nüfuz ettiğini ve apoptozu [19], hücre döngüsü durmasını [20] ve farklı moleküller ile etkileşim yoluyla anjiyogenezin [21] inhibisyonu indüklediğini ortaya koymuştur. Çeşitli çalışmalar, bakteriyel bakır içeren proteinlerin, özellikle azurinin, kanser tedavisi için terapötik ilaçların geliştirilmesinde ve ayrıca virüsler ve parazitler gibi çeşitli bulaşıcı ajanların neden olduğu hastalıkların tedavisinde önemli bir kaynak olarak kullanılabileceğini göstermiştir [22]. Azurin'in tümör hücrelerini yok etme yeteneği, kanser gelişimini engelleyen p53 proteininin stabilitesine dayanır. Çekirdekte azurin, p53 proteinlerinin hücre içi seviyelerini artırır ve apoptotik süreci başlatan sitozole mitokondriyal sitokrom c salınımını tetikler [23]. Bu çalışma, yerel *P. aeruginosa* izolatından rekombinant azurin üretme koşullarını optimize etmeyi amaçladı.

1.1.Çalışmanın Amacı

Özellikle *Pseudomonas aeruginosa*'dan üretilen Azurinin, çeşitli kanser hücrelerinde antikanser etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, rekombinant protein üretmek oldukça pahalıdır ve gereksinimleri ticari olarak mevcut değildir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, yerel *Pseudomonas aeruginosa* suşlarını, Azurin geninin (azu) prevalansını ve varyantını incelemek için PCR dahil moleküler teknikler aracılığıyla araştırmak, daha sonra bu proteini verimli bir şekilde üretmek ve saflaştırmak için klonlama dahil rekombinant DNA teknolojisini düşük maliyetle uygulamaktır.

1.2. Tezin Önemi

Kanser önleyici bileşiklere alternatifler geliştirmek ve bu alanı yerel izolatlarda üzerinde tarama yaparak desteklemek için ileri moleküler teknikleri kullanma girişimi amaçlanmıştır. Bu çalışma sayesinde önemli bir bileşik (Azurin) lokal olarak kullanılabilir hale gelmektedir. Bu nedenle, ilgilenen araştırmacılar, kanser için bir tedavi bulmaya katkıda bulunan antikanser bileşiklerini üretmede daha fazla analiz yapabilirler.



2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

2.1. Pseudomonas Geçmişi:

Pseudomonas aeruginosa ilk kez 1882'de Gessard tarafından yeşil irinden izole edilmiştir [24]. Freeman tarafından 1916'da yayınlanan makalede, *pseudomonas* cinsinin 140'tan fazla türünden söz edilmiştir. İnsanlarda hastalığa neden olduğu bilinen tanımlanmış türlerin çoğu, fırsatçı enfeksiyonlarla ilişkilidir. Bunlara *P. putrefaciens*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophilia* ve *P. aeruginosa* dahildir. İnsan hastalıklarına karışma sıklığına göre en çok dikkati *P. aeruginosa* almıştır [25].

Bağışıklığı zayıf olan hastalarda bu organizma tarafından kolonizasyon riski daha yüksektir [26] ve normal mikrobiyal floranın bozulmasının da *P. aeruginosa* tarafından antimikrobiyal kolonizasyon artışlarıyla sonuçlandığı gösterilmiştir [27]. Bu patojenle ilgili sağlık sorunları gündeme gelmiş ve hastane hastaları, özellikle kanser ve yanıklar gibi ciddi hastalıkları olan hastalar için büyük bir tehdit oluşturmaya başlamıştır [25].

2.1.1. Pseudomonas Aeruginosa'nın Epidemiyolojisi

Pseudomonas aeruginosa, tüm hastane enfeksiyonlarının (%13,8) temsil ettiği hastane enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olarak kabul edilir [28]. Hastanelerde, *P. aeruginosa*, pediatrik yoğun bakım üniteleri gibi yoğun bakım ünitelerinin çoğunda büyük bir sorun olarak bildirilmiştir [29]. Önemli sayıda çalışma, bu patojeni yanık hastalarında ana patojen olarak ve hastaneye yatışın ilk haftasında yanıkların kolonizasyon sıklığını açıkça tanımlamıştır. Ek olarak, *P. aeruginosa*, bildirilen yara ve bakteriyemi enfeksiyonlarının yüksek bir yüzdesini temsil etmektedir [30]. Geniş bir hastane yelpazesinde, *P. aeruginosa* enfeksiyona yönelik tüm cerrahi alan vakalarının yaklaşık %6'sından ve İYE hastalarının yaklaşık %16'sından sorumludur [31]. Ayrıca, yayınlanmış çalışmalarda hastane kan enfeksiyonu vakalarının %46'sı *P. aeruginosa* ile ilişkilendirilmiştir [32].

2.1.2. Pseudomonas Aeruginosa: Tehlikeli Bir Fırsatçı Patojen

Pseudomonas aeruginosa, bağışıklığı baskılanmış İYE hastalarına ve genetik kistik fibrozis hastalığı olan hastaların akciğerlerinde kronik enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir fırsatçı patojendir [33]. P. aeruginosa'nın çoklu ilaca dirençli suşlarının prevalansı Hastanelerin farklı bölümlerinde artmıştır [34]. Bu çoklu ilaca dirençli klonlar, hastadan hastaya transfer yoluyla uzun yıllar hastanede hayatta kalabilir [35]. Antibiyotik direnci ve virülans varlığı, bu patojenin patojenite seviyesini artırır [13].

2.1.3. Pseudomonas Aeruginosa'nın Genetiği

P. aeruginosa'nın genomlarında yaklaşık %70 sekans özdeşliği paylaşan 5.021 gen vardır [36]. P. aeruginosa genomunun çekirdeği, çoğu P. aeruginosa izolatında ortak olan yaklaşık 4.000 genden oluşur. Bununla birlikte, P. aeruginosa'nın tüm genetik kütesinin 10.000 ile 40.000 ek gen içerdiği ileri sürülmektedir. P. aeruginosa genomunun az sayıda yüksek oranda korunmuş çekirdek genlerden, sınırlı korumaya sahip daha büyük bir gen "zarfindan" ve çok nadir ve kötü korunmuş genlerden oluşan büyük bir "buluttan" oluştuğu öne sürülmüştür [36]. P. aeruginosa genomlarının soyları, en çok dizilenen bakterilerden daha büyüktür [37]. Türler içinde genomun boyutu 5.5 ile 7 Mbp arasında değişmektedir. Genom hacmindeki fark, ek genom olarak adlandırılan şeyle sonuçlanır [38]. Kromozomu yatay gen tarafından elde edilen farklı pozisyonlara yerleştiren plazmit DNA külçeleri gibi ek kromozomal elementler farklı kaynaklardan transfer edilir [39]. Bu elementler, P. aeruginosa'nın alt kümelerinde veya sadece tek suşlarda mevcut olabilir [40]. Bu organizmalar, karmaşık ortamda rekabet etme yeteneklerinin değişen derecelerine yol açan benzersiz kordların gelişmesine neden olan nokta mutasyonlarına, eklemelere ve hatta büyük ölçekli silmelere maruz kaldı [38]. Bu nedenle, tek bir hastadan aynı ataya ait suşun seri izolatlarının fenotipik değerlendirmeleri, büyük miktarda fenotipik heterojenite gösterebilir [41]. Kronik olarak kolonize olan P. aeruginosa popülasyonlarındaki bu fenotipik heterojenlik, belirli suşlar arasında fenotipik özelliklerin doğrudan karşılaştırılmasına neden olur [42].

2.1.4. P. Aeruginosa ve Enfeksiyonlar:

Pseudomonas aeruginosa, aşağıdaki gibi farklı enfeksiyon türleri ile ilişkilidir:

Solunum yolu enfeksiyonları: *P. aeruginosa*, kistik fibroz (KF) hastalarının hava yollarında, ölümle sonuçlanan kronik akciğer enfeksiyonlarının tekrarlamasına yol açan kalıcı bir pozisyon oluşturma yeteneğine sahiptir [43].

İdrar yolu enfeksiyonları: *P. aeruginosa*, kateterizasyon veya cerrahi sonucu idrar yolu enfeksiyonları (İYE) ile ilişkilidir. İdrar yolunun kateterizasyonu, *P. aeruginosa* tarafından hastane kaynaklı İYE'nin başlıca nedenidir. Bu patojen, iyi yapılandırılmış biyofilmlerde kateter yüzeyine bağlanan bir konakçı giriş kaynağı olarak patojenler tarafından kullanılan Kateterleri kullanır. Ayrıca, kateterin yerleştirilmesi aynı zamanda mukozal epitel tabakalarını bozarak bakteriyel kolonizasyonu teşvik edebilir [44]. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları: *P. aeruginosa*, ciddi yanıkları ve yara enfeksiyonlarını kolonize eden en sık izole edilen bakteridir. Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'nın (MDR) neden olduğu yara enfeksiyonları, dünya çapında ciddi hastalık ve ölüm oranları ile bağlantılı olmuştur [45]. *P. aeruginosa* ameliyat sonrası yara enfeksiyonlarına neden olan cerrahi yaralarda bildirilmiştir [46]. Ek olarak, *P. aeruginosa* ilk enfeksiyon bölgesinden yayılabilir ve kan dolaşımına girerek sepsise neden olabilir [47]. *P. aeruginosa* sepsisten kaynaklanan yüksek ölüm oranları zaten bildirilmiştir [48]. Yüzme havuzlarında, kaplıcalarda ve diğer su kaynaklarında *P. aeruginosa* kontaminasyonu ile ilişkili olarak önceden sağlıklı olan kişilerde hafif cilt enfeksiyonları ortaya çıkabilir [49].

Keratit: *P. aeruginosa* bakteriyel keratitin önde gelen nedenidir [50] ve önceden oküler hastalığı olan hastalarda, oküler cerrahi sonrası hastalarda ve kontakt lens kullanan kişilerde görülür. *P. aeruginosa*'nın bozulan kornea epitel hücrelerine yapıştığı ve hızla içselleştiği gösterilmiştir. [51].

Yanık yarası enfeksiyonları: Yanık eskarı normalde yaralanmadan sonraki 3-5 gün içinde hastanın kendi florası (ağırlıklı olarak Gram pozitif bakteriler) ile kolonize olur. Bu ilk kolonizasyon daha sonra *P. aeruginosa*'nın en yaygın olduğu hastanede bulunan Gram-negatif flora ile değiştirilir [3].

2.1.5. P. Aeruginosa'nın Patojenitesi ve Virülans Faktörleri

Pseudomonas cinsi, su ve su gibi nemli habitatlarda görünen 120'den fazla türü içerir. Bitki örtüsü ve canlılar için mide bulan keseklerin ekosisteminde. *Pseudomonas* türleri içinde,

P. aeruginosa en yaygın olarak insan enfeksiyonu ile ilişkilidir; [52]. Bakteriler fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir ve esas olarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda hastane enfeksiyonlarına neden olur. Bununla birlikte, normal fizyolojik fonksiyon bozulduğunda, hasarlı epitel bariyerleri, azaltılmış nötrofil üretimi, bozulmuş mukosilyer klirens ve tıbbi cihazların kullanımı dahil olmak üzere çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir [53]. *P. aeruginosa*, önceden sağlıklı olan kişilerde ölümcül *P. aeruginosa* enfeksiyonları vakaları bildirilmiş olmasına rağmen, daha önce sağlıklı olan hastalarda nadiren kronik enfeksiyonlarla ilişkilidir [54]. Virülans faktörleri, adezinler, aljinat, pili gibi hücre ile ilişkili faktörlere ayrılabilir, flagella ve lipopolisakkaritlere veya elastaz, ekzoenzim, eksotoksin A, hemolizinler, demir bağlayıcı proteinler, lökositinler ve proteazlar gibi hücre dışı faktörlere dönüşür [3]. Çeşitli virülans, hücre dışı matrisi hedeflerken yapışmayı kolaylaştıran ve / veya konakçı hücre sinyal yollarını bozan patojeniteye neden olabilir. *P. aeruginosa*, vücudu ve bağışıklık sistemini istila eden ve yok edilmesi neredeyse imkansız olan enfeksiyonlarla sonuçlanan çeşitli hastalıklara neden olabilir [2]. Virülans faktörlerinin neden olduğu patojeniteler arasında Lipopolisakkarit, Flagellum, Tip IV Pili, Tip III salgılama sistemi, Ekzotoksin A, Proteaz, Aljinat, Quorum Algılama, biyofilm oluşumu, tip VI salgılama sistemleri, hava sahasında oksidan oluşumu sayılabilir. Bunlar, bağışıklık sisteminde farklı şekillerde çalışan ana virülans faktörleridir. LPS, *P. aeruginosa*'nın dış zarının baskın bir bileşenidir. Bakteriyel LPS genellikle endotoksin olarak bilinen hidrofobik bir alan, merkezi tekrarlamayan bir oligosakarit ve bir distal polisakaritten oluşur [55]. Çekirdek algılama virülans faktörü, yayılabilir kimyasal bileşikler yoluyla bir bakteri hücreden hücreye iletişim mekanizmasıdır. Büyük bir regulonun ekspresyonunu başlatmak için yeterli miktarda salgılanmış bir sinyal molekülü üretmek için çekirdek gereklidir [56]. Çekirdek sisteminin *P. aeruginosa*'nın patojenitesinde invazyon ve biyofilm oluşumunda önemli olduğu gösterilmiştir [57]. Tip II ve III salgılama sistemleri (T3SS) başlıca toksin üretim sistemleridir. *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin çoğu, eksotoksin A, alkalın proteaz ve LasA proteaz gibi T2SS tarafından üretilir. T3SS, sitotoksik etkileri indüklemek için tümü hedef hücrelerle yakın temas gerektiren ekzoenzimler S, T, U ve Y dahil olmak üzere virülans faktörleri üretir [58]. Bu sistem, toksinleri memeli hücrelerine sokmak için şırınga benzeri bir transmembran yapı kullanır [59]. Klinik izolatların önemli bir yüzdesinin ExoS ürettiği bildirilmiştir [60]. Hem ExoS hem de ExoT, kronik ve akut enfeksiyonların [61] gelişiminde rol oynar [61], nötrofillerde değişmiş pro-apoptotik süreçler yoluyla nötrofil apoptozisini indükleyerek bu enfeksiyonların karmaşık olmasına neden olur. Nötrofillerin antibakteriyel aktivitelerinden ödün vererek bakteriyel sağ kalımı desteklemeye ek olarak

[62]. ExoS ve ExoT'nin ekspresyonu, ExoS ve ExoT'nin [63] transkripsiyonel aktivatörü olan ExsA tarafından kontrol edilir ve bu nedenle LasA ve LasB, ExsA aracılığıyla bu toksinlerin ekspresyonunu düzenleyebilir. Böylece (Çizelge 1)'de özetlenen birkaç virülans geninin transkripsiyonunun düzenlenmesi.

Çizelge 1 P. aeruginosa'nın bazı virülans faktörleri

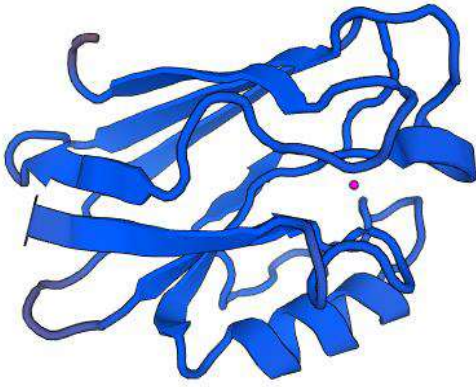
GEN ADI	AÇIKLAMA	KAYNAKLAR
pilYJ	Hareketlilik ve bağlanma	[63]
algU	Sigma faktörü	[114]
alg	aljinat salgılanması	[115]
exoS	ekzoenzim S	[116]
exoT	ekzoenzim T	[117]

2.1.6. Bakteriyel Proteinler/Peptitler

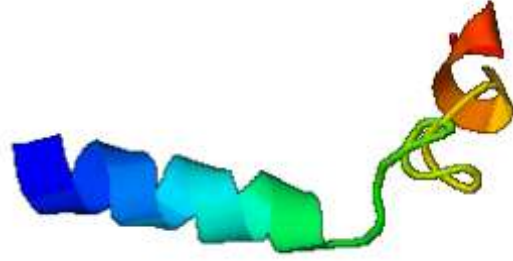
Bu bölümde pseudomonas tarafından üretilen proteinler veya peptitler anlatılmıştır. Bu antikanser maddelerin kaynakları ve biyolojik aktiviteleri Çizelge 2'de, yapı modelleri ise Şekil 1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2 Bakteri proteinleri/peptidleri olarak azurin ve p28'in kökeni ve antikanser aktivitesi

PROTEIN/PEPTİT	BIYOLOJİK HEDEF: İNSAN KANSER HÜCRELERİ	KAYNAKLAR
1 Azurin	Meme Kanseri, Oral Skuamöz Karsinom,	[7]
2 P28	Melanom	[9]



(A)

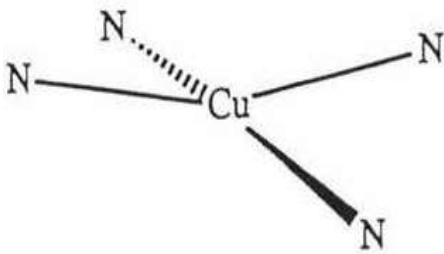


(B)

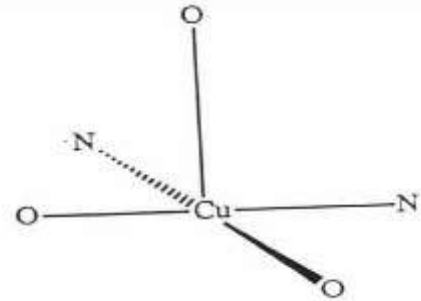
Şekil 1 Yapı modeli: (A) Azurin; (B) p28

2.1.7. Bakır Protein Sınıfları

Bakır proteinleri, elektron taşıma sistemlerinde, amino asit metabolizmasındaki bazı enzimlerde çalışarak temel biyokimyasal amaçları gerçekleştirir [5]. İki tip bakır bağlayıcı protein vardır: bir bakır (iyon) ile bağlanan birinci tip protein, bu tip Azurin'de bulunur. İkinci tip, birkaç metal iyonunu bağlama olasılığı ile iki bakır iyonuna bağlanan proteinleri tanımlar ve bu form süperoksit dismutazda bulunur [64]. Bu tip proteinler, boyut ve yapı gibi çeşitli spektroskopik özellikler gösterir ve spektroskopik özelliklere göre üç tip bakır bağlama merkezi vardır [64]. Bu merkezler tip I, tip II ve tip III merkezler olarak adlandırılmıştır [65]. Süperoksit dismutaz ve bakır galaktoz oksidazın kimyasal yapıları (şekil 2).



süperoksit dismutaz bakır merkezi



galaktoz oksidaz bakır merkezi

Şekil 2 Süperoksit dismutaz ve galaktoz oksidazın tip II bakır pozisyonları

2.1.8. Mavi Bakır Proteinlerinin Özellikleri

Bakır tip I içeren küçük proteinlere mavi bakır proteinleri denir. Azurin ve pseudoazurin gibi incelenen çok sayıda önemli protein vardır. Mavi bakır proteinlerinin (kapredoksinler) temel özelliği elektron değişimidir [64].

2.1.9. Tür I Bakır Proteininin Sınıflandırılması

Adman'a (1988) göre, mavi bakır proteinlerinin dört kategoriye ayrılabilceği bir sınıflandırma protokolü oluşturulmuştur. Toplamda sekiz kategoriye sahip olmak için ek dört kategori eklendi [66]. Cupredoxinler, bakır merkezindeki amino asit sisteinleri ve histidinlerin sayısı gibi spektroskopi özelliklerine göre üç kategori içerir [64]. Tip 1 bakır proteinlerinin sekiz kategorisi (Çizelge 3)'te kısaca tanımlanmıştır.

Çizelge 3 Tip 1 bakır proteinlerinin bazı kategorileri

TIP I BAKIR PROTEİNLERİNİN SINIFLANDIRILMASI						
Örnek	600nm bölgesinde λ Max	Görünür bölgedeki diğer λ_{max}	Cys kalıntısı sayısı	EPR tipi	Kalıntılarının sayısı	Kaynaklar
Azurin	625		3	axial	2	[6]
psödoazurin	595	470	1	axial	2	[6]
plastosiyanın	595	780	1	axial	2	[6]
aurasiyanin	596		1		2	[66]

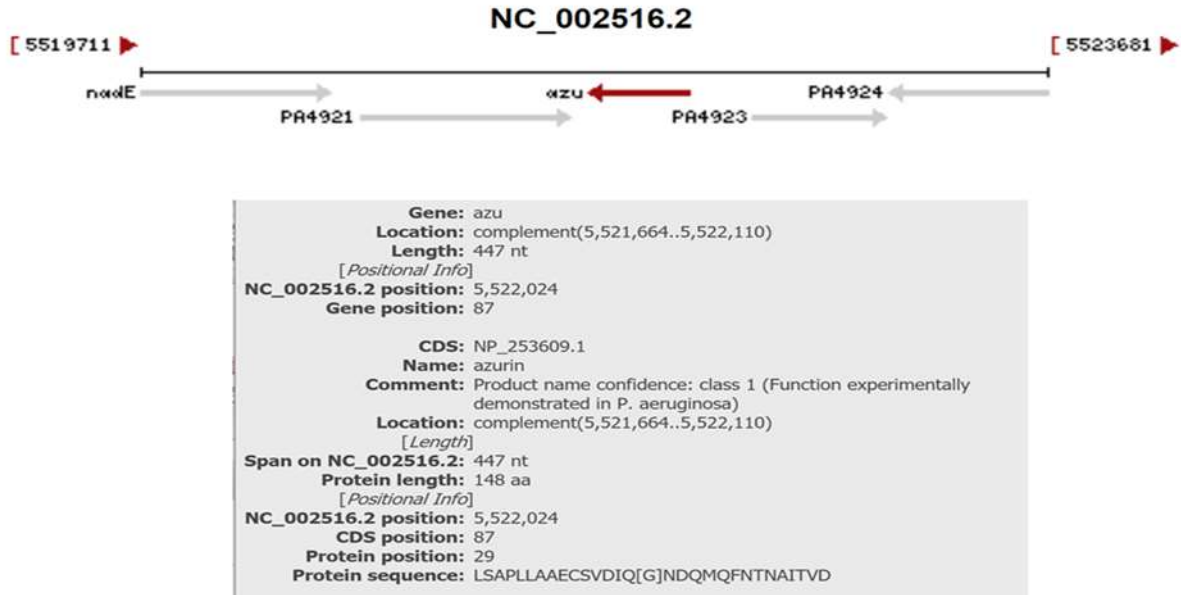
2.2. AZURİNLER

Azurin birinci sınıf bakır proteinine aittir, elektronları sitokrom C'den bu organizmaların sitokrom oksidaz/nitrit redüktazına taşıyan farklı bakteri türlerinde elektron taşıma zincirindeki işlevi. (Çizelge 4), farklı konakçıdan azurin varyantlarını özetledi.

