

Moleküler Kenetleme (Docking) Yöntemi ile Bakteriyel Bir Sinyal Kompleksi ve Peonidin Molekülü Etkileşiminin İncelenmesi

Arzu ÖZGEN¹, Nihan ÜNLÜ^{2*}

¹ İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü İstanbul, TÜRKİYE

² İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü İstanbul, TÜRKİYE

¹aozgen@gelisim.edu.tr

²nunlu@gelisim.edu.tr

(Geliş/Received: 16/08/2022;

Kabul/Accepted: 15/09/2022)

Öz: Gram-negatif bakterilerinden olan *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli bir enfeksiyon sebebidir. Biyofilm oluşturma özelliği olan *P. aeruginosa* bu özelliği sebebi ile çoklu antibiyotik direncine sahiptir ve eradikasyonu güçtür. Üçlü bir sinyal dizisi olan YFiBRN, periplazmada alınan sinyallere cevap olarak yüzey adaptasyonu, biyofilm oluşumu gibi hücrel süreçlerde etkili olan c-di-GMP seviyelerini modüle eder. Antosiyantinler grubunda bulunan peonidin ise antibakteriyel özelliğe sahiptir. Bu çalışmada moleküler kenetleme (docking) metodu kullanılarak YFiR-YFiB (59-168) ile peonidin arasındaki etkileşim araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, YFiBRN, peonidin, moleküler kenetleme.

Investigation of the Interaction of a Bacterial Signal Complex and Peonidine Molecule by Molecular Docking Method

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa*, one of the gram-negative bacteria, is an important cause of infection, especially in immunocompromised patients. *P. aeruginosa* with biofilm-forming feature has multiple antibiotic resistance due to this feature and its eradication is difficult. YFiBRN, a triple signal sequence, modulates c-di-GMP levels, which are effective in cellular processes such as surface adaptation and biofilm formation in response to signals received in the periplasm. Peonidine, which is in the group of anthocyanins, has antibacterial properties. In this study, the interaction between YFiR-YFiB (59-168) and peonidine was investigated using the molecular docking method.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, YFiBRN, peonidine, molecular docking.

1. Giriş

Farmasötik ürünlerin araştırılıp insan kullanımına sunulması bu ürünlerin in-vitro ve in-vivo doğrulama testlerini içeren karmaşık, uzun ve maliyetli bir süreçtir. Dahası aday moleküllerin ürün haline gelebilmesinden önce bu moleküller hakkında detaylı bir bilgiye sahip olmanın yanı sıra geliştirilmesi, kimyasal sentezi ve formülasyonunun optimizasyonu ve hayvanlarda olması muhtemel toksik etkilerinin çalışılması, klinik deneyler ve onay sürecini kapsamaktadır [1]. Dolayısıyla bir ilaç keşfi ortalama 12 yılı almakta ve maliyeti yaklaşık olarak 1,8 milyar ABD dolarını bulmaktadır [2]. Bu noktada ilaç geliştiriciler hem zamanı hem de maliyeti verimli kullanabilmek amacı ile bilgisayar ortamında gerçekleştirilen moleküler kenetleme uygulamaları ile aday molekülleri daha kısa zamanda belirleyebilmektedirler. Aynı zamanda moleküler kenetleme ile, potansiyel moleküllerin yan etkileri de tespit edilebilmektedir.

Pseudomonas aeruginosa, yaklaşık olarak 1-5 µm uzunluğunda ve 0.5-1.0 µm genişliğinde, hareketli, Gram negatif (-), çubuk şeklinde, aerobik ve fakültatif anaerobik solunum yapan bir bakteri türüdür [3]. 37°C'de iyi büyüyen *P. aeruginosa*, aynı zamanda 4°C-42°C arasındaki geniş bir sıcaklık aralığında da hayatta kalabilmektedir [4]. Polisiklik aromatik hidrokarbonları parçalayabilme özelliğine sahip bir toprak bakterisi olan *P. aeruginosa* bataklıklarda, deniz kıyılarında, bitki ve hayvan dokularında da büyüyebilmektedir [5].

Günümüzde antimikrobiyal direnç, çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin ortaya çıkması, yayılması ve sürekliliği ile beraber insan, hayvan ve çevre sağlığı için büyük bir tehdit haline gelmiştir [6].