Çizelge 4 Tanımlanan Azurinlerin Özellikleri

KAYNAK	MOLEKÜLER AĞIRLIK	PEPTİT UZUNLUĞU	AMAX	BİLİNEN DIZI
P. Aeruginosa	14,600	129	631	Evet
P.Fiorescens B-93	14,600	128	635	Evet
P.Fiorescens C-18	14,600	128	625	Evet
P.Fiorescens D-35	14,600	128	625	Evet
P.Fiorescens 6009/1	14,600	128	625	Evet
P. Denitrificans	14,600	128	620	Evet
A. Denitrificans	14,600	129	619	Evet
P. Denitrificans	13,800	124	595	Hayır

Azurinde bakır bağlanmasının konumu önemli bir ilgiye sahiptir. Pseudomonas aeruginosa ve alcaligenes denitrificans kaynaklı azurin kristal şekli sırasıyla 2.7A ve 1.8A olarak tasarlanmıştır [67]. (Şekil 3)'te gösterildiği gibi, yapısal ve çevreleyen genleri ve kromozom üzerindeki konumunu tanımlayan NCBI'de rapor edildiği gibi mevcut bilgiler



Şekil 3 azurin geni hakkında yapısal bilgi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/878046>

2.2.1. Azurin Bakır Merkezinin Mutajenezi.

P. aeruginosa o leucine'den azurinin Met121 kalıntısını değiştirmeyi hedefleyen in vitro mutajenez çalışması. Bu çalışma, Met 121'in bakırın azurinelere bağlanması için çok önemli

olmadığını doğruladı. Bununla birlikte, proteinin stabilitesi azalmıştır. *P. aeruginosa* azurin'deki (tip I bakır merkezi) on dokuz olası mutanıtı Met121 bakırına uygulandı. İfade edilen proteinlerin beşi saflaştırılmıştır ve (Çizelge 5)'te gösterildiği gibi bazı spektroskopik farklılıklarla bakır içerdiği gösterilmiştir. Bu mutanıtara göre, bakırın bağlanmasını durdurmadan azurin içinde metionine alternatif olarak kalıntı oyunlarının varyanıtaları vardır. Kalıntılardaki değişiklik, kırmızı absorpsiyonda 9 nm azalmaya neden olurken, küçük tepe noktasında yaklaşık 13 nm'lik bir artış [68].

Çizelge 5 *P. aeruginosa*'da azurin'in metiyonin mutanıtaları arasındaki spektroskopik varyasyonlar

MUTANT	Kırmızı Soğurma Maksimum (nm)	Küçük Tepe (nm)
Vahşı Tip	625	445
Met121val	630	459
Met121ile	626	459
Met121asn	622	447
Met121asp	622	445
Met121his	612	449

2.2.2. Azurin

Azurin, *P. aeruginosa* yoluyla salgılanan, on altı kDa moleküler kütleyle sahip bakır içeren bir proteindir. Bakırın çıkarılmasından sonra sitotoksik apo-azurin üretilir [7]. Azurin antikanser davranışının birkaç farklı mekanizması önerilmiştir: (i) tümör proteini p53 ile kompleksler oluşturarak çoğu kanserin mobilüler apoptozunun indüklenmesi veya boom inhibisyonu; (ii) reseptör tirozin kinazın içine müdahale ederek çoğu tümör hücresinin büyümesinin önlenmesi (EphB2 aracılı sinyalleşme süreci); (iii) VEGFR-2 tirozin kinaz hobisini azaltarak anjiyogenezini durdurarak kanser hücresi büyümesinin inhibisyonu; (iv) P-kadherin protein ekspresyonuna müdahale ve çoğu kanser hücresinin büyümesinin inhibisyonu [8]. Peptid, meme kanserinin mobil hattında (MCF-7) güçlü bir sitotoksik etkiye sahipti, bunun sonucunda %50'den fazla apoptoz büyümesine neden oldu ve farklı meme kanser hücrelerinin çoğuna negatif çıktı (MDA-MB-157, MDD2, MDA-MB-231.) (Punj ve diğerleri 2004). Farklı çalışmalarda azurin, oral skuamöz karsinom hücrelerine (YD-9) [63] ve kanser hücrelerine (UISO-Mel-2) (Yamada ve diğerleri, 2002) yönelik antikanser hobisini doğruladı.

2.2.3. P28

P28, 28 amino asit içeren azurinin (amino asitler 50-77) bir parçasıdır. Moleküler kütlesi 2.8 kDa'ya ulaşır [69]. p28, p53 ve p21 ifadesinin çeviri sonrası büyümesinde bir güce sahiptir. Ayrıca p28, antianjiyogenik etkiyi doğruladı ve tercihen insan meme kanser hücrelerinin çoğuna (MCF-7, ZR-75-1, T47D) caveolin aracılı bir yoldan girdi [21]. Bu maddenin, glioblastoma hücrelerinde (U87 ve LN229) ve p53wt melanomda (Mel-29) DNA'ya zarar veren (doksorubisin, dakarbazin, temozolomid) veya antimitotik (paklitaksel, docetaxel) hapların düşük dozlarının sitotoksitesini artırması heyecan vericidir. Yukarıda sözü edilen antitümör ilaç tedavilerinin p28 ile bir arada toplanmasına ilişkin genişletilmiş hobi, p53/p21/CDK2 yolu aracılığıyla kolaylaştırılır [70].

2.2.4. Azurin'in Potansiyel Terapötik İlacı

Azurin ve p28, meme kanseri için potansiyel tedavilerdir [9]. Bu düşünceyi desteklemek için birçok neden var. İlk olarak, kapsanmayan dört yerel devre, diğer proteinlerle ilişkilerine dahil edilebilir. Bu nedenle, azurinin temel özellikleri, ilgisiz çeşitli memeli proteinlerini kansere bağlama yeteneğidir ve ona normal platform proteininin sahipliğini verir. Bu aynı zamanda kanser hücresi büyümesi, hayatta kalma ve/veya saldırı sunan farklı belirteç segmentlerinin bloke olmasına da yol açar. İkincisi, bakteriyel protein azurin [9] üretmek mümkündür, çünkü E. coli'de aşırı eksprese edilebilir [10]. Üçüncüsü, azurinler birden fazla hedefle ilişki kurabildiklerinden, direnci sağlamak zordur. Dördüncüsü, in vitro ve vivo testler azurinlerin küçük yan etkilerini doğruladı [9]. Beşinci olarak, azurinde bir hidroterapi vardır ve doku girişinde yardımcı olması ve kan dolaşımından çıkarılması gereken su çözülebilir. Son olarak, bir bakteriyel protein olan azurin, güvenli saldırıya karşı savunmasızdır, ancak hazırlık niteliğindeki kanıtlar, azurinin, antikordan tanınmayabilen düz bir protein olduğu için immünojenezden muzdarip olduğunu göstermektedir [10]. Bu nedenle, bir bakteriyel proteinin, hastalığın farklı aşamaları ile kanser gelişimine müdahale edebilmesi, ayrıca farklı ilgisiz hedefleri hedefleyebilmesi, tıbbi faydalarını desteklemektedir. p28'in kanser hücreleri içinde yük proteinlerinin taşınması için bir araç olarak hareket etme yeteneği ve azurinlerin farklı yapıları nedeniyle birçok farklı proteini bağlama yeteneği, azurini onarıcı amaçlar için kritik olabilecek normal bir platform proteini yapar [9].

2.3. Dünyada Kanser Prevalansı

Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde temel ölüm nedenidir. Tanı, tarama olanakları ve tedavi mevcudiyeti gibi farklı faktörlerle ilişkili farklı coğrafi bölgelere göre prevalansdaki bu kontrast [71]. 2012'de Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, 8 milyonu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünya çapında 14,1 milyon kanser vakası bildirdi [72]. Bu tahmin 2018'de 18 milyona yükseldi. Küresel olarak yaklaşık 9,6 milyon kanser ölümü tahmin ediliyor [73]. Küresel demografinin 2025 yılına kadar yaklaşık 420 milyon yeni kanser vakasına sahip olması bekleniyor, bu da yıllar içinde kanser insidansında bir artış anlamına geliyor [73].

2.3.1. Kanser Nedenleri:

Kanser etiyolojisinde çeşitli faktörlerin önemi vurgulanmaktadır. Bu faktörler; iyonlaştırıcı radyasyon ve X ışınıdır. Ultraviyole ışınları, aşırı miktarda güneş ışınlarına maruz kalınması nedeniyle cilt kanserleri giderek artmaktadır. Açık tenli, açık havada çalışan kişilerde cilt kanserleri yaygındır. Hava kirliliği, tek başına veya sigara ile hava kirliliğinin akciğer kanserlerinin yaklaşık %10'unda rol oynadığı bilinmektedir. Kimyasal kanserojenler, çalışma koşulları, benzen, egzoz gazı, katran gibi maddelere ve kömürün yanma ürünlerine maruz kalmaları nedeniyle kanser oluşumuna neden olabilir. Beslenme faktörleri, son yıllarda bazı gıdaların kanserojen olduğu konusunda araştırmalar devam etmektedir. Ayrıca birçok gıdada bulunan katkı maddelerinin depolama, pişirme veya sindirim sırasında oluşan yan ürünler nedeniyle kanserojen olduğu bilinmektedir. Sigara içmek ayrıca gırtlak, farenks, mesane ve pankreas kanseri riskini de artırır. Sigara içenlerde içmeyenlere göre 10 kat daha sık görülür. Alkol, aşırı alkol kullanımının ağız, yutak, gırtlak ve yemek borusu kanserleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Virüsler, bazı virüslerin kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin; Hepatit-B virüsünün karaciğer kanseri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca kanser oluşumuna neden olan faktörler arasında kalıtım, ırk, yaş, cinsiyet, hormonlar ve bağışıklıkla ilgili faktörler yer alır [74].

2.3.2. Kanser Türleri:

Çeşitli kanser türleri vardır. Akciğer ve meme kanseri gibi farklı kanser türlerine yol açan organların yüzeyini kaplayarak dokuda başlayan ilk tip karsinomlardır. Sinirler, kemikler ve eklemler gibi vücudu destekleyen ve bağlantı ile ilgili dokularda başlayan kanseri tanımlayan Sarkom adı verilen ikinci kanser türü. Lösemi, kan hücrelerinin kontrolsüz

büyümesini tanımlayan kanla ilişkili başka bir kanser türüdür. Bezleri ve damarları içeren lenfatik sistem, Lenfoma adı verilen kanserden etkilenebilir: (www.cancerresearchuk.org ,2019). Ayrıca merkezi sinir sistemi, beyin ve omurilikte büyüyen tümör ve hipofiz adenomları vb. yoluyla kanserden etkilenir. Plazma hücrelerinin kemik iliği üreten tümörde birikmesiyle adlandırılan plazma hücrelerinde başka bir kanser türü başlar. Kanser, kanda hormon üreten Nöroendokrin tümörde büyüme olasılığına ek olarak, yumurta ve sperm oluşumundan sorumlu olan germ hücrelerini de etkileyebilir.

2.3.3. Büyüyen Kanser:

Kanserin ortaya çıkışı ana aşamalardan geçer. Hücre bölünmesi, ana hücrelerin benzer kopyalarını oluşturmak için hücreye bu işleme için doğru zamanı bildiren spesifik genler tarafından düzenlenir. Tüm kanser türleri hücrelerde aktive olan ve hücreden üretilen doğru sinyalleri kaçırarak kontrolsüz bölünmeye yol açar [11]. Gen değişiklikleri veya mutasyon, esas olarak hücre bölünmesi sırasında ve sigara içmek gibi kimyasal değişikliklerle meydana gelir. Mutasyonun anlamı, hücrelerin büyümesinin düzenlenmesini kaybetmesi ve gereksiz yere büyümesidir. Ayrıca hücre, hücre bölünmesinin hızla gerçekleştiği ve tümör oluşturacağı çok fazla protein üretebilir [11].

2.3.4. P53 Tümör Baskılayıcı Gendeki Mutasyonlar

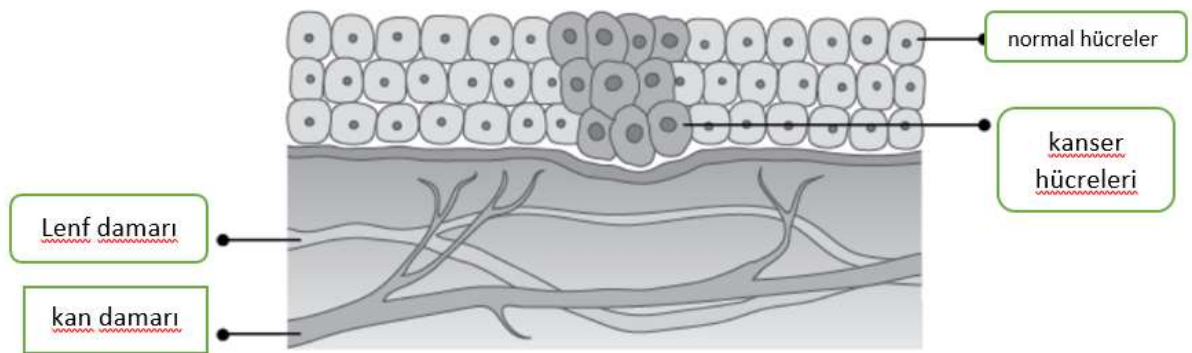
P53 geni, insan karsinogenezi ile ilişkili temel bir faktör olarak kabul edilir. Normal rolü gen transkripsiyonu, apoptoz ve DNA onarımı ile ilgilidir [12]. p53'teki mutasyonlar, birincil tümörlerin gelişmesine yol açar. p53 geninin normal fonksiyonu ile ilgili biyokimyasal işlemler çok üniteli protein makineleri tarafından gerçekleştirilir. Bazı viral onkoproteinler p53 ile bağlandığında ve diğer hücre protein bileşenleri ile etkileşimlerini bozduğunda, bu makinelerin işlevleri değişir [12]. Biyokimyasal yollar göz önüne alındığında, insan karsinogenezinin merkezindeki en önemli bileşen, normal işlevi gen transkripsiyonu, DNA sentezi, apoptoz ve DNA onarımı ile ilişkili olan P53 genidir [12]. p53'teki değişiklikler ve mutasyonlar, birincil tümörlerin gelişimini ortaya çıkarır. p53 geninin normal fonksiyonu ile ilgili biyokimyasal işlemler çok üniteli protein makineleri tarafından gerçekleştirilir. Bu makinelerin işlevleri, p53'e bağlanan ve diğer hücre protein bileşenleri ile etkileşimlerini bozan bazı viral onkoproteinler tarafından değiştirilir [75].

2.3.5. Kanser Yayılımı:

Kanser, iyi huylu tümörlerden farklıdır çünkü başladığı yerden vücudun farklı bölgelerine yayılabilir. Daha sonra kanser hücreleri o bölgede büyümeye başlar. Hücrelerini yakındaki dokulara yayan kötü huylu bir tümör, istilacı kanser olarak bilinir.

Kanser şu yollarla yayılabilir:

- Lokal olarak, birincil kanserin etrafındaki dokunun içinde ve yakınında
- lenfatik sistem yoluyla
- kan dolaşımı yoluyla



Şekil 4 Kanser yayılımı (Saini ve ark, 2020) [121]

2.3.6. Kanser Tedavisi Türleri:

Kanser tedavisinin amacı, tümörün histolojik yapısına, hastalığın evresine ve metastaz olup olmamasına göre iyileşme, kontrol veya palyatif tedavi olarak üçe ayrılır. Günümüzde en sık kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve kök hücre naklidir [74]. Teknolojinin kanser tedavisinde kullanılması ve ilaç tedavisindeki gelişmeler kanserde yaşam süresinin uzamasını hızla artırmıştır. Kanser hastaları zamanlarının çoğunu hastanede geçirirler. Bu tür terminal hastalarda tedaviye yönelik en önemli müdahale yaşam kalitesini artırmaya yönelik her türlü uygulamadır. Kanser hastalarının ve toplumun bilinçlenmesiyle birlikte alternatif tıbbın yaygın kullanımına rağmen yetersizliğinin fark edilmesi, kemoterapinin toksik etkileri ve uzun süreli çabalara rağmen yeni ve en etkili kanser tedavilerinin bulunamaması birçok hasta ve doktorun hastalanmasına neden olmuştur. Geleneksel kanser ilaçlarını bırakın ve diğer tedavi yöntemleriyle uğraşın. Birçok ülkede alternatif tıp araştırma merkezleri kurulmuş ve hastaların “inançlarının” kullanılan ilacın doğrudan etkisinden daha önemli olduğu düşünülmeye başlanmıştır. [14]. Kanser tedavisinde yeni yaklaşımların yanı sıra tedavi planında altı yöntem kullanılmaktadır:

- **Cerrahi Tedavi**

Cerrahi, kanser tedavisinin en eski yöntemlerinden biridir. Solid tümör tedavisinin en önemli unsuru olmaya devam etmektedir (Amerikan Kanser Derneği 1998). İlerlemiş kanser vakalarında, hastalığın acil durumunu düzeltmek, önlemek ve uzatmak amacıyla yapılır [74].

- **Radyoterapi**

Doğal radyoaktif kaynaklarla çalışan cihazlar kullanarak belirli bir organdaki kanser hücrelerini yok etmektir. Radyoterapi, kanser ve nadiren kanser dışı hastalıkların tedavisinde iyonlaştırıcı ışınların veya atomik parçacıkların kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Kanser hastalarının yaklaşık %60'ı hastalığın bir aşamasında radyoterapi almaktadır. Ancak RT'nin en büyük dezavantajlarından biri, zararlı hücreleri öldürürken sağlıklı hücreleri öldürmesidir. Ayrıca kusma, saç dökülmesi, yorgunluk, iştahsızlık gibi sık görülen yan etkiler de hastanın yaşam kalitesini etkileyebilir. Bu nedenle diğer tedavi modaliteleri düşünülebilir [76].

- **Kemoterapi**

Kanser tedavisinde kullanılan en yaygın tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi, kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyen ve sitotoksik etkisiyle bu hücreleri yok eden ilaçlarla yapılan bir tedavi şeklidir. Hastalıkların bir kısmı cerrahi gibi lokal tedavilerle tedavi edilirken tedavi ve radyoterapi, kemoterapi genellikle yaygın tümörü olan hastalarda uygulanmaktadır. Kanser hastalarının tam tedavisi ile ağrı da ortadan kalkar ancak kanser tedavisi sırasında hasta şiddetli ağrı hissederse veya kanser tedavisinin başarılı olmadığı durumlarda ağrı devam ederse hastanın ihtiyacına göre uygun tedavi düzenlenir. Hasta ağrı şikayeti ile başvurduğunda tam bir anamnez alınmalı ve hastanın gerçek hastalığının tüm detayları öğrenilmelidir [74,76].

- **İmmünoterapi**

İmmünoterapi, kanser de dahil olmak üzere bir grup hastalıkla savaşmak için kişinin kendi bağışıklık sisteminin belirli bölümlerinin kullanıldığı bir tedavi şeklidir. [76].

- **Kök Hücre Nakli**

Kök hücre nakli; allojenik (kardeş, akraba ve İnsan Lökosit Antijeni (H.L.A) uygun ilişkisiz donörlerden kök hücre nakli), otolog (solid tümörlerde hastanın kendi kök hücreleri kullanılarak) ve singeneik (ikiz kardeşlerden) yapılmaktadır. Allojenik nakiller böbrek, lösemi, miyelom ve lenfoma gibi kanser türlerinde, otolog nakiller ise lösemi, multipl miyelom, lenfoma, meme ve testis kanserlerinin tedavisinde uygulanmaktadır.

• Terapötik İlaçlar

Azurin ve p28, çeşitli kanser hücrelerinde ve fare bazlı tümör modellerinde doğrulanmış antikanser aktivitesi sergiler. Böylece azurin ve p28, antikanser ilaçları olarak doğrudan uygulanabilir. *Escherichia coli* Nissle 1917, akut diyare tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır ve tümör hedefleme aktivitesine sahiptir [77]. Nissle 1917'de azurinin sürekli ekspresyonunun, fare modellerinde B16 melanomunun ve 4T1 meme tümörü büyümesinin etkin bir şekilde inhibisyonunu sağladığı gösterilmiştir [78]. Azurinin diğer antikanser ajanlarla eş zamanlı ekspresyonu da incelenmiştir [15]. Azurin ve Mammaglobin-A'yı eksprese etmek ve meme kanseri tümörlerine karşı bağışıklık tepkilerini indüklemek için bir vektör tasarlarlarken, [21] hipoksik bir promotörün kontrolü altında aynı anda azurin ve p53'ü eksprese eden bir bakteri vektörü tasarladı. Son zamanlarda, p28'in iki faz I klinik denemesi tamamlandı ve sonuçlar, insan kanser hastalarında p28'in antitümör aktivitesini ve güvenliğini doğruladı. Metastatik solid tümörleri olan 15 erişkin hastada bir klinik çalışma yapılmıştır [23]. p28 tedavisinden sonra, 7 ila 61 hafta boyunca stabil hastalık gösteren yedi hasta, üçü kısmi yanıt ve biri tam yanıt verdi. Diğer klinik çalışma beyin tümörlü çocuklarda yapılmıştır [79]. Sonuçlar, CNS neoplazmaları için aktivitesi çok yüksek olmasa da, p28'in güvenli ve iyi tolere edildiğini gösterdi. Azurin ve p28, aktivitelerini arttırmak için farklı antikanser proteinleri/peptidleri ile kaynaştırıldı. Granzyme B bağışıklık sistemi tarafından salınır ve proapoptotik yollar ile aktive olur [80]. Terapötik peptitler, proteinler, antikorlar ve küçük organik moleküller gibi geleneksel ilaçlara göre birçok avantajı olan umut verici bir tedavi sınıfıdır. Terapötik peptitler, küçük organik peptitlerden daha yüksek bir hedef afinitesine ve daha düşük bir toksisite profiline sahiptir ve daha küçük boyutları nedeniyle daha iyi nüfuz edebilirler. Ek olarak, küçük boyutları nedeniyle peptitler, stabilitelerini ve güçlerini arttırmak için modifiye edilebilir [81]. Peptidlerin diyabet, bulaşıcı hastalıklar (bakteriyel, fungal ve viral), onkoloji ve osteoporoz gibi birçok hastalıkta faydalı olduğu zaten gösterilmiştir [82]. Bazıları genetik, rekombinant ve kimyasal kütüphaneler temelinde tasarlanmış olsa da, bu peptitlerin çoğu aktif proteinlerden türetilmiştir [83]. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen düşük moleküler ağırlıklı bir cupredoxin olan Azurin, proteinin farklı bölgeleriyle ilişkili antikanser, antiparazitik ve anti-HIV özelliklerine sahip olduğundan umut verici bir terapötik peptit kaynağıdır (Fialho ve diğerleri, 2008). Gerçekten de antikanser aktivitesi göz önüne alındığında, çalışmalar, azurinin tercihen meme kanseri hücrelerine nüfuz ettiğini ve farklı moleküller ile etkileşim yoluyla apoptozu [19], hücre döngüsünün durdurulmasını [20] ve anjiyogenezin inhibisyonunu [21] indüklediğini ortaya koymuştur. Özellikle, hücrelere girişten sorumlu PTD'nin (protein transdüksiyon alanı) bir

parçası olduğu 50 ila 77 amino asitlere karşılık gelen azurinin p28 peptidi, apoptozu indükleyebilir ve anjiyogenezi inhibe edebilir ve klinik çalışmalar yakın zamanda faz I'i sonuçlandırmıştır [21,84]. 88-113 amino asitlerine karşılık gelen bir başka azurin türevi peptit, p26, yapısal olarak ephrinB2'ye benzer olarak tanımlanmıştır, EphB2 ligand. p26, hücre sinyal yollarını inhibe ederek EphB2'ye rekabetçi bir şekilde bağlanabilir. nihai olarak kanser büyümesine katkıda bulunur [19] Son zamanlarda, kötü prognozlu meme kanseri olan hastalarla [85,86] bağlantılı olan Pcadherin, azurin için yeni bir hedef molekül olarak tanımlanmıştır [87]. Bu çalışmanın amacı, antibiyotik azurinden sorumlu bölgeyi belirlemek ve incelemek için azurinden türetilen peptitleri üretmek için tekrarlanabilir bir yöntem geliştirmek Pecaderin aktivitesi Önceki çalışmada, azurin ve bazı türevler peptitler, GST tabanlı bir strateji kullanılarak eksprese edilmiş ve saflaştırılmıştır [20]

2.3.7. Kanser Tedavisinde Azurin Uygulaması

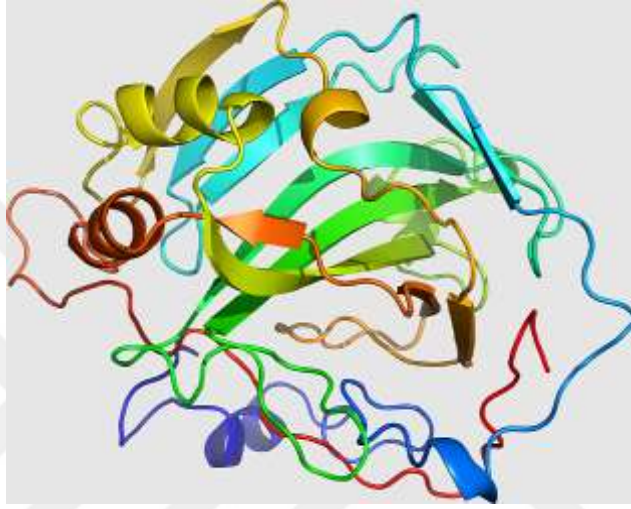
Azurinlerin bir antimikrobiyalolog olarak hareket etme yeteneğine sahip olduğu hipotezini desteklemek için birçok neden vardır. Kanser hücrelerindeki özel yolun aksine, Vivo'da düşmanca hiçbir yan etki gösterilmemiştir [63]. Daha spesifik olarak, bu protein, kanserde önemli olan farklı ilgisiz memeli proteinleriyle etkileşim için yüksek afinite zekası sergiler ve bu proteinin birincil kritik avantajı olması muhtemel olan normal çerçeve proteinin sahipliğini verir [88]. Proteinin farklı hedefler üzerinde hareket etme yeteneği, hücreler tarafından direnç oluşturması daha zor olabilen gerçeklik nedeniyle hayati önem taşır. Bu bakteriyel proteinin bir başka avantajı, azurinlerin, dokuya sızmasına ve onu kan dolaşımından uzaklaştırmasına yardımcı olabilecek hidrofobik onarımlı suda çözünür parçacıklar olabilmesidir [93]. Tüm bunlara genişlerken, azurin "Escherichia coli"de aşırı derecede etkili bir şekilde ifade edilebilir, bu da üretim yöntemini son derece ucuz [89], küçük bir protein olarak yapar, ifadenin tamamen farklı vektörler yaratabileceği varsayılabilir, burada çok az insan için hücre tipleri hesaplanır. Tüm bu nedenler, azuran partiküllerini kanser tedavisinde kullanılmaya cazip kılmaktadır [23].

2.4. Azurin ve Kanser

2.4.1. Bakteriyel Protein Azurin

Pseudomonas aeruginosa tarafından üretilen Azurin, bakır içeren protein (cupredoxin) ailesinin bir üyesidir. Doğada oldukça kararlı olan mavi küçük bakır proteini olarak da adlandırılır. 128 amino asitten oluşan periplazmik bakır içeren 14 kDa tek alanlı bir

proteindir. Yapısı, bir disülfid köprüsü ile birbirine bağlanan dört döngü ile birbirine bağlanan sekiz antiparalel şeritten oluşur. Azurin, özellikle yüzeyindeki üç farklı bağlanma bölgesi sayesinde, bir ligand üzerindeki birçok bölgeye bağlanabilir [90]. Bir tarafında iki yüklü küme içerir. Ek olarak, başka bir bölge, belirgin bir nötr aromatik zengin hidrofobik parçaya sahiptir. Phe114 merkezli bu düzenleme, bakır merkezin çevresinde bir alan kaplar. Azurin, terminal elektron transfer sürecinde donör olarak işlev görür. Bu proteinden bakır çıkarıldığında apo-azurin oluşur (Şekil 5). Apoazurin çok düşük redoks aktivitesine sahipken, önemli sitotoksisite gösterir [9].



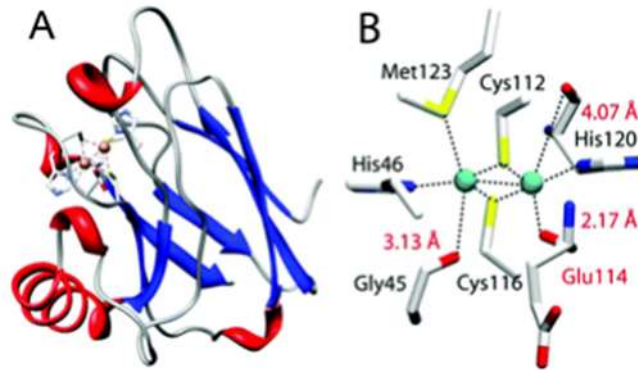
Şekil 5 Pseudomonas aeruginosa'dan azurinin Apo formu (<https://www.anyrgb.com/en-clipart-o4c1u>)

2.4.2. Azurin Salgılanması ve Konak Hücrelerle Etkileşimi

Bir redoks proteini olan Azurin, son zamanlarda insan meme kanseri hücrelerine giren ve kanser hastalarında yan etki olmaksızın apoptozu indükleyen bir antikanser terapötik ajanı olarak büyük ilgi görmüştür [91]. Çeşitli çalışmalar, bakteriyel bakır içeren proteinlerin, özellikle azurinin, kanser tedavisi için terapötik ilaçların geliştirilmesinde ve ayrıca virüsler ve parazitler gibi çeşitli bulaşıcı ajanların neden olduğu hastalıkların tedavisinde önemli bir kaynak olarak kullanılabileceğini göstermiştir [22]. Azurin'in tümör hücrelerini yok etme yeteneği, kanser gelişimini engelleyen p53 proteininin stabilitesine dayanır. Çekirdekte azurin, p53 ve BAX proteinlerinin hücre içi seviyelerini artırır ve sitozole mitokondriyal sitokrom c salınımını tetikler. Bu eylem, apoptotik süreci başlatan kaspaz kaskadını aktive eder. Azurin, tümör hücrelerine sağlıklı hücrelerden daha etkili bir şekilde nüfuz eder. 28 amino asitten ve 2,8 kDa moleküler ağırlıktan oluşan Azu 50-70 peptidi (p28), bu etkiden büyük olasılıkla sorumludur [92,23].

2.4.3. Azurin'in Kanser Hücrelerine Etkisi

Azurin'in tümör hücrelerini yok etme yeteneği, kanser büyümesini engelleyen p53 proteininin stabilitesinden kaynaklanmaktadır. Azurin, p53 ile kompleks oluşturan ilk bakteri proteini olarak rapor edilmiştir. Çoğu viral ve memeli proteini, fiziksel etkileşim yoluyla p53 fonksiyonunu düzenleyebilir. Çalışmalar, azurinin tercihen meme kanseri hücrelerine girdiğini ve apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. Ayrıca DU145 (insan prostat kanseri hücre hattı) hücrelerinde hücre döngüsü durması gözlemlenmiştir. 50-77 amino asitlerine tekabül eden p28 peptidinin, sorumlu olan PTD'yi (protein transmisyon alanı) içerdiği gösterilmiştir. Hücreye giriş için, apoptozu indükleyebilir ve farklı moleküllerle etkileşime girerek anjiyogenezi inhibe edebilir (Şekil 6) [93]. Ayrıca bu peptitten sorumlu olduğu düşünülen bir diğer durum da tümör hücrelerine sağlıklı hücrelerden daha etkin bir şekilde girmesidir [9]. Öte yandan azurin proteini, farklı bölgelerine göre antikanser, antiparaziter ve antiHIV özelliklerine sahip olduğu için umut verici bir terapötik peptit kaynağı olarak kabul edilmektedir [10].

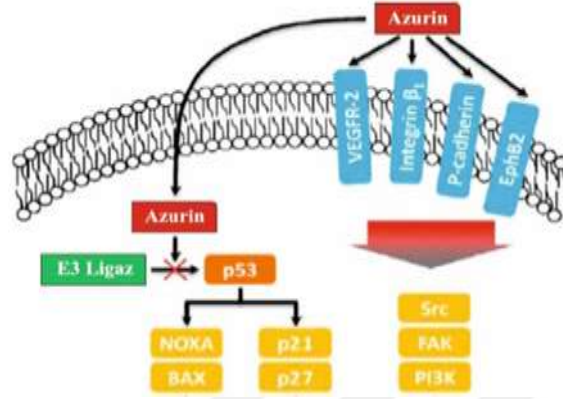


Şekil 6 Azurin yapısı: (A) azurin proteininin üç boyutlu yapısı. (B) Azurin proteininin bakır içeren alanı [Ramachandran ve ark., 2011].[94]

2.4.4. Azurin ve P53 Etkileşimi

Azurin, insan kanser hücrelerinde apoptozu ve büyüme inhibisyonunu indükler. Azurin kanser hücrelerine girer ve p53 ile bir kompleks oluşturur. Azurin-p53 kompleksi, p53'ün ubiquitin aracılı bozulmasını önleyerek p53 seviyesini artırır. Stabilize edilmiş p53, Bax ve Noxa gibi proapoptotik genleri veya p21 ve p27 gibi hücre döngüsü inhibitörlerini indüklemek için çekirdeğe döner. Azurin'in, p53 sinyal yoluna ve reseptör olmayan tirozin kinazların (NRTK) sinyalleşme ağına müdahale ederek apoptozu veya büyüme inhibisyonunu indüklediği görüldü. Bu özellikler, azurin'in antikanser aktivitesinin birden

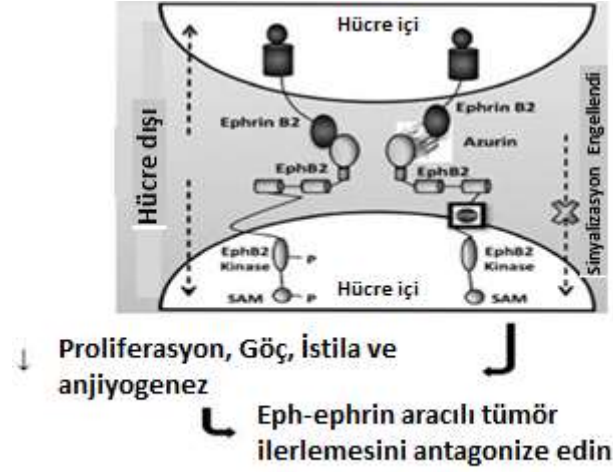
fazla hedefle etkileşime girdiğini ve hastalığın ilerlemesindeki birden çok adımı engellediğini göstermektedir [8]. Azurin etki mekanizması (Şekil 7) verilmiştir.



Şekil 7 Azurin etki mekanizması

2.4.5. Azurin ve Eph Reseptör Etkileşimi

EphB2 gibi Eph RTK'leri, kanser büyümesine yol açan hücre sinyalini başlattığı bilinen ephrinB2 gibi ephrinlere bağlanan 14 hücre dışı reseptör ailesindedir [18]. Epeprin etkileşimi, bir dizi hücre sinyal dizisini indükler. Bazı Eph reseptörleri ve ephrin ligandları, bazı tümörlerin düzenlenmesinde rol oynar. Azurin, ephrinB2 ile yapısal benzerliğe sahiptir ve EphB2, EphA6, EphA4 ve EphA7 reseptörleri ile yüksek etkileşim değerine sahiptir. Sonuç olarak, bu etkileşim, Eph-ephrin aracılı tümör ilerlemesini antagonize ederek sinyal sürecini bloke etmenin bir yolu olabilir (Şekil 8) [20].



Şekil 8 Meme kanseri hücrelerinde büyüme inhibisyonunun indüklenmesinde azurinin mekanizmalarının türü (Adapted from Bernardes ve ark., 2010).

3. MATERYALLER VE YÖNTEM:

3.1. Malzemeler

Bu çalışma, Nisan 2021 başından Temmuz 2021 sonuna kadar gerçekleştirildi. Hem cinsiyet hem de farklı yaş gruplarını içeren 150 hastadan yanık, kulak, yara sürüntüsü, balgam ve idrar örnekleri alındı, hastaların yaşları 10-68 arasındaydı. Yıllardır Ulusal Eğitim Laboratuvarları Merkezi'ne, Medical City'deki Yanık Hastanesine, etik hususlara ve hastane onayına göre sevk edildi, Sağlık ve Çevre Bakanlığı, Irak. Ayrıca, tüm bu deneyimler ve gereksinimler, Bağdat Üniversitesi Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Lisansüstü Çalışmalar için etik kurulu tarafından onaylanmıştır. Bu proje, Irak'taki Bağdat Üniversitesi Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü ve Al-Qadisiyah Üniversitesi-Veterinerlik Fakültesi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Konu:

3.1.2. Ekipman ve Aletler

Kaynaklarla bu çalışmanın deneyimlerinde kullanılan araç ve gereçler aşağıda (Çizelge 6) verilmiştir.

Çizelge 6 Bu çalışmada kullanılan ekipman ve enstrümanlar ile firmalar ve menşei.

No.	Ekipman Ve Aletler	Şirket	Menşei
1	Otoklav	Tomy Seiko	Japonya
2	Denge	Kernp	Almanya
3	Santrifüj	Hettich	Amerika Birleşik Devletleri
4	Densicheck Plus Cihazı	Biyomerieux	Fransa
5	Dijital Kamera	Kanon	Japonya
6	Tek Kullanımlık Petri Kapları	El-Şems	Ürdün
7	Eppendorf Tezgah Santrifüjü	Hettich	Amerika Birleşik Devletleri
8	Dondurucu (-20)	Haier	Çin
9	Derin Dondurucu (-80)	Haier	Çin
10	Jel Elektroforez Sistemi	Aparat	Amerika Birleşik Devletleri
11	Kuluçka Makinesi	Memmert	Almanya
12	Laminer Akış Başlığı	Gallenkamp	İngiltere
13	Mikropipetler (10-1000µl)	İnsan	Almanya
14	Mikroskop	Olimpos	Japonya
15	Mikro-Spin Santrifüj	Biyosan	Almanya
16	Mikrodalga	Gosonik	Çin
17	Nano Damla	Biyoner	Güney Kore

18	Fırın	Memmert	Almanya
19	Buzdolabı	Teka	Ispanya
20	Hassas Terazi	Sartorius	Almanya
21	Çalkalayıcı-İnkübatör	Esnafl Bilimsel	Amerika Birleşik Devletleri
22	UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu	Japonya
23	Termal bisikletçi Cihazı	Uygulamalı Biyosistem	Amerika Birleşik Devletleri
24	Termik-Manyetik Karıştırıcı	Ika-Werk	Almanya
25	Ultraviyole Işık Transillüminatör	Vilberlourmat	İtalya
26	VITEK2 Sistem Cihazı	Ika-Werk	Fransa
27	Girdap	Vilberlourmat	Almanya
28	Su Banyosu	Biyomerieux	Almanya
29	Su Damıtma Cihazı	Jrad	Çin
30	Sonikatör	Memmert	Birleşik Krallık
31	Diyaliz Torbaları	Jrad	Amerika Birleşik Devletleri
32	Brülör	Soniprep	Türkiye

3.1.3.Kimyasallar

Bu çalışmada deneyimlerde kullanılan kimyasallar aşağıda (Çizelge 7) verilmiştir.

Çizelge 7 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ile firmalar ve menşei

NO	Kimyasallar	Şirket	Menşei
----	-------------	--------	--------

1	Mutlak Etanol	Bdh	İngiltere
2	Agaroz	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
3	Ağar Ağar	Himedia	Hindistan
4	DNA Merdiveni (100 Bp)	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
5	DNA Yükleme Boyası	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
6	Etilen-Diamin Tetraasetik	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
7	Asit (EDTA)	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
8	Etidyum Bromür	Bdh	İngiltere
9	Naoh	Bdh	İngiltere
10	Gliserol 20%	Sigma	Amerika Birleşik Devletleri
11	Gram Boyama	ROMIL Kimya	Saf Birleşik Krallık
12	Izopropanol	Promega	Amerika Birleşik Devletleri

14	Mgcl2		Promega	Amerika Birleşik Devletleri
15	Nükleaz İçermeyen Su		Alfa DNA'sı	Kanada
16	Primerler		Bdh	İngiltere
17	Sodyum (NaCl)	Klorür	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
18	TBE (10X)	Arabelleği	Sigma Aldrich	Birleşik Krallık
19	Iptg		Apollon	Hindistan
20	Kanamisin		Sigma Aldrich	Birleşik Krallık
21	Sefakril S-1000		Biyoner	Kore

3.1.4. Kültür Medyası

Bu çalışmada deneyimlerde kullanılan kültür ortamları aşağıda (Çizelge 8) verilmiştir.

Çizelge 8 Bu çalışmada kullanılan kültür ortamları ile firmalar ve menşei.

No.	Kültür Medyası	Şirket	Menşei
1	Tripton	Himedia	Hindistan
2	Maya Özü	Himedia	Hindistan
3	Brian Kalp Infüzyon Suyu	Himedia	Hindistan
4	Setrimid Agar Tabanı	Himedia	Hindistan
5	Macconkey Ağarı	Oksoid	Birleşik Krallık
6	Besin Ağarı	Himedia	Hindistan

7	Besin Suyu	Himedia	Hindistan
8	Metil Kırmızı-Voges Proskauer (MR-VP) Suyu	Himedia	Hindistan
9	Peptonlu Su Suyu	Direk	Birleşik Krallık
10	Simmons'sitrat Agar	Himedia	Hindistan
11	Üre Agar Tabanı	Direk	Birleşik Krallık
12	Motilite Ortamı	Himedia	Hindistan

3.1.5. Kitler

Bu çalışmada deneyimlerde kullanılan kitler aşağıda (Çizelge 9) verilmiştir.

Çizelge 9 Bu çalışmada kullanılan kitler firmalar ve menşei

No.	Kit	Şirket	Menşei
1	Vitek® 2gn	Biyomerieux	Fransa
2	Vitek® 2 Ast-Gn222	Biomerieux	Fransa
3	Sihirbaz Genomik DNA Saflaştırma	Promega	Amerika Birleşik Devletleri
4	Genejet PCR Saflaştırma	Thermo Fisher Bilimsel	Amerika Birleşik Devletleri

3.1.6. Çözümler ve Tamponlar

3.1.6.1. Oksidaz Reaktifi:

Bu reaktif 1 g N, N, N, N-tetra metil Fenilen diamindihidroklörürün (100 mi) damıtılmış su (D.W) içinde çözülmesiyle hazırlandı. Daha sonra karanlık bir kaptta saklanmış ve doğrudan kullanılmıştır. [95]

3.1.6.3. Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi (10N)

40 g NaOH 60 ml distile suda çözülerek hazırlanmış ve hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır. [96]

3.1.6.4. Etidyum Bromür Solüsyonu

0.25 g Ethidium bromür boyası 50 ml D.W içinde çözülerek 5 mg/ml nihai konsantrasyonda çözelti elde edilerek hazırlandı ve 4°C'de tutuldu.