* Sorumlu yazar: nunlu@gelisim.edu.tr Yazarların ORCID Numarası: ¹0000-0002-5410-6551, ²0000-0003-2104-6019

Özellikle antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı, artan uluslararası seyahat, yetersiz hijyen ve metabolize olmayan antibiyotiklerin salınımı antibiyotik direncine zemin hazırlayan nedenler arasında bulunmaktadır [7]. Anormal antibiyotik kullanımı nedeniyle, aralarında *P. aeruginosa*'nın da bulunduğu çok sayıda bakteri MDR tiplerine dönüşmüştür. Öyle ki *P. aeruginosa* MDR fırsatçı patojeni, diğer birçok bakterinin yaşayamayacağı yüksek antibiyotik basıncı olan nişlerde büyüebilmekte ve hatta konakçı mikrobiyotasını da yerinden edebilmektedir [8].

Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, özellikle geç evre kistik fibrozisli hastalarda [9] ve başta kanser, AIDS gibi bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde ve diyabetik yaraları olan hastalarda hem akut hem de kronik enfeksiyona yol açmaktadır. Aynı zamanda kateter ve vantilatör gibi kalıcı sentetik medikal implantlarda da biyofilm oluşturmaktadır [10].

Biyofilm oluşturma özelliğine sahip olan *P. aeruginosa*, biyofilm ile ilgili araştırmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır [3]. Biyofilm, mikroorganizmaların bir yüzeye tutunarak ekzopolisakarit "EPS" adı verilen jelsi bir tabaka içerisinde oluşturdukları topluluktur [11]. EPS içerisine gömülü olan bakteriler bu sayede fiziksel, kimyasal ve antimikrobiyal ajanlar, antikorlar ve fagositik hücrelerin üretmiş olduğu antimikrobiyal moleküller gibi biyolojik streslerden korunmuş olurlar [12]. Diğer bir deyişle biyofilmler patojenik bakterilere fiziksel koruma sağlayıp, konakçı bağışıklık sisteminden kaçmalarını kolaylaştırır ve antibiyotikleri de etkisiz hale getirir [13].

Bakteriyel ikinci haberci olan siklik-di-GMP (c-di-GMP), yüzey adaptasyonuna, biyofilm oluşumuna, hücre döngüsü ilerlemesine ve virülansa katkıda bulunur. Dolayısıyla çeşitli hücresel süreçleri etkilediği tespit edilen yaygın bir sinyal molekülüdür [14] ve *P. aeruginosa* bakterisinde de biyofilm oluşumu bu molekül tarafından düzenlenir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar yfiBNR operonunun, periplazmada alınan sinyallere yanıt olarak hücre içi c-di-GMP seviyelerini düzenleyen üçlü bir sinyal sistemi olduğunu göstermiştir. yfiBNR operonunda bulunan YFiN, bir periplazmik PAS alanı, sitoplazmik HAMP ve katalitik GGDEF alanlarından oluşan iç zar diguanilat siklazıdır. YfiN aktivitesi, çözünür periplazmik bir protein ve negatif baskılayıcı olan YfiR'nin, PAS alanı ile etkileşime girmesi ile baskılanır [15]. YfiN aktivitesi, sistemin üçüncü bileşeni olan bir dış zar lipoproteinini YfiB tarafından da uyarılır [16].

Bir antosiyanin olan peonidin, yaban mersini, kıvılcık, mürver, ahududu tohumları ve çilek gibi meyvelerde bulunabilen flavonoidlerdendir [17]. Anti-inflamatuar aktivitesi bulunan peonidin aynı zamanda kemopreventif aktivite gösterdiği de rapor edilmiştir [18]. Ayrıca peonidin antibakteriyel özelliğe de sahip olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [19].

Günümüz dünyasında çoklu ilaca dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkışı ve bu mikroorganizmalar ile mücadelede yaşanan zorluklar antibiyotiklere alternatif bileşiklere olan ihtiyacı zorunlu hale getirmiştir. Çok sayıda biyolojik aktiviteye sahip olan flavonoidler aynı zamanda geniş antimikrobiyal aktiviteye de sahiptirler ve bu özellikleri ile antimikrobiyal moleküllere potansiyel adaylar olarak gösterilmektedirler. Bu sebeple çalışmamızda özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde enfeksiyona sebep olan *P. aeruginosa* MDR fırsatçı patojenine ait yfiBNR operonunun YFiR-YFiB (59-168) bölgesi ile bir antosiyanin olan peonidin'in moleküler kenetleme metodu ile protein-ligand etkileşimleri incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

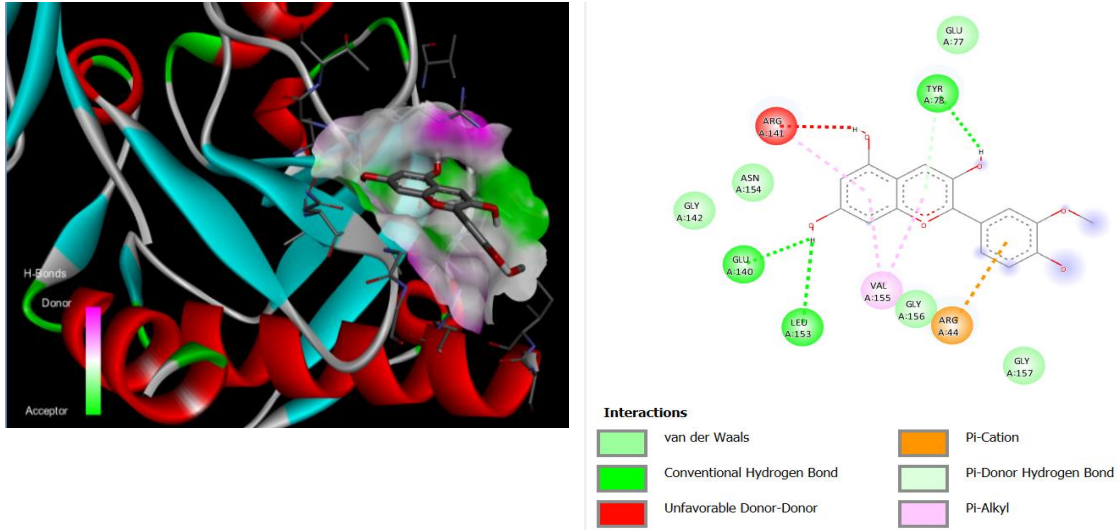
P. aeruginosa bakterisine ait YfiBNR üçlü sinyal dizisinde yer alan YFiR-YFiB (59-168) kristal yapısı (PDB ID: 4ZHY) Protein Data Bank'tan (PDB, <https://www.rcsb.org/>) temin edildi. 4ZHY'ye ait pdb dosyası A ve B zincirleri kullanılarak hazırlanmış ve AutoDockTools'a aktarılmıştır (ADT ver.1.5.6). Daha sonra su molekülleri protein yapısından uzaklaştırılmış ve 4ZHY kodlu domainin pdbqt dosyası kaydedilmiştir. Molekül yapısı C₁₆H₁₃O₆ olan Peonidin (PubChem CID: 441773) ligandının kimyasal yapısı Ulusal Tıp Kütüphanesinden (National Library of Medicine/National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) temin edilmiştir. Burulmaları incelenen ligandın dosyaları, AutodockTools (ADT ver.1.5.6) kullanılarak pdbqt formatında kaydedilmiştir.

Moleküler kenetleme çalışması Autodock 4.1 [20] kullanılarak yapılmıştır. Her yerleştirme, standart Autodock adımlarına [21] göre yapılmıştır. Moleküler yerleştirme işlemleri sonucunda elde edilebilecek en uygun bağlanma modları Autodock 4.1 ile belirlenmiş, Biovia Discovery Studio Visualizer 2021 programı ile analizler ve görseller elde edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Günümüzde gelişen teknolojiyle beraber moleküler düzeyde çalışmalarda önemli ölçüde ivme kazanmıştır ve birçok molekülün yapısı bilgisayar ortamına entegre edilebilmektedir. Dolayısıyla laboratuvar ortamında gerçekleştirilecek birçok molekülün etkileşimi öncelikle bilgisayar simülasyonu ile araştırılmaktadır ve bu çalışmalar farmakoloji alanında oldukça önemlidir. Moleküler kenetleme çalışmaları sayesinde, moleküllerin birbirleri ile olması muhtemel etkileşimleri, bağlanma enerjileri, fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri gibi önemli parametreler hakkında bilgi elde edilebilmektedir [22, 23]. Moleküler kenetleme çalışmalarında birbirine bağlandığında kararlı bir kompleks oluşturması beklenen iki molekül kullanılır ve bu moleküller genellikle ligand ve reseptör olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda moleküler kenetleme, protein-DNA, protein-RNA, protein-şeker, protein-peptid ve protein-küçük bileşikler gibi çift olasılıklarını da kapsamaktadır [2]. Farmasötik keşfinde genellikle ligand küçük molekül olup reseptör ise bir protein veya DNA gibi biyolojik bir makromoleküldür [24].

Bu çalışmada ligand-protein “Penoidin ve YFiR-YFiB (59-168)” etkileşimi neticesinde ortaya çıkan bağlanma enerjisi (Gibbs serbest enerji, ΔG) -5.3 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Sonucun negatif bir değer olması reaksiyonun ekzotermik olduğunu ve istemli bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışmamızda YFiR-YFiB (59-168) reseptör ve Penoidin ise ligand olarak alınmıştır. Bu iki molekül arasında moleküler kenetleme metodu kullanılarak bir etkileşimin varlığı tespit edilmiştir. YFiR-YFiB (59-168) ve Penoidin arasındaki etkileşim Şekil 1’de gösterilmektedir. Şekildeki görsel, BIOVIA Discovery Studio Visualizer yazılım paketi kullanılarak simüle edilmiştir.