3.1.6.5. Standart Bulanıklık Çözümü (Mcfarland Tüp No. 0.5)

(0.5 ml) (%1.175) baryum klorür dihidratın (99.5 ml) (%1) sülfürik aside eklenmesiyle, (625 nm)'de ve eşdeğeri (0.08-0.13) soğurma aralığına sahip dereceli silindir üreten çözelti karışımı üretilerek hazırlanmıştır. 1.5×10^8 CFU/ml [97].

3.1.6.6. Normal Tuzlu Çözelti (NaCl) (%0,85)

(0.85 g) NaCl on ml D.W içinde çözülerek hazırlandı ve hacim D.W ile (100 ml)'ye tamamlandı, ardından otoklavlanarak sterilize edildi.

3.1.6.7. Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (50mM)

1.86 g Na₂-EDTA'nın 90 ml DW içinde çözülmesiyle hazırlandı, pH 8'e ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

3.1.6.8. Tris Borat Edta Tampon 1x (Tbe 1x)

Bu tampon, stok TBE çözeltisinin (10X, Promega/ ABD) bir litreye seyreltilmesiyle (100 mi) (900 mi) D.W. 1000 ml TBE (1X) elde etmek için.

3.1.6.9. Protein Saflaştırma Tamponları ve Çözümleri

-liziz tamponu: 25 mM Tris HCl ve 2 mM EDTA pH 7.6 ile hazırlandı

-Elüsyon tamponu: NaCl'den 300 mM, Gliserol'den %5 ve İmidazol'den 400 mM'de pH 8'de 50 mM Tris ile hazırlandı.

-Yıkama tamponu: (NaCl'den 300 mM içinde pH 8'de 50 mM Tris, İmidazolden %5 Gliserol ve 20 mM) ile hazırlanmıştır.

- Tris-HCl Tamponu (0.05M, pH=8.0): Bu çözelti, 6.057g Tris-HCl'nin 900ml distile su içinde çözülmesi, pH'ı 8'e ayarlanması ve daha sonra distile su ile tam hacmi 1000 ml'ye getirilmesiyle hazırlandı.

-Bradford Çözeltisi: 0.1 g Commasie Brilliant Blue G250 50ml %95 etanol içinde çözülüp 100ml fosforik asit (%85) solüsyonu soğutularak ve karıştırılarak ilave edildikten sonra hacim distile su ile litreye tamamlanarak hazırlanmıştır. Leke whatman filtre kağıdından iki kez süzüldü ve kullanılmaya kadar koyu renkli şişede 4°C'de saklandı.

3.1.6.10. İyonik Değişim Çözümleri

-NaCl (0.25 M): 7.5g NaCl'nin 500 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanır.

-NaOH (0.25M): 5g NaOH'nin 500 ml distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı.

-HCl (0.25M): 400ml distile suya 10.4ml konsantre HCl eklenerek hazırlanan bu solüsyon daha sonra distile su ile hacmi 500ml'ye tamamlanmıştır.

- NaCl (1M): Bu çözelti, 5,84g NaCl'nin 100 ml sıvı içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. 0.05M Tric-HCl tamponu.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Sterilizasyon Yöntemleri

Kültür ortamları için otoklavlama (15 P/In2 altında 121°C 15 dakika) kullanılarak nemli ısı sterilizasyonu dahil olmak üzere kullanılan sterilizasyon yöntemleri. Cam eşyalar için fırın (180°C'de 2 saat) kullanılarak yapılan kuru ısı sterilizasyonu [118]

3.2.2. Kültür Medyasının Hazırlanması

Kürent çalışmasında kullanılan tüm kültür besiyerleri üreticinin talimatlarına göre hazırlandı. Tüm bileşenlerin tamamen çözülmesi için bir su banyosunda kaynatıldılar. Daha sonra belirli koşullarda (121°C 15P/In2 altında 15 dakika) otoklavlanarak sterilize edilir. Sterilizasyonu kontrol etmek için kültür ortamı 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

3.2.3. Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarının Korunması

Pseudomonas aeruginosa izolatları üç yöntem kullanılarak korunmuştur:

Kısa Süreli koruma için (iki haftaya kadar), bakteri izolatları bir besleyici agar plakalarında (24 saat boyunca 37°C) büyütüldü, daha sonra 4°C'de saklandı.

Ortalama Süreli Koruma (5 aya kadar) için bakteri izolatları, besleyici agar slantlarında (37°C 24 saat boyunca) büyütüldü, ardından 4°C'de saklandı.

Uzun Süreli Koruma (5 aydan fazla) için bakteriyel izolatlar beyin kalp infüzyon besiyerinde (37 °C 24 saat) büyütüldü, daha sonra %20 steril gliserol ilave edildi ve dondurucu-20°C'de saklandı. [98].

3.2.3. Numunelerin Toplanması

Bu çalışma sırasında 150 hastadan klinik örnekler (yanık, kulak, yara sürüntüleri, balgam ve idrar örnekleri alınmış ve steril ve aerobik koşullarda MacConkey agar ve setrimid agar içeren seçici besiyeri kullanılarak kültüre alınmak üzere hemen laboratuvara aktarılmış ve daha sonra(37°C) de gece boyunca inkübe edilmiştir.

3.2.4. Pseudomonas Aeruginosa Teşhisi

3.2.4.1. Manuel Teşhis

P. aeruginosa izolatlarının büyüyen kolonileri, başlangıçta aşağıdakilere bağlı olarak teşhis edildi:

- **Morfolojik Özellikler**

Büyüyen kolonilerin morfolojik özellikleri, kolonilerin rengini, şeklini içerir.

- Gram boyama

1-Öncelikle bakteri filmi hazırlanır ve sabitlenir.

2- Bakteri filmi 1 dakika kristal viyole solüsyonuna daldırıldı.

3-Ardından birkaç saniye çeşme suyu ile yıkandı ve 30 saniye iyot solüsyonu ile kapatıldı.

4- Bakteri filmi 15 saniye çeşme suyu ile yıkandı ve %95 etanol ile rengi açıldıktan sonra çeşme suyu ile yıkandı ve safranin solüsyonu ile 10 saniye boyandı.

5- Son olarak bakteri filmi çeşme suyu ile yıkandı ve kurutulduktan sonra mikroskopta (yağ daldırma lensleri) incelendi.

- **Biyokimyasal Testler**

Ana konvansiyonel tanı yöntemi olarak oksidaz testi şu şekilde uygulandı: Bir filtre kağıdına üç damla taze oksidaz reaktifi eklendi. Daha sonra bu filtre kağıdının üzerine bir izolat kolonisi yerleştirildi. Pozitif test 20-30 saniye içinde mor renk gösterirken, negatif sonuç

renksiz veya açık pembe renk gösterdi. Gerekli biyokimyasal testlerin geri kalanı için, biyokimyasal besiyeri üreticinin talimatlarına göre steril bir durumda hazırlandı ve hemen taze koloni ile inoküle edildi, ardından inkübe edildi (37°C 24 saat). Bu testler şunları içerir: [99]

1. İndol testi: 24 saat inkübasyondan sonra, peptonlu su içeren her tüp için bir damla Kovac's indikatörü eklendi. 5-10 saniye sonra sonuç okundu.
2. Metil kırmızısı testi: 24 saatlik inkübasyondan sonra, her tüpe beş damla metil kırmızısı reaktifi eklendi ve sonuç doğrudan okundu.
3. Voges-Proskauer testi: 6 saatlik inkübasyondan sonra, her tüpe (3 damla) %40 KOH ilave edildi ve hafifçe çalkalanarak karıştırıldı, ardından bir alfa-naftol reaktifinden (2 damla) sonra tüpler 30 dakikaya kadar beklemeye izin verilir.
4. Simmon sitrat testi: Sonuç doğrudan okunduktan sonra 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi.
5. Motilite testi: Motilite ortamını (yarı katı ortam) içeren tüpler, 24 saatlik kültür ile bıçaklanarak inoküle edildi ve 24 saat inkübe edildi.

3.2.4.2. Hızlı Otomatik Teşhis

-Vitek 2 testi (O'Hara ve Miller, 2003): Bu çalışmada bakteri izolatlarının teşhisi için birkaç adımı içeren Vitek 2 testi kullanıldı:

-Bakteri süspansiyonunun hazırlanması: Saf bir kültürün yeterli bakteri kolonisini aktarmak için steril bir sürüntü kullanıldı ve şeffaf plastik bir test tüpünde 3 ml steril salin içinde süspanse edildi.

-Kimlik kartının aşılması: Bakteri süspansiyonunu içeren bir test tüpü bir kasete yerleştirildi, ardından transfer tüpü ilgili süspansiyon tüpüne yerleştirilirken komşu yuvaya yerleştirildi. Vakum uygulandıktan sonra, bakteri süspansiyonu transfer tüpünden tüm test kuyularını dolduran mikro kanallara zorlandı. Gerekli inkübasyon süresinden sonra reaksiyon okumaları için optik sistem rapor edildi.

3.2.4.3. Pseudomonas Aeruginosa'nın Moleküler Tanımlanması

P. aeruginosa izolatları tanı yöntemleri ile tanımlandı ve PCR yöntemi kullanılarak *gyrA* geninin saptanması için sunuldu. Ekstrakte edilen DNA örneği, *gyrA* geni için spesifik primerler ile singleplex PCR reaksiyonunda şablon olarak kullanılmıştır. (F-GGTCTGGGCATAGAGGTTGT, R-GAAGATCGAGGGTATTTCGG) PCR amplifikasyonu, şablon DNA'nın 94 °C'de 3 dakika denatüre edilmesiyle başladı, ardından

35 döngü denatürasyon (30 saniye için 94 °C), tavlama (30 saniye için 55 °C) ve uzatma (30 saniye için 72 °C) ile devam etti. 5 dakika boyunca 72 °C'de son bir uzatma adımı. Pozitif sonuç, jel elektroforezinde (120 bp) bir bant gösterdi.

3.2.5. Pseudomans Aeruginosa'nın Antibiyotik Duyarlılığı

P. aeruginosa için antibiyotik duyarlılık testi, (Tetrasiklin, Ampisilin, piperasilin, seftazidime, Siprofloksasin, imipenem, meropenem, amikasin, tobramisin, kolistin Levofloksasin ve gentamisin).

3.2.6. Moleküler Analiz

3.2.6.1.DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA, üreticinin talimatlarına göre aşağıdaki protokole göre ticari bir sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti (Promega, ABD) kullanılarak P. aeruginosa izolatlarından özümlendi:

1. Beyin kalp infüzyon suyunda (Himedia, Hindistan) 37°C'de büyütülen kültüre bir gecelik bakteri ilave edildi, her bakteri izolatu için 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
2. Mikrosantrifüj tüpleri, hücreleri peletlemek için 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi ve süpernatant çıkarıldı.
3. Altı yüz mikrolitre çekirdek liziz solüsyonu (sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti) eklendi ve hücreler yeniden süspansiyon edilene kadar nazikçe pipetlendi.
4. Mikrosantrifüj tüpleri, hücreleri parçalamak için 80°C'de bir su banyosunda 5 dakika inkübe edildi ve daha sonra oda sıcaklığına soğutuldu.
5. Hücre lizatına üç mikrolitre RNase solüsyonu (sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti) ilave edildi ve mikrosantrifüj tüpleri karıştırılmak üzere 5 kez ters çevrildi.
6. Mikrosantrifüj tüpleri 37°C'de 60 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığına soğutuldu.
7. İki yüz mikrolitre protein çöktürme çözeltisi (sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti), RNase ile muamele edilmiş hücre lizatına ilave edildi ve protein çöktürme çözeltisini hücre lizatı ile karıştırmak için 20 saniye boyunca yüksek hızda kuvvetli bir şekilde girdaplandı.
8. Mikrosantrifüj tüpleri buz banyosunda 5 dakika inkübe edildi ve 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.

9. DNA'yı içeren süpernatant, 600 mikrolitre oda sıcaklığında izopropanol içeren 1.5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 10. Mikrosantrifüj tüpleri, iplik benzeri DNA şeritleri görünür bir kütle oluşturana kadar ters çevrilerek nazikçe karıştırıldı ve 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.

11. Süpernatant dikkatlice döküldü ve mikrosantrifüj tüpleri temiz emici kağıt üzerine boşaltıldı.

12. Oda sıcaklığında %70 etanolde altı yüz mikrolitre eklendi ve ardından mikrosantrifüj tüpleri DNA peletini yıkamak için birkaç kez nazikçe ters çevrildi.

13. Mikrosantrifüj tüpleri 14000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi ve etanol pipetleme ile dikkatlice aspire edildi.

14. Mikrosantrifüj tüpleri temiz emici kağıt üzerine boşaltıldı ve pelet 15 dakika süreyle havada kurumaya bırakıldı.

15. Mikrosantrifüj tüplerine yüz mikrolitre DNA rehidrasyon solüsyonu (sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti) ilave edildi, DNA 65°C'de 1 saat inkübe edilerek rehidre edildi.

16. Çözelti, mikrosantrifüj tüplerine hafifçe vurularak periyodik olarak karıştırıldı ve DNA örneği, kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2.6.2. Tris Borat Edta Tampon 1x (Tbe 1x)

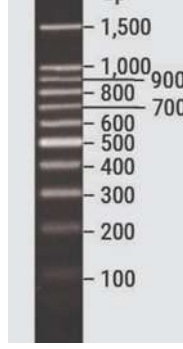
Bu tampon, 1000 ml TBE (1X) elde etmek için 900 ml damıtılmış suya 100 ml TBE 10X eklenerek hazırlanmıştır.

3.2.6.3. Agaroz Jelin Hazırlanması [96]

- P. aeruginosa'nın DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra, ekstrakte edilen bakteri DNA'sının varlığını ve bütünlüğünü doğrulamak için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Agaroz jeli, bir beher içindeki (1x) TBE tamponuna agaroz tozu eklenerek hazırlandı. Daha sonra çözelti mikrodalga kullanılarak ısıtıldı. Daha sonra, etidyum bromür lekesi eklemek için çözelti 50-60°C'de soğutuldu.

3.2.6.4. DNA Merdiveni

DNA merdiveni Promega/ABD sağlandı, her jel elektroforezi çalışması için agaroz jelle 5 µl DNA merdiveni yüklendi



3.2.6.5. Astar Hazırlama ve Saklama

Bu primerler (Alpha DNA Company) tarafından liyofilize edilmiş bir ortamda sağlandı. Liyofilize primerler, bir nükleaz içermeyen su içinde çözündürüldü.

Bir stok solüsyonu olarak 100 picomol/ μ l'lik nihai konsantrasyon. Bu primerlerden 10 μ l stok solüsyonu 90 μ l nükleaz içermeyen suya eklenerek 10 picomol/ μ l çalışan bir primer solüsyonu elde edilerek hazırlandı (dondurucuda -20 C'de saklandı).

3.2.6.6. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Tahmini

İzolatların ekstrakte edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu, numunelerin nükleik asit içeriği 1 μ l hacimde ölçülerek Nanodrop spektrofotometre kullanılarak tahmin edildi. DNA, 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon ile ultraviyole ışığı emdi. Bu örneklerin saflığı, 280 nm'deki absorpsiyonla karşılaştırıldığında 260nm'deki absorpsiyonun fark edilmesiyle saptandı. 260:280 oranı, protein kontaminasyonunun iyi bir göstergesi olarak kabul edildi.

3.2.7. Pseudomonas Aeruginosa'nın Azu Geninin Moleküler Taraması.

Azurin geni (azu), genomik DNA'nın PCR amplifikasyonu ile amplifiye edildi. Spesifik primerler kullanıldı (tablo 11) primerler. PCR amplifikasyonu, şablon DNA'nın 94 °C'de 3 dakika denatüre edilmesiyle başladı, ardından 35 döngü denatürasyon (30 saniye için 94 °C), tavlama (sn için 58 °C) ve uzatma (30 saniye için 72 °C) ile devam etti. (Tablo 10) içinde özetlendiği gibi 5 dakika boyunca 72 °C'de son uzatma adımı devam etti.

3.2.7.1. PCR Programı

Azu geninin amplifikasyonu için PCR programının optimizasyonu, birkaç denemeden sonra gerçekleştirildi; bu nedenle aşağıdaki programlar kabul edilmiştir (Çizelge 10).

Çizelge 10 aeruginosa'nın azu geninin saptanması için PCR programı

No.	Adım	Sıcaklık. (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
1	İlk Denatürasyon	94°C	2 dk	1 döngü
2	Denatürasyon	94°C	30 sn.	35 döngü
3	Tavlama	58°C	30 sn.	
4	Uzantı	72°C	30 sn.	
5	Son Uzatma	72°C	5 dk.	1 döngü
6	Depolamak	4°C	∞	-

3.2.7.2. Primer Seçimi

P. aeruginosa'nın azu geni için spesifik amplifikasyon verebilen PCR reaksiyonu için primerleri seçmek için azu primerleri (Azu-F ve Azu-R) aşağıdakine göre belirlendi. Vektör içinde azu geninin varlığını doğrulamak için klonlama sonrası PCR reaksiyonunda (Azu-pet28-F ve Azu-pet28-R) kullanıldı. PCR reaksiyonu, 30 ng genomik DNA, her bir ileri ve geri primerden 0,4 uM, 25 uL 2X PCR ana karışımı (Bioline co., ABD) ve 19 uL nükleaz içermeyen su içeriyordu. Termocycler'daki (Biometra co., Analytik Jena, Almanya) PCR koşulları şu şekilde ayarlandı: 95 °C, 5 dakika (ilk denatürasyon), bir döngü için, 30 döngü, her biri: 95 °C için 1 dakika (denatürasyon için), 58 °C 1 dk (tavlama için), 72 °C 45 sn (denatürasyon için) ve son uzama için bir döngü 72 °C'de 10 dk. PCR sonlandırıldıktan sonra, %1 agaroz jel elektroforezi üzerinde bir kısım kontrol edildi. Beklenen 444 bp boyutunda görselleştirilmiş PCR ürünü, GeneJET PCR saflaştırma kiti (Thermo Fisher Scientific, Co., ABD) kullanılarak saflaştırmaya tabi tutuldu. Ardından saflaştırılan PCR ürünü sekanslamaya tabi tutuldu (Macrogen Co., USA). Bu primerlerin genel özellikleri, sunucuda bulunan Primer-BLAST çevrimiçi programı kullanılarak kontrol edildi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Bu primerlerin adı ve dizisi aşağıda (Çizelge 11) listelenmiştir.

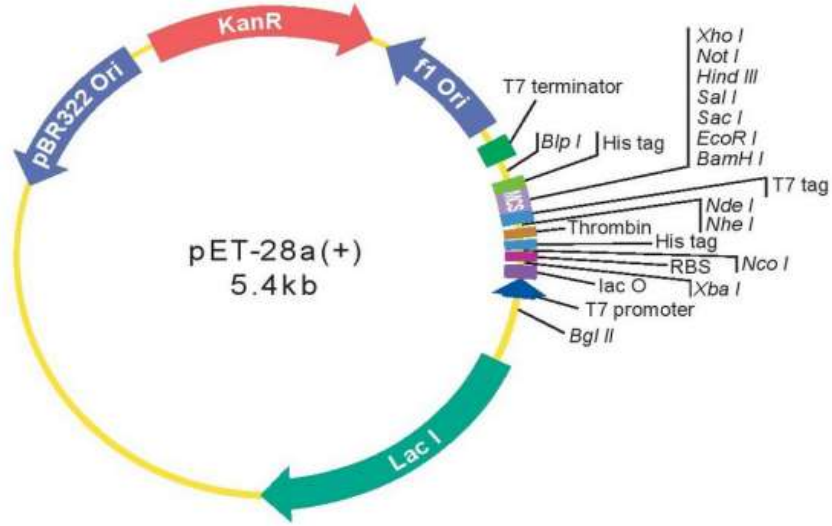
Çizelge 11 Azu geninin primerlerinin adı, dizisi ve beklenen boyut ürünü

İsim	Sequence of primer (5'-3')	Beklenen boyut
Azu-F	AAGCTTGCCCAAGCTTACCTAGGAGGCTGCTCCATGC TA	500 bp
Azu-R	GGATCCTGAGCCCCTGTAGGCGCCCATGAAAAGCCC GGC	500 bp
Azu-pet28a-F	5'-ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTA-3'	444 bp
Azu-pet28a-R	5'- TCACTTCAGGGTCAGGGTGCCCTTC-3'	444 bp

Beş izolattan üretilen azu geninin amplikonları, varyasyonu belirlemek için dizileme için sunuldu.

3.2.8. Bakteriyel Suşlar ve Vektörler

E. coli (BL21) DE3 Rosetta suşu, rekombinant proteinler için ekspresyon konakçıları olarak kullanıldı. pET-28a (+) vektörü (Şekil 9) bir ekspresyon vektörü olarak kullanıldı. Bu çalışmada Azurin (AZU) geninin izolasyon kaynağı olarak lokal bir izolat olan Pseudomonas aeruginosa kullanılmıştır. Tüm bakteri suşları %50 (h/h) gliserol stoklarında uzun süreli koruma için muhafaza edildi ve -80oC'de saklandı.



Şekil 9 pET-28a vektörü için şematik yapı

3.2.9. E. Coli Kimyasal Olarak Yetkin Hücrelerin Hazırlanması

Yukarıda belirtilen *E. coli* türünün yetkin hücreleri, CaCl_2 kullanılarak daha önce tarif edildiği gibi [96] hazırlandı. Kısaca, 250 mL'lik bir Erlenmeyer şişesi içinde 100 mL LB'yi aşılama için 1 mL gecelik *E. coli* tohum kültürü kullanıldı. Aşılama suyu, 600 nm'de 0.4'lük bir optik yoğunluğa ulaşana kadar, 2-3 saat boyunca 200 rpm'lik bir çalkalama hızı ile 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra bakteri üremesi buz üzerinde 30 dakika durduruldu. Hücreler 4,500 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek toplandı. Süpernatantın boşaltılmasından sonra bakteri peleti 20 mL soğuk 0.1 M CaCl_2 içinde süspansiyon edildi ve 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Hücrelerin toplanması 4,500 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek elde edildi. Bakteri peleti 2 mL soğuk 0.1 M CaCl_2 içinde süspansiyon edildi ve bu bakteri süspansiyonu, yani bu adımda kimyasal olarak yetkin *E. coli* hücreleridir. Bakteri süspansiyonu eppendorf tüplerine dağıtıldı, her tüp 100 uL bakteri süspansiyonu ve 100 uL %100 (h/h) gliserol içeriyordu. Bundan sonra, kimyasal olarak yetkin *E. coli* hücrelerinin gliserol stokunu içeren eppendorf tüpleri -80°C'de korunmuştur.

3.2.10. E. Coli'nin Kimyasal Olarak Yetkin Hücrelerinin Dönüşümü

Bir eppendorf tüpüne (100 uL) dağıtılan kimyasal olarak yetkin *E. coli* hücreleri, 2-3 uL (50 ng) vektör (plazmit) ile karıştırıldı. Karışım buz üzerinde 40 dakika tutuldu. Daha sonra hücreler su banyosunda 42°C'de 45 saniye ısı şokuna tabi tutuldu ve ardından eppendorf tüp

5 dakika buza daldırıldı. Daha sonra eppendorf tüpüne 900 µL LB broth ilave edildi ve 37°C'de 180 rpm çalkalama hızı ile 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, bu 1 mL'lik kültür, 34 ug/mL'lik bir nihai konsantrasyonda uygun seçilebilir işaretleyici kanamisin içeren LB agar plakalarının yüzeyine yayıldı. Daha sonra aşılınmış agar plakaları 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.2.11. Pseudomonas Aeruginosa Yerel Suşundan Azurin (Azu) Kodlayan Genin Klonlanması

Pseudomonas aeruginosa PAO1'den Azurin (Azu) genini kodlayan açık okuma çerçevesi GenBank'tan alındı. Bu açık okuma çerçevesi, NC_002516.2 erişim numarasına sahip Pseudomonas aeruginosa PAO1 genomundaki c5522610-5521164 nükleotidinden oluşmaktadır. AZU lokusu için protein kimliği NP_253609.1 idi. Azurin (Azu) açık okuma çerçevesinin tüm uzunluğunu PCR ile büyütmek için bu diziyeye dayalı olarak gene özel bir primer tasarlanmıştır. Bu primer seti, Azu'yu kodlayan tüm uzunluktaki açık okuma çerçevesini yükseltmek için kullanıldı.

Irak'tan lokal olarak izole edilmiş bir P. aeruginosa türünden gen.

Azu geninin nükleotid dizileri: Yerel suştan Azu geni P.aeruginosa ve By Genscript Co., ABD tarafından sentezlenen P.aeruginosa PAO1'den referans gen NP_253609.1. Daha sonra, eşanlı olarak ligasyondan bağımsız klonlama (LIC) olarak adlandırılan EZ Clone yöntemiyle pET-28a (+) ekspresyon vektörü üzerinde klonlandı. Şekil 1 ve 2, CloneEZ yöntemi kullanılarak P.aeruginosa yerel suşundan Azu genini ve P.aeruginosa PAO1'den referans Azu genini taşımak için GenScript tarafından sentezlenen pET-28a(+) vektör haritasını temsil etmektedir. İki yapı şu şekilde aday gösterildi: P.aeruginosa yerel suşundan Azu genini taşıyan pET-28a (+)/Azu yerel yapısı ve pET-28a (+)/Azu referansı ve Azu referans genini (NP_253609.1) P.aeruginosa PAO1, sırasıyla.

3.2.12. Pet-28a (+) /Azu Yapılarının E. Coli BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerine Dönüştürülmesi

pET-28a (+)/Azu referansı ve pET-28a (+)/Azu lokal yapıları, yukarıda bahsedildiği gibi E. coli BL21 (DE3) Rosetta kimyasal olarak yetkin hücrelere dönüştürülmüştür. Dönüştürücüler, gece boyunca 37°C'de LB/kanamisin plakaları üzerinde büyütüldü.

3.2.13. Pet-28a (+) /Azu Yapılarını Barındıran E. Coli BL21 (DE3) Rosetta Hücrelerinin Transformantlarının Taranması

Dönüştürücü hücrelerden, ayrı ayrı pET-28a (+)/Azu referansı ve pET-28a (+)/Azu'yu yerel olarak taşıdığı varsayılarak rastgele seçilen beş tek koloni, 50 mL falkon tüplerde 15 mL LB/kanamisine ayrı ayrı aktarıldı. İnoküle edilen broth'lar 16 saat 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, GeneJET plazmit miniprep kiti (Thermo Fisher Co., ABD) kullanılarak on kültürden plazmit mini hazırlık yapıldı. İzole edilen plazmitler, pET-28a (+) vektörü üzerinde Azu geninin varlığını kanıtlamak için PCR şablonları olarak kullanıldı. Tek bir koloniden kaynaklanan saf bir kültürden izole edilen her plazmit, MluI ve XhoI kısıtlama sindirimi kullanılarak kısıtlama sindirimine tabi tutuldu. Çift sindirim reaksiyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 1 ug plazmit, 4 U MluI, 4 U XhoI, 1 uL (10X kısıtlama sindirim tamponu), 3uL nükleaz içermeyen su. Kısıtlama sindirim reaksiyonu, gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün, kısıtlama sindirim reaksiyonunun bir alikotu, %1 agaroz jel elektroforezine uygulandı.

3.2.14. Azu Geninin Aşırı İfadesi

E. coli BL-21'den (DE3) azurin geninin ekspresyonu için rekombinant koloni, LB broth içinde büyütüldü ve IPTG ile indüklendi.

3.2.15. Azurin Proteininin Saflaştırılması

Proteinin saflaştırılması için, elüsyon tamponu (pH 8'de 50 mM Tris 300mM NaCl, %5 Gliserol, 400 mM İmidazol) ve yıkama tamponu (pH 8'de 50 mM Tris 300mM NaCl, %5 Gliserol ve 20 mM İmidazol) hazırlandı.

3.2.15.1.Hücre Hasadı ve Bozulması.

Bakteri hücreleri 10000 rpm'de 30 dakika 4°C'de santrifüjleme yoluyla toplandı, bir kez (25 mM) Tris HCl ve (2 mM) EDTA, pH 7.6 ile yıkandı, 10 ml aynı tampon içinde süspanse edildi ve ultra-sonikater ile parçalandı 1 dakika buzlu su banyosunda. Parçalanan hücre süspansiyonu, 10000g'de 15 dakika süreyle 4°C'de santrifüjlendi ve ham enzim özütü (süpernatant), dondurarak kurutucu tipi ile liyofilize edildi, daha sonra kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

3.2.15.2. Dietil Kullanarak İyon Değişimi ile Ayırma Aminoetil-Selüloz (DEAE-Selüloz)

A-DEAE- Selülozun Hazırlanması: DEAE selüloz değiştiricisi, Whitaker, (1972) tarafından açıklanan yöntem izlenerek hazırlandı ve kolona dolduruldu. Yirmi beş gram DEAE-selüloz 1000 ml damıtılmış su içinde süspanse edildi ve bir süre çökelmeye bırakıldı. Yüzen pullar, üst katman temizlenene kadar çözeltiden çıkarıldı, ardından bir vakum pompası kullanılarak süzüldü. Çökelti 250ml (0.25M NaCl, 0.25M NaOH) solüsyonunda süspanse edildi, süzüldü ve birkaç kez damıtılmış su ile yıkandı ve ardından 250ml (0.25M) HCl ile yıkandı. Kolon, iyon değiştirici DEAE selülozda (2x8) cm boyutlarında olacak şekilde mobilize edildi ve Tris-HCl tampon solüsyonu ile dengelendi.

B- İyon Değiştirici Reçine (DEAECselüloz) yoluyla proteinin ayrılması: Diyalizat, (2x8) cm çapındaki anyon değiştirici DEAE-selüloz kolonuna yüklendi, 0.05 mM Tris-HCl tamponu pH 8.0 ile dengelendi. Enzim yüklü kolon, bağlanmamış numune bileşenlerini çıkarmak için 500 ml aynı tamponla yıkandı. Kısmen saflaştırılmış konsantre azurin proteini, dikkatlice kolona yüklendikten sonra ayrı ayrı geçirildi. Daha sonra (100 mi) (0.05 mM) Tris-HCl tamponu pH (8.0) eklendi. Proteinler, 0.05 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.0) içinde (0.125-1.0 M) aşamalı tuz konsantrasyonunun (200 mi) kullanılmasıyla ayrıştırıldı. (5 mi) fraksiyonları düz tüpler ile toplandı ve emicilik (280 nm)'de izlendi. UV-Vis Spektrofotometre ile ölçüldü Elde edilen protein fraksiyonları toplandı ve diyaliz torbası (4000 MW cut-off) kullanılarak sakaroz içinde konsantre edildi.

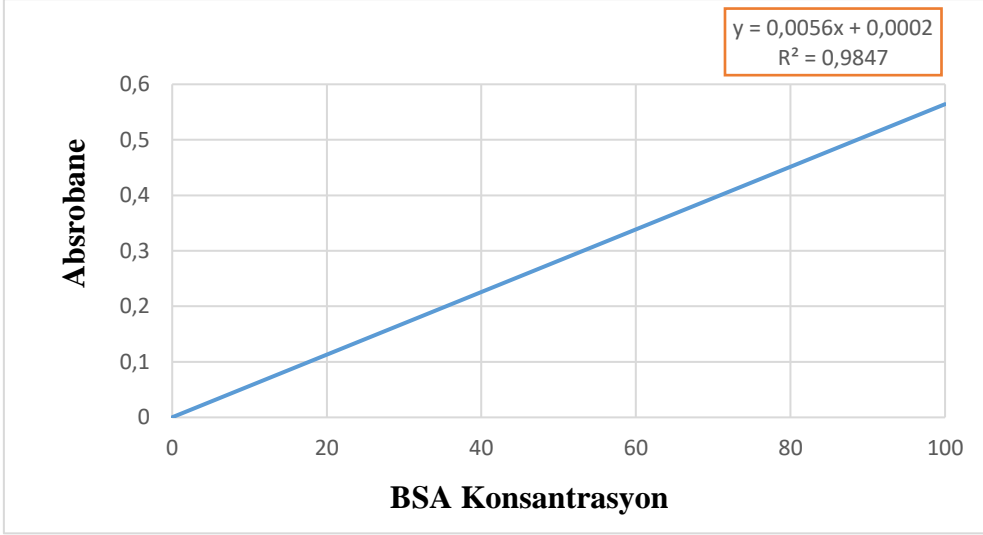
3.2.16. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.

Protein konsantrasyonu, Bradford'un (1976) yöntemine göre belirlendi, protein konsantrasyonu şu şekilde belirlendi:

20 ul ham p-laktamaz, 50 ul 1 M NaOH ile 2-3 dakika çalkalanarak karıştırıldı, ardından çalkalanarak 1 ml Bradford solüsyonu eklendi. Absorbans, spektrofotometre ile 595 nm'de ölçüldü.

3.2.17. Standart Eğri Sığır Serum Albümini (Bsa).

(3.2.5.2.c)'deki gibi farklı konsantrasyonlarda BSA (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100µg/ml) kullanılarak yapıldı ve ardından protein konsantrasyonları kullanılarak protein konsantrasyonları ölçüldü. Bradford'un yöntemi; absorbans, karşılık gelen BSA Şekil (10) konsantrasyonuna karşı çizildi.



Şekil 10 Sığır Serumu Albümin Konsantrasyonunun Standart Eğrisi, 595 nm'de Absorbans

3.2.18. İstatistiksel Analiz.

Fark faktörlerinin çalışma yüzdesindeki etkisini tespit etmek için İstatistiksel Analiz Sistemi- SAS (2018) programı kullanılmıştır. Bu çalışmada yüzde (0,05 ve 0,01 olasılık) arasında anlamlı karşılaştırma yapmak için ki-kare testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Bakteriyel İzolasyon ve Tanımlama:

4.1.1. Numunelerin Toplanması ve İzolasyonu:

Bu çalışma Nisan 2021 başından Temmuz 2021 sonuna kadar gerçekleştirildi. Hem cinsiyet hem de farklı yaş gruplarını içeren 150 hastadan idrar, balgam örnekleri, yanık ve yara sürüntüleri alındı, hastanın yaşı 10-68 arasındaydı. Etik hususlara ve hastane onayına göre Medical City'deki Yanık Hastanesi Ulusal Eğitim Laboratuvarları Merkezi'ne sevk edildi. Bu çalışmadaki tüm prosedürler ve gereklilikler, Irak Sağlık ve Çevre Bakanlığı araştırma ve geliştirme bölümü tarafından onaylanmıştır.

Pseudomonas aeruginosa, biyokimyasal testlerin yanı sıra geleneksel kültürel ve mikroskopik özelliklere göre belirlendi. Ayrıca tanımlama, Vitek2 Sistemi kullanılarak onaylanır. *P. aeruginosa* prevalansının izolasyon ve tanımlama sonucu, toplanan klinik örnekler arasında 30'unu (%20) gösterdi.

4.2. Pseudomonas Aeruginosa'nın Tanımlanması

4.2.1. Geleneksel Tanı.

P. aeruginosa izolatlarının kültür ortamında gelişen kolonilerin morfolojik özelliklerinden başlayarak tanımlanmasında izlenen yaygın konvansiyonel tanı protokolleri vardır. Bakteri kültürü besleyici agarın sonuçları, üzerinde mavi-yeşil pigment bulunan büyük, düzensiz kolonilerin büyümesini gösterirken, bakteri kültürü MacConkey agar plakalarındaki laktozu fermente etmemiştir. Ek olarak, bir kanlı agar plakaları üzerinde bakteri kültürünün büyümesi, metalik parlaklık ve gri koloniler, berrak β -hemoliz bölgeleri ile çevrelenebilir. Cetrimide agar ortamı (P. aeruginosa için seçici ortam), UV ışığı kullanarak floresan büyümesi veren sarı-yeşil koloniler gösterdi.

Konvansiyonel tanı sonuçları çoğunlukla kanlı agar üzerinde P. aeruginosa izolatlarının ve metalik parlaklık, mavi-yeşil kolonilerin beta hemoliz aktivitesini bildiren önceki çalışmaların sonuçlarıyla örtüşürken, MacConkey agar üzerinde laktozun fermente olmaması nedeniyle küçük soluk koloniler olarak görüldü. Setrimide agarda mukoid görünür, düz kenarlı ve kabarık merkezli şekilde pürüzsüz, kremi renkte ve meyvemsi bir kokuya sahiptir [100-102]. Diğer bir çalışma, 60 P. aeruginosa izolatının tanımlanmasının, P. aeruginosa için seçici besiyeri olarak setrimide agar besiyeri (24 saat süreyle 37°C) kullanılarak gerçekleştirildiğini ortaya koydu [119]

Mikroskopik inceleme, ışık mikroskopunda 100x büyütme (yağ immersiyonu) görüntülenen Gram boyama sonrası tüm bakteri izolatlarına uygulandı. Sonuçlar, tek, spor oluşturmayan, Gram negatif ve çubuk şekilli bakteriler sergiledi.

Ardından bakteri izolatlarını teşhis etmek için biyokimyasal testler yapıldı. Bu testler İndol, metil kırmızısı (MR), Voges-Proskauer (VP), hareketlilik, oksidaz ve Simmon's sitratı içerir. Sonuçlar, tüm P. aeruginosa izolatlarının hem oksidaz üretimi hem de Simmon's sitrat testi için pozitif olduğunu gösterdi. İzolatlar, Simmon'un sitrat testi için orta rengin yeşilden parlak maviye değişmesi yoluyla pozitif sonuç gösterdi. Sonuçlar tüm P. aeruginosa izolatlarının İndol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer testleri için negatif olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, P. aeruginosa'nın oksidaz için pozitif bir sonuç gösterdiğinden bahseden [120] tarafından yürütülen çalışma ile uyumludur. Oksidaz testleri ve VP, MR testi ve İndol testleri için negatif sonuçlar için. Motilite testi sonucu için,[104] incelenen tüm P. aeruginosa'nın hareketli olduğunu ortaya koydu.

4.2.2 Vitek2 Sistemini Kullanarak Tanımlama

Vitek 2 sistemi, tüm *P. aeruginosa* izolatlarının daha fazla tanımlanması için kullanıldı. Sonuçlar, *P. aeruginosa* olarak tespit edilen 30 izolatın cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında yüksek doğruluk göstermiştir.

Bu sonuçlar, vitek 2 sisteminin, her kuyuda bir kuru madde ve renkli bir indikatör içeren 64 kuyu içeren izolat türlerinin teşhisini doğrulamak için kullanılan spesifik teşhis kitleri olduğunu belirten farklı çalışmalarla uyumludur [105-107]. Tanı sonrasında tüm bakteri izolatlarının *Pseudomonas aeruginosa* tipinde olduğu belirlendi.

4.2.3. *Pseudomonas Aeruginosa*'nın Antibiyotik Duyarlılığı

Çalışılan izolatlar için antibiyotik duyarlılık testi Vitek2 kompakt sistem cihazı (yazılım sürüm 5.01 ve AST-GN222 kartları) kullanılarak yapıldı. Farklı antibiyotik türlerinin listesi (12), (Tetrasiklin, Ampisilin, piperasilin, seftazidim, Siprofloksasin, imipenem, meropenem, amikasin, tobramisin, kolistin Levofloksasin ve gentamisin) içerir. Sonuçlar, duyarlı izolatlar (S) ve dirençli (R) izolatlar olarak ikiye ayrılabilen antibiyotiklere karşı dirençte varyans paterni gösterdi. (Çizelge 12):

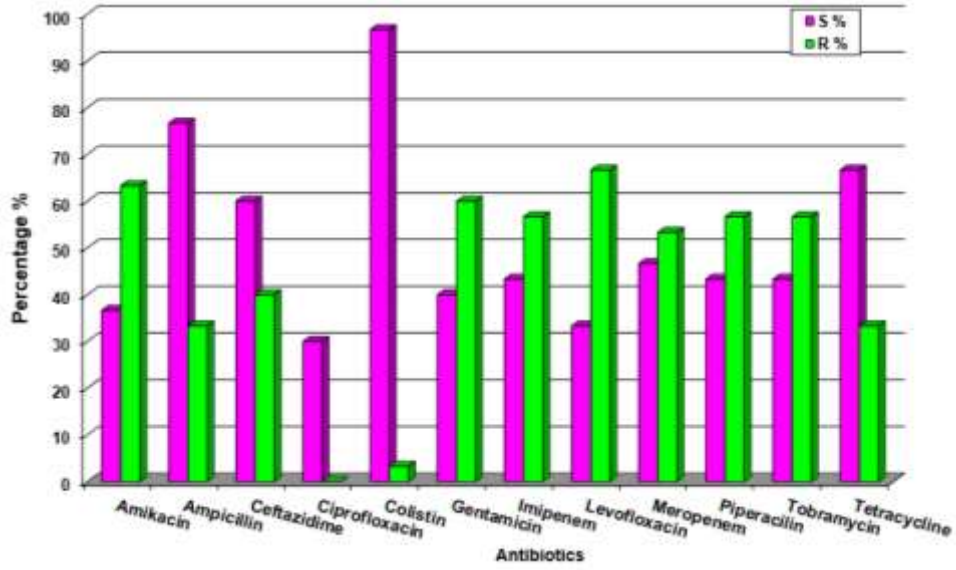
Çizelge 12 *Pseudomonas aeruginosa aeruginosa* izolatları için antibiyotik duyarlılık paternleri

Antibiyotikler	S		R		P-value
	No.	%	No.	%	
Amikasin	11	36.7	19	63.3	0.144 NS
Ampisilin	23	76.7	7	33.3	0.0035 **
Seftazidim	18	60	12	40	0.273 NS
Siprofloksasin	9	30	21	70	0.0285 *
Kolistin	29	96.7	1	3.3	0.0001 **
Antibiyotik	12	40	18	60	0.273 NS
Imipenem	13	43	17	56.7	0.465 NS
Levofloksasin	10	33.3	20	66.3	0.050 *
Meropenem	14	46.7	16	53.3	0.715 NS
Piperasilin	13	43.3	17	56.7	0.465 NS
Tobramisin	13	43.3	17	56.7	0.465 NS
Tetrasiklin	20	66.7	10	33.3	0.050 *

P-Değeri	---	0.0001 **	---	0.0001 **	---
----------	-----	-----------	-----	-----------	-----

* (P≤0.05), ** (P≤0.01), NS; Non-Significant.

Sonuçlara göre, Colistin için en düşük direnç yüzdesi 3 (%3.3) idi. Bu bulgu, 105 P. aeruginosa izolatu arasında en düşük antibiyotik direncinin koliktin ve karşı olduğunu gösteren [108] tarafından desteklenmiştir. Ampisilin, seftazidim ve tetrasiklin antibiyotiklerine direnç sırasıyla %33.3, %40 ve %33.3 idi. P. aeruginosa suşları arasında penisiline dirençli izolatların artışına ilişkin bu bulgular, β- Laktam halkasını tahrip eden ve penisilini inaktive eden β- Laktamaz enziminin üretilmesi ve bu enzimin suşlar arasında aktarımı kolay olan plazmit tarafından kodlanması ile açıklanabilir. Piperasilin, amikasin, tobramisin ve gentamisin (%56.67), (%63.33), (%56.67) ve (%60) için direnç. Onların sonuçları, siprofloksasine karşı en yüksek direncin (%70) olduğunu gösterdi. Genel olarak, farklı antibiyotiklere direnç, antibiyotiklerin türüne ve toplumdaki hastalar arasında ne kadar kullanıldığına bağlı olabilir. Mevcut çalışmanın sonuçları, Hindistan'da yürütülen ve antibiyotik direnci gelişimine yönelik artan bir eğilimi ortaya koyan [109]'un sonuçlarıyla kısmi olarak birleşiyor ve direnç oranları tetrasiklin için %100, amikasin, siprofloksasin, gentamisin için %85'e ve imipenem için %56'e tekabül ediyor. Genel olarak yaygın olarak kullanılan ucuz ve kolay bulunabilen ilaç, bakterilerde bu ilaca karşı direnç gelişmesinin temel nedeni olabilir. P. aeruginosa için elde edilen sonuçlar Şekil 11'de özetlenmiştir.

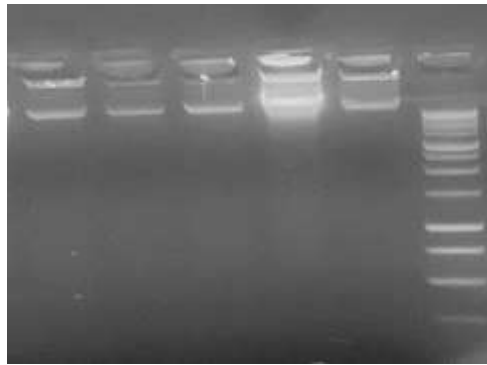


Şekil 11 Pseudomonas aeruginosa izolatları için antibiyotik duyarlılık kalıpları

4.2.4. Pseudomonas Aeruginosa'nın Moleküler Tanımlaması

4.2.4.1. DNA Ekstraksiyonu

SH2, SH5, SH10, SH19 ve SH30 dahil olmak üzere azu geninin varlığını ve varyasyonunu analiz etmek için ileri moleküler çalışma için beş izolat seçildi. DNA, sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti (Promega, ABD) kullanılarak Pseudomonas aeruginosa izolatlarından ekstrakte edildi, Ekstraksiyon sonuçları, bakterilerden ekstrakte edilen %1'lik DNA agarozunda yatay jel elektroforezi ile görsel olarak görüldü, genomik DNA (Şekil 12) jel elektroforezi sonuçları keskin bantlar gösterdi.



Şekil 12 Pseudomonas aeruginosa izolatlarının ekstrakte edilmiş DNA'sının jel elektroforezi. Şerit 1: DNA merdiveni, Şerit 2-5: Çıkarılan DNA. (1 saat boyunca 5 volt/cm'de %1 agaroz jeli

Mevcut çalışmanın sonuçları, alkalik lizis, kaynatma ve tuzlama yöntemleri gibi geleneksel DNA ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, bakteri DNA'sı için hızlı bir

ekstraksiyon yöntemi olarak Wizard genomik DNA saflaştırması gibi ticari kitlerin önemli kullanımını göstermiştir ve bu bulgu bulgu ile uyumludur. [110], DNA ekstraksiyon kitlerinin DNA ekstraksiyonu için etkili ve hızlı bir yöntem olarak ilgi çekici kullanımına atıfta bulundular. Bu, diğer PCR yöntemlerinin hantal ve sıkıcı bir adımı olan fenol-kloroform kullanımını ortadan kaldırarak işleme hızında önemli gelişmeler sağladı.

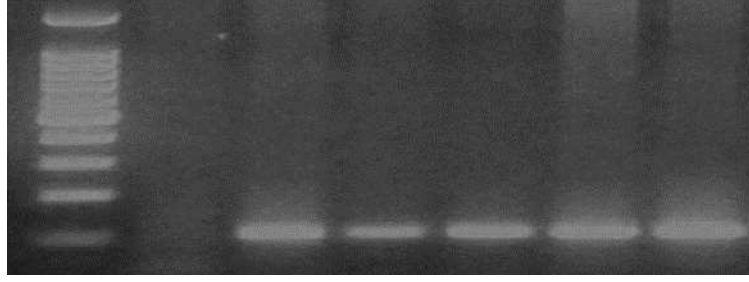
4.2.4.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Tahmini

P. aeruginosa'nın ekstrakte edilen DNA numunelerinin konsantrasyonu, numunelerin 1 µl hacimdeki nükleik asit içeriği ölçülerek Nanodrop spektrofotometre kullanılarak tahmin edildi. DNA, 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon ile ultraviyole ışığı emdi. Bu örneklerin saflığı, 280 nm'deki absorpsiyonla karşılaştırıldığında 260nm'deki absorpsiyonun fark edilmesiyle saptandı. *Pseudomonas aeruginosa* izolatları (66-79 ng/µl) arasında DNA konsantrasyonuna sahipti ve DNA saflığı (1.7-2) idi. 260:280 oranı, protein kontaminasyonunun iyi bir göstergesi olarak kabul edildi [111].

4.2.4.3. Temizlik Gyra Genini Hedefleyen PCR Tespiti

P. aeruginosa izolatları tanı yöntemleri ile tanımlandı ve PCR yöntemi kullanılarak *gyrA* geninin saptanması için sunuldu. Ekstrakte edilen DNA örneği, *gyrA* geni için spesifik primerler ile singleplex PCR reaksiyonunda şablon olarak kullanılmıştır. (F-GGTCTGGGCATAGAGGTTGT, R-GAAGATCGAGGGTATTTCCG).

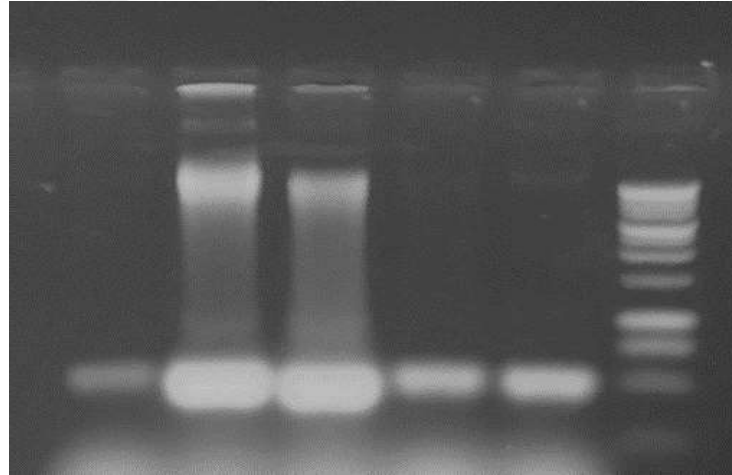
PCR amplifikasyonu, şablon DNA'nın 94 °C'de 3 dakika denatüre edilmesiyle başladı, ardından 35 döngü denatürasyon (30 saniye için 94 °C), tavlama (30 saniye için 55 °C) ve uzatma (30 saniye için 72 °C) ile devam etti. 5 dakika boyunca 72 °C'de son bir uzatma adımı. Başarılı PCR reaksiyonu, ~121 bp moleküler ağırlıkta *gyrA* gen ürününü gösterdi. Bu, jel elektroforezinde başarılı reaksiyonun zorunlu işareti olarak kabul edildi, bandının 100 bp DNA merdiveninin 100 bp ila 200 bp bantları arasında yer alması bu genin varlığını gösterir (Şekil 13). *P. aeruginosa* izolatlarının 5'inin (%100) tamamında *gyrA* geni tespit edildi.



Şekil 13 gyrA geni için PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit M: 100bp DNA merdiveni; şeritler (SH3, SH5, SH10, SH19 ve SH30) (%2 Agarose, 5V/cm ve 2 saat için. Beklenen boyut 120 bp)

4.2.4.4. Azu Geninin Moleküler Tespiti.

Azurin geni (azu), genomik DNA'nın PCR amplifikasyonu ile amplifiye edildi. Spesifik primerler kullanıldı (F-AAG CTT GCC CAAGCT TAC CTA GGA GGC TGC TCC ATG CTA) ve tersine (R-GGA TCC TGA GCC CCT GTA GGC GCC CAT GAA AAA GCC CGGC) primerler. PCR amplifikasyonu, şablon DNA'nın 94 °C'de 3 dakika denatüre edilmesiyle başladı, ardından 35 döngü denatürasyon (30 saniye için 94 °C), tavlama (sn için 58 °C) ve uzatma (30 saniye için 72 °C) ile devam etti. 5 dakika boyunca 72 °C'de son uzatma adımı. PCR ürünü, %1.5 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. (Şekil 14)



Şekil 14 azu geni için PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Şerit M: 100bp DNA merdiveni; şeritler (SH3, SH5, SH10, SH19 ve SH30) (%2 Agarose, 5V/cm ve 2 saat için. Beklenen boyut 500 bp)

4.3. PCR Ürünlerinin Sıralanması (azu geni):

Farklı çoklu ilaç direncini (MDR) temsil eden beş izolattan azu gen sekansının analizine göre: SH3, SH5, SH10, SH19 ve SH30, hizalama analizine göre, SH3 izolatında nükleotid polimorfizmi, benzerlik düzeyi (%98.88) ile tespit edildi. p kontrol dizisi ile karşılaştırma aeruogenosa (PAO1), NCBI'deki BLAST programını kullanarak Gen Bankası veritabanında yapıldı. Bu polimorfizmler, ikame amino asitlerin değişmesine yol açardı. İzolatlar (SH5), Gen Bankası'nda (Erişim No. CP053028.1) depolanan suş dizisi suşu ile benzerlik düzeyi (%99.11) gösterirken. Nükleotidlerdeki (mutasyonlar) ve amino asit değişimlerdeki farklılıklar bulundu (Çizelge 13). Ayrıca, dizilerin çoğunun yüksek düzeyde benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Geri kalan üç yerel izolat () için sekans sonucu, p referans sekansı ile %100 özdeş benzerlikler gösterdi. aeruogenosa (PAO1), NCBI'deki BLAST programını kullanan Gen Bankası veri tabanına göre yapıldı.

Çizelge 13 Lokal P. Aeruginosa'da azu gen dizisindeki mutasyonlar

Örnek	Vahşi Tip CP053028.1	mutasyon Yerel izolatlar	Mutasyon türü	Mutasyonun Etkisi	Identities %
SH3	CAG	CCG	Ikame	Glutamin İçin Proline	98.88
	AAC	CAC	Ikame	Asparajin İçin Histidin	
	AAT	AAC	Ikame	Etkisi Yok	
	AAG	AAA	Ikame	Etkisi Yok	
	CAG	CCG	Ikame	Serin İçin Arginin	
SH5	CGC	CCC	Ikame	Alanin İçin Proline	99.11
	GTG	GCG	Ikame	Alanin İçin Proline	
	CGC	CCC	Ikame	Aspartik Asit İçin Histidin	
	CGA	CCA	Ikame	Etkisi Yok	

Hem amino asit hem de nükleotid dizisindeki hizalama sonuçlarının analizi aşağıdaki gibi gösterilmiştir.

>NC_19002516.2:c5522610-5521164 Pseudomonas aeruginosa PAO1, tam genom
AZU=AZURIN

**ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCCACTG
CTGGCTGCCGAGTGCTCGGTGGA
CATCCAGGGTAACGACCAGATGCAGTTCAACACCAATGCCATCACCGTCGACA
AGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGTCCCACCCCGGCAACCTGCCGAAG
AACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGGGCG
TGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAAGCCCGAC
GACAGCCGTGTCATCGCCACACCAAGCTGATCGGCTCGGGCGAGAAGGACTC
GGTGACCTTCGACGTCTCCAAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCT
GCACCTTCCCGGGCCACTCCGCGCTGATGAAGGGCACCCCTGACCCTGAAGTGA**

SH3-Azurin dizi sonucu

**ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCCACTG
CTGGCTGCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGGGTAACGACCAGATGCCGTTCCA
CACCAACGCCATCACCGTCGACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGT
CCCACCCCGGCAACCTGCCGAAGAACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGC
ACCGCCGCCGACATGCAGGGCGTGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGA
CAAGGATTACCTGAAACCCGACGACCGCCGTGTCATCGCCACACCAAGCTGA
TCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCTTCGACGTCTCCAAGCTGAAGGAA
GGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGGCCACTCCGCGCTGATGAA
GGGCACCCTGACCCTGAAGTGA**

Sarı etiketli amino asit, hem vahşi hem de yerel suşlarda amino asit dizileri arasındaki uyumsuzluğu gösterdi.

SH3 yerel suşlarına karşı vahşi suş

çekirdek Beklenti Yöntem Kimlikler Pozitif Boşluklar

300 bit (767) 1e-111 Kompozisyon matris ayarı. 145/148(98%) 146/148(98%) 0/148(0%)

Query 1
MLRKLA AVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQM **QFN** TNAITVDK SCKQFTVNLSH
PGNLP 60

MLRKLA AVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQM
F+TNAITVDK SCKQFTVNLSHPGNLP

Sbjct 1
MLRKLA AVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQM **PFH** TNAITVDK SCKQFTVNLSHP
GNLP 60

Query 61
KNVMGHNWVLSTAADMQGVVTDGMASGLDKDYLPDD **S**RVIAHTKLIGSGEKD
SVTFDVS 120

KNVMGHNWVLSTAADMQGVVTDGMASGLDKDYLPDD
RVIAHTKLIGSGEKDSVTFDVS

Sbjct 61
KNVMGHNWVLSTAADMQGVVTDGMASGLDKDYLPDD **RR**RVIAHTKLIGSGEKD
SVTFDVS 120

Query 121 KLKEGEQYMFFCTFPGHSALMKGTLTLK 148

KLKEGEQYMFFCTFPGHSALMKGTLTLK

Sbjct 121 KLKEGEQYMFFCTFPGHSALMKGTLTLK 148

Sequence ID: Query_41481 Length: 447 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 447 Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score Expect Identities Gaps Strand
798 bits(432) 0.0 442/447(99%) 0/447(0%) Plus/Plus

Query 1
ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCCACTG
CTGGCT 60

|||||

Sbjct 1
ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCCACTG
CTGGCT 60

Query 61
GCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGGGTAACGACCAGATGCAAGTTCACACCAA
TGCCATC 120

|||||

Sbjct 61
GCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGGGTAACGACCAGATGCCAGTTCACACCAA
CGCCATC 120

Query 121
ACCGTCGACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGTCCCACCCCGGCAA
CCTGCCG 180

|||||

Sbjct 121
ACCGTCGACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGTCCCACCCCGGCAA
CCTGCCG 180

Query 181
AAGAACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGCACCGCCCGCCGACATGCAGG
GCGTGGTC 240

|||||

Sbjct 181
AAGAACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGCACCGCCCGCCGACATGCAGG
GCGTGGTC 240

Query 241
ACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAAGCCCGACGACAG
CCGTGTC 300

|||||

Sbjct 241
ACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAAGCCCGACGACCG
CCGTGTC 300

Query 301

ATGCCACACCAAGCTGATCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCTTCGA
CGTCTCC 360

|||||

Sbjct 301

ATGCCACACCAAGCTGATCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCTTCGA
CGTCTCC 360

Query 361

AAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGGCCACTC
CGCGCTG 420

|||||

Sbjct 361

AAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGGCCACTC
CGCGCTG 420

Query 421 ATGAAGGGCACCCCTGACCCTGAAGTGA 447

|||||

Sbjct 421 ATGAAGGGCACCCCTGACCCTGAAGTGA 447

H5 local strain-

ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCCACTG
CTGGCTGCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGGGTAACGACCAGATGCAGTTCAA
CACCAATGCCATCACCGTCGACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGT
CCCACCCCGGCAACCTGCCGAAGAACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGC
ACCGCCCCGACATGCAGGGCGTGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGA
CAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGCCGCGTCATCCCCACACCAAGCTGA
TCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCTTCCACGTCTCCAAGCTGAAGGAA
GGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGGCCACTCCGCGCTGATGAA
GGGCACCCTGACCCTGAAGTGA

Wild strain against SH5 local strain

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
299 bits(766)	2e-111	Compositional matrix adjust.	145/148(98%)	145/148(97%)	0/148(0%)

Query 1
MLRKLA AVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQM QFNTNAITVDK SCKQFTVNLSH
PGNLP 60

MLRKLA AVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQM QFNTNAITVDK SCKQFTVNLSH
PGNLP

Sbjct 1
MLRKLA AVSLLSLLSAPLLAAECSVDIQGNDQM QFNTNAITVDK SCKQFTVNLSH
PGNLP 60

Query 61
KNVMGHNWVLSTA **A**DMQGVVTDGMASGLDKDYLPDDSRVIA **A**HTKLIGSGEKD
SVTF **D**VS 120

KNVMGHNWVLSTA DMQGVVTDGMASGLDKDYLPDDSRVI
HTKLIGSGEKDSVTF VS

Sbjct 61
KNVMGHNWVLSTA **P**DMQGVVTDGMASGLDKDYLPDDSRVI **P**HTKLIGSGEKD
SVTF **H**VS 120

Query 121 KLKEGEQYMFFCTFPGHSALMKGTLTLK 148
KLKEGEQYMFFCTFPGHSALMKGTLTLK
Sbjct 121 KLKEGEQYMFFCTFPGHSALMKGTLTLK 148

Sequence ID: Query_43457 Length: 447 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 447 Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score Expect Identities Gaps Strand
804 bits(435) 0.0 443/447(99%) 0/447(0%) Plus/Plus

Query 1
ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCCACTG
CTGGCT 60

|||||

Sbjct 1

ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCCACTG
CTGGCT 60

Query 61
GCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGGGTAACGACCAGATGCAGTTCAACACCAA
TGCCATC 120

|||||

Sbjct 61
GCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGGGTAACGACCAGATGCAGTTCAACACCAA
TGCCATC 120

Query 121
ACCGTCGACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGTCCCACCCCGGCAA
CCTGCCG 180

|||||

Sbjct 121
ACCGTCGACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGTCCCACCCCGGCAA
CCTGCCG 180

Query 181
AAGAACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGG
GCGTGGTC 240

|||||

Sbjct 181
AAGAACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGG
GCGTGGTC 240

Query 241
ACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAG
CCGTGTC 300

|||||

Sbjct 241
ACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAG
CCGCGTC 300

Query 301
ATCGCCACACCAAGCTGATCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCTTCGA
CGTCTCC 360

|||||

Sbjct 301
ATCGCCACACCAAGCTGATCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCTTCGA
CGTCTCC 360

Query 361
AAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGGCCACTC
CGCGCTG 420

|||||

Sbjct 361
AAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGGCCACTC
CGCGCTG 420

Query 421 ATGAAGGGCACCCCTGACCCTGAAGTGA 447

|||||

Sbjct 421 ATGAAGGGCACCCCTGACCCTGAAGTGA 447

4.3.1. Pet-28a (+) /Azu Yapılarının Sırası

pET-28a (+) /Azu referansı ve pET-28a (+) /Azu local'in tam dizisi aşağıda fasta formatında gösterilmiştir. Ayrıca, iki vektör yapısı, Şekil 15 ve 16'da gösterildiği gibi SnapGene programı ile görselleştirildi (>pET-28a (+) /Azu kaynak

←atgggtgtctggtcagagacatcaagaataacgccggaacattagtcaggcagctccacagcaatggcatcctggtcatc
cagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgtgacgcgagaagattgtgcaccgccgctttacagcttcgacgccgcttcggt
ctaccatcgacaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttcgacggcgctgcaggg
ccagactggaggtggcaacccaatcagcaacgactggttgcggccagttggtgtccacgcgggtgggaatgtaattcagctcc
gccatcgccgctccacttttcccgcttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacgggtctgataagagaca
ccggcactctcgacatcgataacgttactggttcacattcaccaccctgaattgactcttccggcgctatcatgccataacc

gcgaaaggttttgcgccattcgcggtggtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagta
 ggttgaggccgtgagcaccgccgccgaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcc
 tgccaccatacccacgccgaaacaagcgcctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggatggtcggcgatata
 ggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcga
 aattaatacactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataatgtttaaacttaagaaggagataacc
ATGCTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCTGTCCCTGCTCAGTGCGCC
 ACTGCTGGCTGCCGAGTGCTCGGTGGACATCCAGGGTAACGACCAGATGC
 AGTTCAACACCAATGCCATCACCGTCGACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACC
 GTCAACCTGTCCCACCCCGGCAACCTGCCGAAGAACGTCATGGGCCACAA
 CTGGGTACTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGGGCGTGGTCACCGACGGC
 ATGGCTTCCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGCCGTGT
 CATCGCCACACCAAGCTGATCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCT
 TCGACGTCTCCAAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACC
 TTCCCGGGCCACTCCGCGCTGATGAAGGGCACCCCTGACCCTGAAGctcgagca
 ccaccaccaccaccactgatccggctgctaacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataact
 agcataacccttggggccttaaacgggtcttgaggggttttctgaaaggaggaactatatccggat

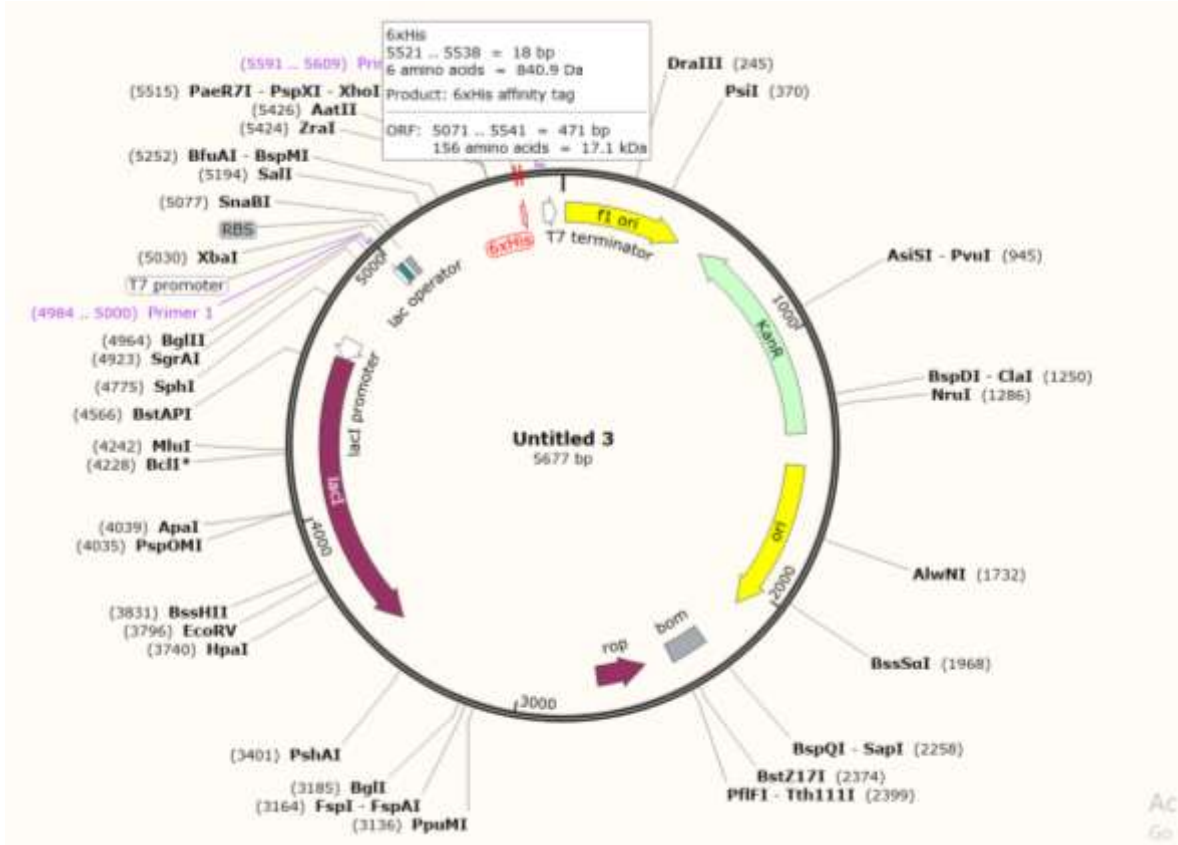
Fasta formatında pET-28a (+) /Azu referansının tam dizisi. Küçük harflerle dizi: pET-28a (+) vektörü. Büyük harfli kalın harflerle dizilim: Azu referans geni. Yeşille vurgulanan dizi: Azu geninin başlangıç kodonu. Sarı ile vurgulanan dizi: 6-His etiketleri. Menekşe ile vurgulanan dizi: durdurma kodonu. Soluk mavi ve koyu mavi ile vurgulanan diziler: sırasıyla MluI ve XhoI için tanıma bölgeleri

> pET-28a (+) /Azu local

← agaaataacgccggaacattagtcaggcagcttcacagcaatggcatcctggatccagcggatagttaatgatca
 gccactgacgcttgcgcgagaagattgtcaccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcttaccatcgacacca
 ccacgctggcaccagttgatcggcgagatttaacgccgcgacaatttgcgacggcgctgcagggccagactgga
 ggtggcaacccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgccacgcggtgggaatgtaattcagctccgccatc
 gccgcttccacttttcccgcgttttcgagaaactggctggcctggttcaccacgcgggaaacggcttgataagagacac
 cggcactctcgcacatcgtataacgttactggttcacattcaccacctgaattgactcttccggcgctatcatgccat
 acccgaaaggttttgcgccattcgcggtgctccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcc
 cagtagtaggttgaggccgtgagcaccgccgccgaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtc
 gccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgcctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatc
 ggtgatgctggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatccggccacgatgcgtccggcgtagag
 gatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataat

tttgtttaactttaagaaggagatatacc**ATG**CTACGTAAACTCGCTGCGGTATCCCTGCT
GTCCCTGCTCAGTGCGCCACTGCTGGCTGCCGAGTGCTCGGTGGACA
TCCAGGGTAACGACCAGATGCCGTTCCACACCAACGCCATCACCGTC
GACAAGAGCTGCAAGCAGTTCACCGTCAACCTGTCCCACCCCGGCAA
CCTGCCGAAGAACGTCATGGGCCACAACCTGGGTACTGAGCACCGCCG
CCGACATGCAGGGCGTGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCCTGGAC
AAGGATTACCTGAAACCCGACGACCGCCGTGTCATCGCCCACACCAA
GCTGATCGGCTCGGGCGAGAAGGACTCGGTGACCTTCGACGTCTCCA
AGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGGC
CACTCCGCGCTGATGAAGGGCACCCCTGACCCTGAAG**ctcgag****caccaccaccac**
caccactgagatccggctgctaacaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcata
acccttggggcctctaaacgggtcttgaggggtttttgctgaaaggaggaactatatccggat

Fasta formatında pET-28a (+) /Azu local'in tam dizisi. Küçük harflerle dizi: pET-28a (+) vektörü. Büyük harfli kalın harflerle dizilim: Azu referans geni. Yeşille vurgulanan dizi: Azu geninin başlangıç kodonu. Sarı ile vurgulanan dizi: 6-His etiketleri. Menekşe ile vurgulanan dizi: durdurma kodonu. Soluk mavi ve koyu mavi ile vurgulanan diziler: sırasıyla MluI ve XhoI için tanıma bölgeleri.



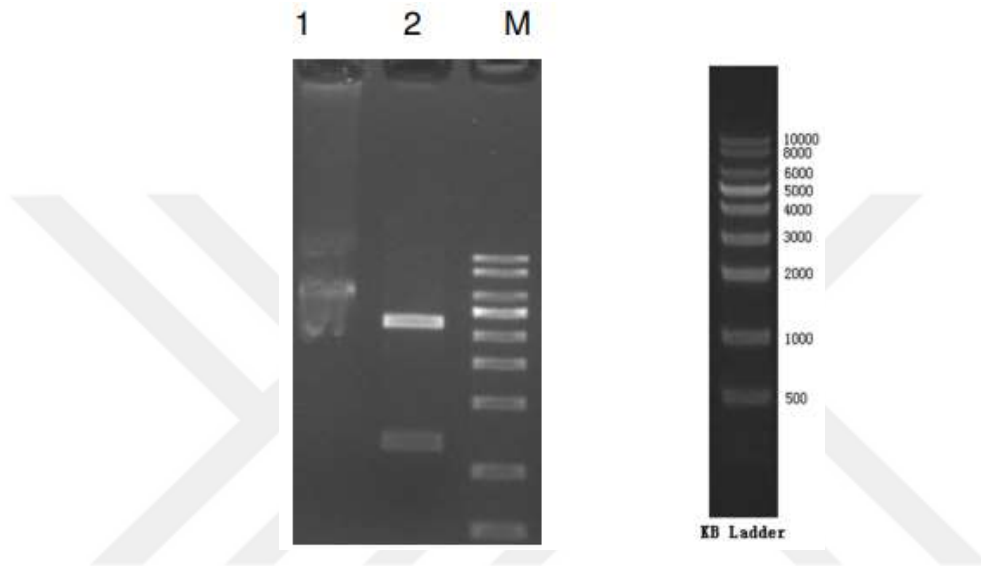
Şekil 15 rekombinant yapı pET-28a'nın haritası (+)

Azu local synthesized by GenScript Co., The full length of the recombinant plasmid after insertion of the Azu gene is 5677 bp.

4.3.2. pET-28a (+) /Azü Yapılarının MluI Ve XhoI İle Çift Kısıtlamalı Sindirim Modeli

Modeli

pET-28a (+) /Azü yerel ve pET-28a (+) /Azü referansının çift kısıtlama sindirim modeli (Şekil 17)'de görüntüledi. Her iki yapı pET-28a (+) /Azü lokal ve pET-28a (+) /Azü referansı için kısıtlama sindirim modeli oldukça benzerdi (yani tek tip bir model). Elde edilen model iki banttı: biri plazmit vektörü için (~4200 bp) ve Azü genini taşıyan 1279 bp bandı.



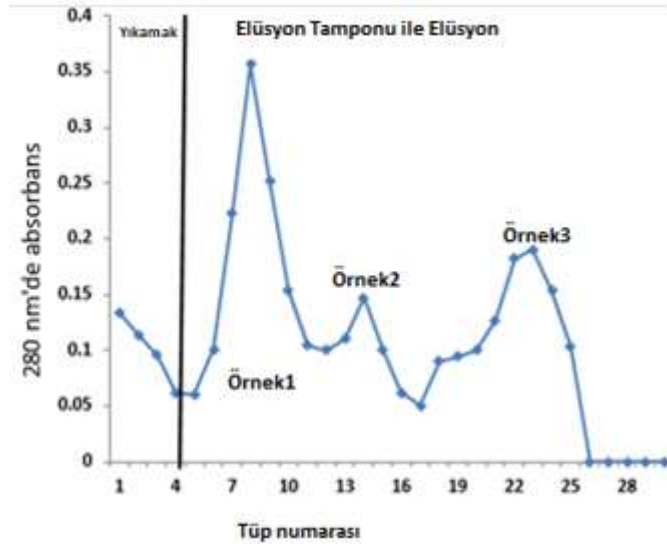
Şekil 17 Agaroz jel elektroforezi (%1), MluI ve XhoI ile lokal olarak pET-28a (+)/Azü'nün kısıtlama sindirimi modelini gösterir

Üst bant: plazmit vektörünün 4200 bp'si. Alt bant: 1279 bp: Azü geni ekleme dahil. M: 1 kbp DNA merdiveni.

4.3.3. Azürin Proteininin Saflaştırılması

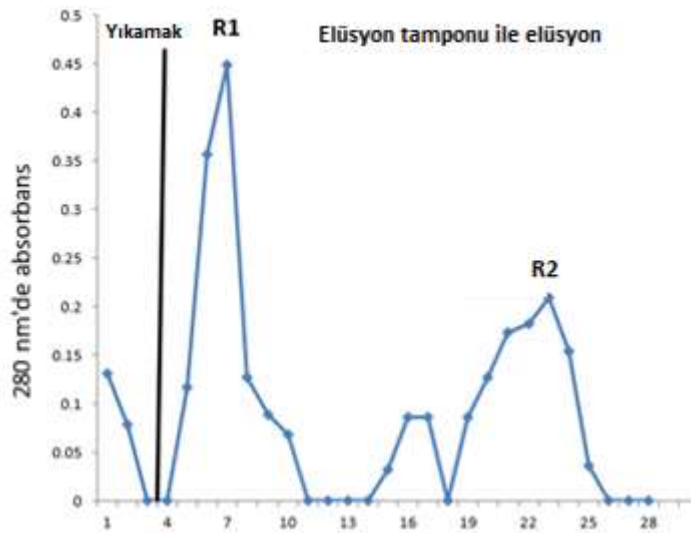
E. coli BL-21'den (DE3) azürin geninin ekspresyonu için rekombinant koloni, LB broth içinde büyütüldü ve IPTG ile indüklendi. Proteinin saflaştırılması için, elüsyon tamponu (pH 8'de 50 mM Tris, 300 mM NaCl, %5 Gliserol, 400 mM İmidazol) ve yıkama tamponu (pH 8'de 50 mM Tris, 300 mM NaCl, %5 Gliserol ve 20 mM İmidazol) hazırlandı.

Sonuçlar, Numune Tüpü 3'ün (referans suşu) DEAE-selüloz kolonu (2 X 8) cm boyunca olduğunu gösterdi. Kolon, Tampon pH, 60 ml/saat akış hızı ve 5 ml fraksiyon ile kalibre edildi, elüsyon tamponu NaCl ile elüte edildi. (Şekil 18)



Şekil 18 Yabani suştan saflaştırılmış (Azurin proteini) için UV-Vis Spektrofotometre grafiği DEAE selüloz kolonu (2 X 8) cm aracılığıyla İyon değişim kromatografisi üzerine (Sütun 50 mM Tris-baz pH 8, akış hızı 60 ml/saat ve 5 ml fraksiyon ile kalibre edilmiştir).

DEAE-selüloz kolonu (2 X 8) cm boyunca lokal suştan numune tüpü 2'nin sonuçları. Kolon, Tampon pH, 60 ml/saat akış hızı ve 5 ml fraksiyon ile kalibre edildi, elüsyon tamponu NaCl ile elüte edildi. (Şekil 19)



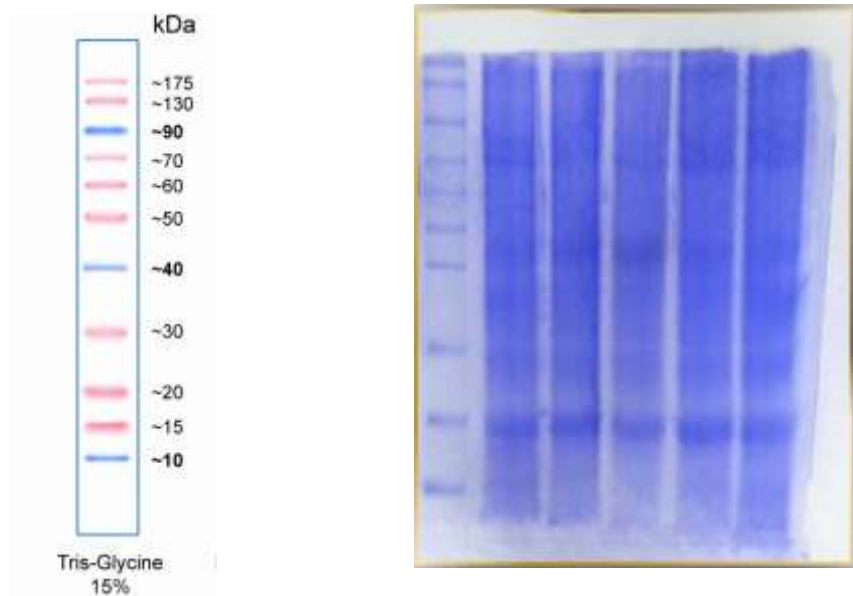
Şekil 19 Lokal suşlardan saflaştırılmış (azurin proteini) için UV-Vis Spektrofotometre tep noktaları DEAE selüloz kolonu (2 X 8) cm aracılığıyla İyon değişim kromatografisi üzerine (Sütun 50 mM Tris-baz pH 8, akış hızı 60 ml/saat ve 5 ml fraksiyon ile kalibre edilmiştir).

Bu, protein saflaştırma için en kullanışlı yöntemlerden biridir. Yüzey moleküllü yüküne, protein ve tampon koşullarına bağlı olarak, protein net pozitif veya negatif yüke sahip olacaktır.[112]

Sırasıyla pozitif ve negatif yüklü proteinleri uzaklaştıran DEAE selüloz kolonu. Toplanan fraksiyonlar, 280 nm dalga boyunda UV-Spektrofotometrede protein konsantrasyonu için ölçüldü. Azurin ve 5 kDa'dan fazla olan diğer proteinler, boşluk hacmi grafik olarak çizildikten hemen sonra ayrıştırıldı. Böylece azurin, grafik olarak çizildiğinde spektrometrenin OD değerlerinden doğrulandı. Fraksiyonlar toplandı ve azurin konsantrasyonu için 280 nm dalga boylarında UV spektrometresi altında emildi. Azurine karşılık gelen ve lokal izolatlardan elde edilen en yüksek protein konsantrasyonu 0.45 OD gösterirken, vahşi tipten elde edilen protein 0.35 OD gösterdi. Bu sonuçlar, azurini Nikel-nitriлотriasetik asit kullanarak lokal psödomonas izolatından saflaştıran çalışmalarda benzer bulgularla uyumludur [113].

Saflaştırılmış protein numunesi, Lowry yöntemiyle protein konsantrasyonunu belirlemek için test edildi. Saflaştırılmış protein, PBS içinde çözündürüldü ve protein konsantrasyonu, 1 mg/ml idi.

Pelet, daha fazla analiz için toplandı ve orada asılı kalan pelet içinde 14 kDa boyutunda azurin proteininin varlığı SDS-PAGE ile doğrulandı. Saflaştırılmış azurin üzerindeki SDS-PAGE analizi, Coomassie parlak mavisi ile boyamadan sonra yaklaşık 14 kDa'lık bir karşılık gelen moleküler ağırlığa sahip bir bandın tespit edildiğini gösterdi (Şekil 20).



Şekil 20 SDS-PAGE analizi, aşırı ekspresyonun ardından BL21/DE3-(pET28a-azu)'dan azu aşırı ekspresyonu. Şerit 3-8 - indüksiyondan 1, 2, 3, 4, 6 ve 16 saat sonra. Elektroforez, 80 dakika boyunca 60 mA'da %15 poliakrilamid jel içinde gerçekleştirildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada önde gelen ölüm nedenidir. 2025 yılına kadar, küresel nüfusun 420 milyon yeni kanser vakasına sahip olması bekleniyor, bu da zaman içinde kanser insidansında bir artışa işaret ediyor. Sebep faktörlerinin çeşitliliği, çeşitli form ve türlerin yayılmasında doğrudan rol oynamıştır. Bu durumun sıklığı, teşhis, tarama tesisleri ve tedavi seçenekleri dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle bağlantılıdır. Sadece Amerika Birleşik Devletleri her yıl kansere (156 milyar dolardan) fazla harcıyor. Ameliyat, kemoterapi ve kök hücre nakli günümüzde en yaygın tedaviler. Bununla birlikte, bu protokollerin çoğunun, yüksek maliyetler veya kusma, saç dökülmesi, bitkinlik ve iştahsızlık gibi yan etkilerin varlığı gibi, tümü hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen sınırlamaları ve sakıncaları vardır. Kanser hastaları zamanlarının çoğunu hastanede ya da ölmekte geçirirler. Sonuç olarak, kanser tedavisinde mevcut teknolojiyi kullanan çoğu araştırmacı ve ilgili kuruluş, diğer tedavi yöntemlerine odaklanmaktadır. Farmakolojik tedavideki ilerlemeler, kanser hastalarının daha uzun yaşama oranında hızlı bir artışa neden olmuştur. Hücrenin ürettiği gerekli sinyaller alınmadığında tüm kanser türleri hücrelerde aktive olur ve hücrenin kontrolsüz bir şekilde bölünmesine neden olur. P53 geninin insan karsinogenezinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Birincil işlevleri arasında gen transkripsiyonu, apoptoz ve DNA onarımı bulunur. Sonuç olarak, herhangi bir p53 mutasyonu, birincil tümörlerin ortaya çıkmasına neden olur. Uzun süreli çabalara rağmen, yeni ve en etkili kanser tedavilerinin bulunması, birçok hastayı ve klinisyeni diğer terapötik seçenekler lehine geleneksel kanser ilaçlarından vazgeçmeye yöneltmiştir. Birçok ülke, kullanılan ilaçların doğrudan etkilerini araştırmak için alternatif tıp araştırma tesisleri kurmuştur. Azurin'in çeşitli kanser hücrelerinde ve fare tümör modellerinde antikanser etkisi olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, azurin doğrudan bir antikanser ilacı olarak kullanılabilir. Azurin gibi terapötik peptitler, proteinler, antikorlar ve küçük kimyasal bileşikler dahil olmak üzere geleneksel farmasötiklere göre sayısız fayda sağlayan umut verici bir ilaç sınıfıdır. Terapötik peptitler, küçük kimyasal peptitlerden daha güçlü bir hedef afinitesine ve daha düşük bir toksisite profiline sahiptir ve daha küçük boyutları nedeniyle daha derine nüfuz edebilirler. Peptitler, küçük boyutları nedeniyle kararlılıklarını ve etkinliklerini artırmak için de değiştirilebilir. Azurinlerin antimikrobiyolog olarak hareket etme yeteneğine sahip olduğuna inanmak için sayısız neden vardır. Kanser hücrelerinin özel yolağının aksine, kanserde çok önemli olan diğer alakasız memeli proteinleriyle etkileşime girmek ve kanserde hayati önem taşıyan normal çerçeve proteinin sahipliğini vermek için

yüksek afinite zekasına ek olarak hiçbir zararlı yan etki yoktu. .Azurin, bakır içeren protein (cupredoxin) ailesine aittir ve *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilir. Mavi minik bakır proteini olarak da bilinir ve doğada oldukça kararlı bir proteindir. Kanser büyümesini sınırlayan p53 proteininin stabilitesi, Azurin'in tümör hücrelerini yok etme kapasitesinden sorumludur. Azurin, p53 ile bir bileşik oluşturan ilk bakteri proteiniydi. Azurin, p53 sinyal yolunu ve reseptör olmayan tirozin kinaz sinyalleşme ağını bozarak apoptoza veya büyüme inhibisyonuna neden oluyor gibi görünüyor. Azurin'in farklı bakteri suşları tarafından üretilen ikincil yapısı farklıdır, bu da işlevi üzerinde etkisi olabilir. Azu genini bir Irak yerli türünden (Shiraq2) bir ekspresyon vektörüne (pET28a) klonlayabildik ve onu *E. coli*'de ifade edebildik. *coli* (BL-21/ DE3) bu çalışmada. Yan alanları ortadan kaldırdıktan sonra, azu dizisini sağlamak için ampikon azu geni dizilendi. Azu gen dizisinin, *Pseudomonas aeruginosa* suşu PA01'inkine yüzde 99 özdeş olduğu bulundu. Rekombinant azurinin saflaştırılması (İyonik değişim kromatografisi). Proteinin aşırı eksprese edildiğini göstermek ve moleküler ağırlığını ölçmek için SDS-PAGE analizi kullanıldı. 14 kDa'ya tekabül eden kalın bir bandın görünümü, azurin proteininin etkili aşırı ekspresyonunu doğruladı. Saflaştırılmış azurin, sırasıyla 1637.35 cm^{-1} ve 1641.5 cm^{-1} . Sonuç olarak, yerel *Pseudomonas aeruginosa*'dan türetilen azurin geni başarıyla klonlandı ve *E. coli*'de aşırı eksprese edildi. Bu çalışmanın bulgularına göre, hem referans hem de yerel *Pseudomonas aeruginosa* izolatları arasında azu geninin varyant dizilerinin prevalansının olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, daha sonraki çalışmalarda antikanser araştırmalarında kullanılacak rekombinant teknik kullanılarak önemli antikanser proteini üretiminin etkinliği .

6. KAYNAKLAR

1. Chaudhari A, Mahfouz M, Fialho AM, Yamada T, Granja AT, Zhu Y, Hashimoto W, SchlarbRidley B, Cho W, Das Gupta TK, C. A. (2007). Cupredoxin-cancer interrelationship: azurin
2. Skariyachan, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T., & Challapilli, S. B. (2018). Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia microbiologica*, 63(4), 413-432.
3. Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., & Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 403-434.
4. Arora, S. K., Neely, A. N., Blair, B., Lory, S., & Ramphal, R. (2005). Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infection and immunity*, 73(7), 4395-4398.
5. Ettinger, M., & Lontie, R. (1984). *Copper Proteins and Copper Enzymes*. CRC Pres Inc., Boca Raton, Florida, 175-229.
6. Adman, E., & In, T. (1985). *Topics in molecular and structural biology: metalloproteins Structure and Function of Small Blue Copper Proteins*, vol. 6, part I (pp. 1-42): Chemie Verlag Weinheim.
7. Goto, M., Yamada, T., Kimbara, K., Horner, J., Newcomb, M., Gupta, T. D., & Chakrabarty, A. (2003). Induction of apoptosis in macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* azurin: tumour-suppressor protein p53 and reactive oxygen species, but not redox activity, as critical elements in cytotoxicity. *Molecular microbiology*, 47(2), 549-559.
8. Gao, M., Zhou, J., Su, Z., & Huang, Y. (2017). Bacterial cupredoxin azurin hijacks cellular signaling networks: protein–protein interactions and cancer therapy. *Protein Science*, 26(12), 2334-2341.
9. Bernardes, N., Seruca, R., Chakrabarty, A. M., & Fialho, A. M. (2010). Microbial-based therapy of cancer: current progress and future prospects. *Bioengineered bugs*, 1(3), 178-190.
10. Fialho, A. M., Das Gupta, T., Chakrabarty, A. M., Sleator, R., & Hill, C. (2008). Promiscuous drugs from pathogenic bacteria in the post-antibiotics era. *Patho-Biotechnology*. Landes Bioscience, 145-162.

11. Wild, C. P., Stewart, B. W., & Wild, C. (2014). World cancer report 2014: World Health Organization Geneva, Switzerland.
12. Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., & Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes & cancer*, 2(4), 466-474.
- 13 Arora, S. K., Neely, A. N., Blair, B., Lory, S., & Ramphal, R. (2005). Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infection and immunity*, 73(7), 4395-4398.
14. Freda G, Bella C, Wagner N. Knowledge Levels and Attitudes of Staff Nurses in Israel Towards Complementary and Alternative Medicine. *Journal of Advanced Nursing (Electronic Journal)*, 2001; 36(1):41
15. Ghasemi-Dehkordi, P., Doosti, A., & Jami, M.-S. (2019). The concurrent effects of azurin and Mammaglobin-A genes in inhibition of breast cancer progression and immune system stimulation in cancerous BALB/c mice. *3 Biotech*, 9(7), 1-15.
16. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*, 15(1-2), 40-56.
17. Duncan Patrick, M. (2008). Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 616-619.
18. Fialho, A. M., Das Gupta, T., Chakrabarty, A. M., Sleator, R., & Hill, C. (2008). Promiscuous drugs from pathogenic bacteria in the post-antibiotics era. *Patho-Biotechnology*. Landes Bioscience, 145-162.
19. Yamada, T., Goto, M., Punj, V., Zaborina, O., Chen, M. L., Kimbara, K., . . . Chakrabarty, A. M. (2002). Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14098-14103.
20. Chaudhari A, Mahfouz M, Fialho AM, Yamada T, Granja AT, Zhu Y, Hashimoto W, SchlarbRidley B, Cho W, Das Gupta TK, C. A. (2007). Cupredoxin-cancer interrelationship: azurin
21. Mehta, R. R., Yamada, T., Taylor, B. N., Christov, K., King, M. L., Majumdar, D., . . . Bratescu, L. (2011). A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits

- angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt. *Angiogenesis*, 14(3), 355-369.
22. Yamada, T., Fialho, A. M., Punj, V., Bratescu, L., Gupta, T. K. D., & Chakrabarty, A. M. (2005). Internalization of bacterial redox protein azurin in mammalian cells: entry domain and specificity. *Cellular microbiology*, 7(10), 1418-1431.
23. Warso, M., Richards, J., Mehta, D., Christov, K., Schaeffer, C., Bressler, L. R., . . . Beattie, C. (2013). A first-in-class, first-in-human, phase I trial of p28, a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer*, 108(5), 1061-1070
24. Gessard, C. (1984). On the blue and green coloration that appears on bandages. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(Supplement_3), S775-S776.
25. Baron, S. (1996). Cholera, *Vibrio cholerae* O1 and O139, and Other Pathogenic Vibrios-
-Medical Microbiology
26. Pollack, M. 1995. *Pseudomonas aeruginosa*, p. 1820–2003. In G. L. Mandell, R. Dolan, and J. E. Bennett (ed.), *Principles and practices of infectious diseases*. Churchill Livingstone, New York, NY
27. Takesue, Y., Yokoyama, T., Akagi, S., Ohge, H., Imamura, Y., Murakami, Y., & Sueda, T. (2002). Changes in the intestinal flora after the administration of prophylactic antibiotics to patients undergoing a gastrectomy. *Surgery today*, 32(7), 581-586.
28. Gaynes, R. and Edwards, J. (2005). National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.*, 41: 848–54.
29. Kollef, M. H., Shorr, A., Tabak, Y. P., Gupta, V., Liu, L. Z., & Johannes, R. (2005). Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest*, 128(6), 3854-3862.
30. Yildirim, S., Nursal, T. Z., Tarim, A., Torer, N., Noyan, T., Demiroglu, Y. Z., . . . Haberal, M. (2005). Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care units, and the hospital services unit of a single center. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 26(6), 488-492.
31. Jodrá, V. M., Pérez, C. D.-A., de los Terreros Soler, L. S., Requejo, C. M. S., Ballesteros, D. D., & Group, Q. C. I. W. (2006). Results of the Spanish national nosocomial

- infection surveillance network (VICONOS) for surgery patients from January 1997 through December 2003. *American journal of infection control*, 34(3), 134-141.
32. Taneja, N., Emmanuel, R., Chari, P., & Sharma, M. (2004). A prospective study of hospital-acquired infections in burn patients at a tertiary care referral centre in North India. *Burns*, 30(7), 665-669.
 33. Chugani, S., & Greenberg, E. (2007). The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. *Microbial pathogenesis*, 42(1), 29-35.
 34. Chitkara, Y., & Feierabend, T. (1981). Endogenous and exogenous infection with *Pseudomonas aeruginosa* in a burns unit. *International surgery*, 66(3), 237-240.
 35. Hsueh, P.-R., Teng, L.-J., Yang, P.-C., Chen, Y.-C., Ho, S.-W., & Luh, K.-T. (1998). Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *Journal of clinical microbiology*, 36(5), 1347-1351.
 36. Fischer, S.; Klockgether, J.; Moran Losada, P.; Chouvarine, P.; Cramer, N.; Davenport, C. et al., (2016). Intraclonal genome diversity of the major *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14. *Environ. Microbiol. Rep.*, 8: 227-234.
 37. Rendon A, Centis R, D'Ambrosio L, et al. (2016) WHO strategies for the management of drug-resistant tuberculosis. *Arch Bronconeumol*
 38. Cramer, N., Klockgether, J., Wrasman, K., Schmidt, M., Davenport, C. F., & Tümmler, B. (2011). Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environmental microbiology*, 13(7), 1690-1704.
 39. Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., . . . Slickers, P. (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 8101-8106.
 40. Klockgether, J., Würdemann, D., Reva, O., Wiehlmann, L., & Tümmler, B. (2007). Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2443-2459.
 41. Ashish, A., Paterson, S., Mowat, E., Fothergill, J. L., Walshaw, M. J., & Winstanley, C. (2013). Extensive diversification is a common feature of *Pseudomonas aeruginosa* populations during respiratory infections in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(6), 790-793.

42. Winstanley, C., O'Brien, S., & Brockhurst, M. A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends in microbiology*, 24(5), 327-337.
43. Nixon, G. M., Armstrong, D. S., Carzino, R., Carlin, J. B., Olinsky, A., Robertson, C. F., & Grimwood, K. (2001). Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics*, 138(5), 699-704.
44. Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Journal of infection and public health*, 2(3), 101-111.
45. Ressler, R. A., Murray, C. K., Griffith, M. E., Rasnake, M. S., Hospenthal, D. R., & Wolf, S. E. (2008). Outcomes of bacteremia in burn patients involved in combat operations overseas. *Journal of the American College of Surgeons*, 206(3), 439-444.
46. Jombo, G., Akpan, S., Epoke, J., Denen, A. P., & Odey, F. (2010). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections complicating surgical wounds and the potential challenges in managing post-operative wound infections: University of Calabar Teaching Hospital experience. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(6), 479-482.
47. Ranjan, K. P., Ranjan, N., Bansal, S. K., & Arora, D. (2010). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India. *Journal of laboratory physicians*, 2(02), 074-077.
48. Patel, B. M., Paratz, J. D., Mallet, A., Lipman, J., Rudd, M., Muller, M. J., . . . Roberts, J. A. (2012). Characteristics of bloodstream infections in burn patients: an 11-year retrospective study. *Burns*, 38(5), 685-690.
49. Tirodimos, I., Arvanitidou, M., Dardavessis, T., Bisiklis, A., & Alexiou Daniil, S. (2010). Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 16 (7), 783-787, 2010.
50. Nagachandrika, T.; Kumar, U.; Dumpatic, S.; Chary, S.; Mandatharac, P. and Rathi VM. (2011). Prevalence of contact lens related complications in a tertiary eye centre in India. *Cont. Lens Anterior Eye*, 34(6): 266-268.

51. Robertson, D. M., Petroll, W. M., Jester, J. V., & Cavanagh, H. D. (2007). Current concepts: contact lens related *Pseudomonas* keratitis. *Contact lens and anterior eye*, 30(2), 94-107.
52. Coggan, K. A., & Wolfgang, M. C. (2011). Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Current issues in molecular biology*, 14(1), 47-70.
53. Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 277.
54. Huhulescu, S., Simon, M., Lubnow, M., Kaase, M., Wewalka, G., Pietzka, A., . . . Allerberger, F. (2011). Fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a previously healthy woman was most likely associated with a contaminated hot tub. *Infection*, 39(3), 265-269.
55. Pier GB, Ramphal R. (2005) *Pseudomonas aeruginosa*. In G. L. Mandell & J. E. Bennett (Ed.), *Mandell*.
56. Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 197-201.
57. Yang, F., Hsu, P., Lee, S. D., Yang, W., Hoskinson, D., Xu, W., . . . Varani, G. (2017). The C terminus of Pcf11 forms a novel zinc-finger structure that plays an essential role in mRNA 3'-end processing. *Rna*, 23(1), 98-107.
58. Juan, C., Maciá, M. D., Gutiérrez, O., Vidal, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(11), 4733-4738.
59. Engel, J., & Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 61–66.
60. Vareechon, C., Zmina, S. E., Karmakar, M., Pearlman, E., & Rietsch, A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. *Cell host & microbe*, 21(5), 611–618.e5.

61. Shaver, C. M., & Hauser, A. R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and immunity*, 72(12), 6969-6977.
62. Sun, J., Kawakami, H., Zech, J., Speck, C., Stillman, B., & Li, H. (2012). Cdc6-induced conformational changes in ORC bound to origin DNA revealed by cryo-electron microscopy. *Structure*, 20(3), 534-544.
63. Choi, J.-H., Lee, M.-H., Cho, Y.-J., Park, B.-S., Kim, S., and Kim, G.-C. (2011) The bacterial protein azurin enhances sensitivity of oral squamous carcinoma cells to anticancer drugs. *Yonsei Med J* 52: 773–778
64. Adman, E. T. (1991). Copper protein structures. *Advances in protein chemistry*, 42, 145-197.
65. Fee, J. A. (1975). copper proteins systems containing the “Blue” copper center *Biochemistry* (pp. 1-60): Springer
66. McManus, J., Brune, D., Han, J., Sanders-Loehr, J., Meyer, T., Cusanovich, M., . . . Blankenship, R. (1992). Isolation, characterization, and amino acid sequences of auracyanins, blue copper proteins from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(10), 6531-6540.
67. Baker, E. N. (1988). Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans* refinement at 1.8 Å resolution and comparison of the two crystallographically independent molecules. *Journal of molecular biology*, 203(4), 1071-1095
68. Chang, T. K., Iverson, S. A., Rodrigues, C. G., Kiser, C. N., Lew, A., Germanas, J. P., & Richards, J. H. (1991). Gene synthesis, expression, and mutagenesis of the blue copper proteins azurin and plastocyanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(4), 1325-1329.
69. Bernardes, N., Chakrabarty, A. M., & Fialho, A. M. (2013). Engineering of bacterial strains and their products for cancer therapy. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(12), 5189-5199.
70. Yamada, T., Gupta, T. K. D., & Beattie, C. W. (2016). p28-mediated activation of p53 in G2–M phase of the cell cycle enhances the efficacy of DNA damaging and antimetabolic chemotherapy. *Cancer research*, 76(8), 2354-2365.
71. Copur MS. State of Cancer Research Around the Globe. *Oncology (Williston Park)*. 2019 May 14;33(5):181-5. PMID: 31095717

72. Tsugane, S., & Sasazuki, S. (2007). Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric cancer*, 10(2), 75-83.
73. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
74. Arslan, S. (2000). Kanserli hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi. Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Erzurum
75. Greenblatt, M., Bennett, W. P., Hollstein, M., & Harris, C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer research*, 54(18), 4855-4878.
76. Amerikan Kanser Birliği. (1998) Hemşireler İçin Kanser El Kitabı. 2. Baskı, Ankara: 4. Akşam Sanat Okulu Matbaası.
77. Stritzker, J., Weibel, S., Hill, P. J., Oelschlaeger, T. A., Goebel, W., & Szalay, A. A. (2007). Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in live mice. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3), 151-162.
78. Zhang, J., Liu, M., Su, Y., Du, J., & Zhu, A. J. (2012). A targeted in vivo RNAi screen reveals deubiquitinases as new regulators of Notch signaling. *G3: Genes| Genomes| Genetics*, 2(12), 1563-1575.
79. Lulla, R. R., Goldman, S., Yamada, T., Beattie, C. W., Bressler, L., Pacini, M., . . . Dunkel, I. J. (2016). Phase I trial of p28 (NSC745104), a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in pediatric patients with recurrent or progressive central nervous system tumors: A Pediatric Brain Tumor Consortium Study. *Neuro-oncology*, 18(9), 1319-1325.
80. Paydarnia, N., Nikkhai, S. K., Fakhravar, A., Mehdiabdol, M., Heydarzadeh, H., & Ranjbar, S. (2019). Synergistic effect of granzyme B-azurin fusion protein on breast cancer cells. *Molecular biology reports*, 46(3), 3129-3140.
81. Lu, Y., Yang, J., & Segal, E. (2006). Issues related to targeted delivery of proteins and peptides. *The AAPS journal*, 8(3), E466-E478
82. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*, 15(1-2), 40-56.

83. Duncan Patrick, M. (2008). Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 616-619.
84. Yamada, T., Mehta, R. R., Lekmine, F., Christov, K., King, M. L., Majumdar, D., . . . Beattie, C. W. (2009). A peptide fragment of azurin induces a p53-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 8(10), 2947-2958.
85. Ribeiro, A., Albergaria, A., Sousa, B., Correia, A., Bracke, M., Seruca, R., . . . Paredes, J. (2010). Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene*, 29(3), 392-402
86. Paredes, J., Correia, A. L., Ribeiro, A. S., Albergaria, A., Milanezi, F., & Schmitt, F. C. (2007). P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Research*, 9(5), 1-12.
87. Fialho, A.M. (2009). Innovative biotechnological approaches for cancer therapy: bacterial protein azurin as a new anticancer drug candidate. In *Biological Sciences Research Group annual report 2009*, pp. 24-26
88. Fialho, A. M., Stevens, F. J., Gupta, T. K. D., & Chakrabarty, A. M. (2007). Beyond host-pathogen interactions: microbial defense strategy in the host environment. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), 279-286.
89. Bernardes, N., Ribeiro, A. S., Abreu, S., Mota, B., Matos, R. G., Arraiano, C. M., . . . Fialho, A. M. (2013). The bacterial protein azurin impairs invasion and FAK/Src signaling in P-cadherin-overexpressing breast cancer cell models. *PloS one*, 8(7), e69023
90. Wolf, P., & Elsässer-Beile, U. (2009). *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(3), 161-176.
91. Mahfouz, M., Hashimoto, W., Gupta, T. K. D., & Chakrabarty, A. M. (2007). Bacterial proteins and CpG-rich extrachromosomal DNA in potential cancer therapy. *Plasmid*, 57(1), 4-17.
92. Taylor, B. N., Mehta, R. R., Yamada, T., Lekmine, F., Christov, K., Chakrabarty, A. M., . . . Beattie, C. W. (2009). Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer research*, 69(2), 537-546.
93. Apiyo, D., & Wittung-Stafshede, P. (2005). Unique complex between bacterial azurin and tumor-suppressor protein p53. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(4), 965-968

94. Ramachandran, S., Sarkar, S., Mazumadar, A., & Mandal, M. (2011). Azurin synthesis from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2453, properties, induction of reactive oxygen species and p53 stimulated apoptosis in breast carcinoma cells. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 3(05), 104-111.
95. Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., Rohner, P., & Heuck, C. (2003). *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*: World Health Organization
96. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press
97. Baron, E., & Finegold, S. M. (1990). Methods for testing antimicrobial effectiveness. *Diagnostic microbiology*, 171-194.
98. Atlas, R. M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1-3), 317-327.
99. Harley, J., & Prescott, L. (2002). Bacterial morphology and staining. *Laboratory Exercises in Microbiology*, 5th Edition, The McGraw-Hill Companies, New York, 31-36
100. Hogardt, M., & Heesemann, J. (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 557-562.
101. Korgaonkar, A., Trivedi, U., Rumbaugh, K. P., & Whiteley, M. (2013). Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1059-1064.
102. Al-Buaiji, A. K. H. and Al-Hashimy, A. B. (2019). Molecular study *parC* and *gyrA* genes of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. M. Sc. Thesis, Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Post Graduate Studies, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
103. Salman, A. D., Zainab, A., & Rahman, E. (2017). Bacteriological Study of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Different Infections and Study Antimicrobial Activities of Plant Extract *Solanum Nigrum* Against It. *Iraqi journal of Science*, 58(4C), 2278-2284.
104. Al-Kaisse A. A. Sh., Al-Thwaini A. N. and Al-Segar R. Q. M. (2013). Molecular detection of OXA-4, OXA-10 and VEB-1 genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn's wound patients. M. Sc. Thesis, Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Post Graduate Studies, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

105. Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., De Fatima, M., Zuliani, J., & Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1681-1686
106. Sorlózano, A., Gutiérrez, J., Piédrola, G., & Soto, M. J. (2005). Acceptable performance of VITEK 2 system to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*: a comparative study of phenotypic commercial methods and NCCLS guidelines. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 51(3), 191-193.
107. Espinar, M. J., Rocha, R., Ribeiro, M., Rodrigues, A. G., & Pina-Vaz, C. (2011). Extended-spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* screened by the VITEK 2 system. *Journal of medical microbiology*, 60(6), 756-760
108. Dehbashi, S., Tahmasebi, H., & Arabestani, M. R. (2018). Association between Beta-lactam Antibiotic resistance and virulence factors in AmpC producing clinical strains of *P. aeruginosa*. *Osong public health and research perspectives*, 9(6), 325
109. Verma, P., & Verma, M. K. (2018). Antimicrobial activity of Antibiotics and Antiseptics (Dettol and Betadine) against Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Life Sciences Scientific Research*, 1589-1598
110. Shbib, S., & Soukkarieh, C. (2015). The Accuracy of API 20E and PCR Using 16s rRNA Gene for Characterization of *Escherichia coli* Strains Causing Urinary Tract Infections in Damascus-Syria. *Int. J. PharmTech Res*, 8(4), 741-749.
111. Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Mol. Cloning A Lab. Man
112. Segel, I.H. (1976). *Biochemical Calculations*, 2nd edition, John and Sons. Inc. NewYork
113. Mohamed MS, Fattah SA, Mostafa HM (2010) Azurin as antitumor protein and its effect on the cancer cell lines. *Curr Res J Biol Sci* 2(6):396–401
114. Wagner A, Ruf M, Braus DF ve ark. (2003) Neuronal activity changes and body image distortion in anorexia nervosa. *Neuroreport*,
115. Firoved, A. M., and V. Deretic.2003. Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*.
116. Okuda K, Miyamoto Y, Skarzynski DJ, 2012: Regulation of endometrial prostaglandin F2 α synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*

117. Aiello AE, Coulborn RM, Perez V, Larson EL. (2008) Effect of hand hygiene on infectious disease risk in the community setting: a meta-analysis, *Am J Public Health*, , vol.
118. Raju GK, Cooney CL (1993) Media and air sterilization. In: Stephanopoulos G (ed) *Biotechnology*, vol 3. VCH, New York
119. Al-Jumaily, E. and Abd, N. (2017). Effect of Quinoline-2-one Derivatives on the Gene Expression of mexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(3), 1475-1479.
120. Kadhim, D. and Ali, M. (2014). Prevalence study of quorum sensing groups among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3(11): 204-215.
121. Saini KS, Tagliamento M, Lambertini M, McNally R, Romano M, Leone M, Curigliano G, de Azambuja E. Mortality . (2020). in patients with cancer and coronavirus disease 2019: A systematic review and pooled analysis of 52 studies. *Eur J Cancer*.

EKLER

1. sonikatör
2. Primerler
3. PET-28a(+)/Azu yapılarının LB agar üzerindeki E.coli BL21(DE3) Rosetta hücrelerine dönüştürülmesi
4. DEAE selüloz kolonu (2X8) cm aracılığıyla iyonik değişim kromatografisi
5. Termal döngü cihazı
6. GeneJET PCR saflaştırma kiti
7. Jel elektroforez sistemi
8. Sihirbaz genomik DNA saflaştırma kiti



2

1



3



4



5



6



7



8

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	SHYMAA FADHEL ABBAS AL-ANBAGI
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer:



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bilim Şehri Üniversite Koleji
Fakülte	Bilim Fakültesi
Bölümü	Biyoloji bölümü
Mezuniyet Yılı	2012/2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
Enstitü Adı	FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anabilim Dalı	İLERİ TEKNOLOJİLER ABD
Programı	GENETİK VE BİYO MÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ
Mezuniyet Tarihi	2022