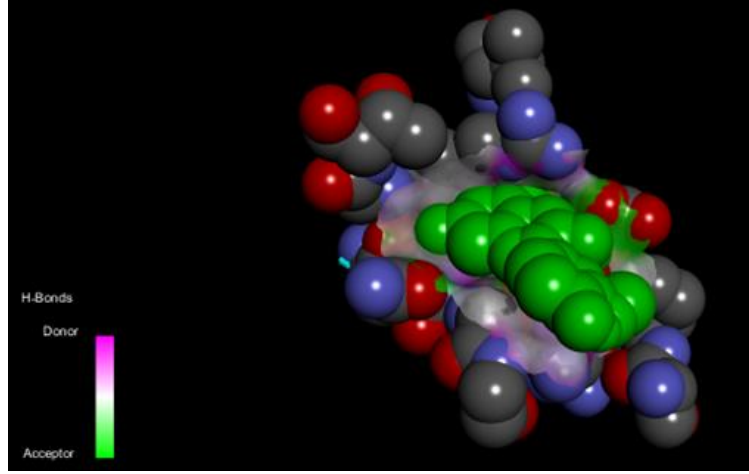


Şekil 1. YFiR-YFiB (59-168) bağlanma bölgesindeki aminoasitler ile ligand arasındaki etkileşimin 2D ve 3D gösterimi.

Ligand ile reseptör arasında van der Waals, konvensiyonel hidrojen bağı ve diğer etkileşimlerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 1). Moleküler kenetleme metodu kullanılarak sırasıyla üç konvensiyonel hidrojen bağı; peonidinin -O atomu ile Tyr78 rezidüsü (Uzunluk: 5.64 Å), Glu140 rezidüsü (Uzunluk: 4.50 Å) ve Leu153 rezidüsü (Uzunluk: 4.73 Å) arasında bulunmuştur. H-bağları, proteinler ve DNA da dahil olmak üzere birçok biyolojik molekülün yapısal bütünlüğünde önemli olduğu gibi ilaç-reseptör etkileşimlerinde de çok önemlidir [25]. Konvensiyonel hidrojen bağları (NH \cdots O, OH \cdots O, OH \cdots N ve NH \cdots N), biyomoleküler yapıdaki temel dengeleyici kuvvetleri temsil etmektedir [26]. Elde edilen bulgularda ayrıca ligand ile sırasıyla, bir pi-kasyon etkileşimi Arg44 rezidüsü (Uzunluk: 6.40 Å), bir pi-donor hidrojen bağı etkileşimi Tyr78 rezidüsü (Uzunluk: 5.64 Å) ve iki pi-alkil etkileşimi Val155 rezidüleri (Uzunluk: 4.45 Å ve 4.56 Å) arasında gerçekleşmiştir. pi-alkil bağı gibi etkileşim türleri, reseptörün bağlanma cebindeki ligandın hidrofobik etkileşimini artırmaya yardımcı olmaktadır [27]. Beş adet van der Waals etkileşimi peonidin ile reseptörün Glu77, Gly142, Asn154, Gly156 ve Gly157 rezidüleri arasında gerçekleşmiştir (Şekil 1). Van der Waals kuvvetleri, protein-ligand kompleks

oluşumunda belirleyici olmaktadır ve ligandın proteine bağlanma afinitesinde bu etkileşimlerin çok önemli olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [28, 29].

Şekil 2’de ise ligandın reseptör içerisine yerleşmiş olduğu görülmektedir. Burada yeşil renk ile temsil edilen ligand ile 4HZY’nin arasında oluşan hidrojen bağı etkileşiminin varlığını gösteren yüzey verilmiştir. YFiR-YFiB (59-168) üzerinde koyu gri karbon atomunu, kırmızı oksijen atomunu, mavi nitrojeni temsil etmektedir.



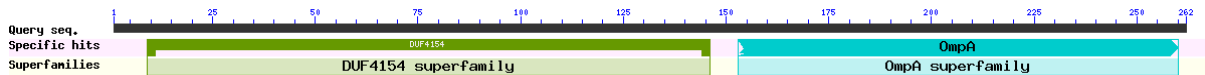
Şekil 2. 4ZHY bağlanma bölgeleri.

YFiR-YFiB (59-168) ile peonidin arasındaki bağlanma enerjisi (ΔG_{bind}), intermoleküler enerji ve toplam enerji Tablo 1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre peonidin ile YFiR-YFiB (59-168) etkileşime girmiştir.

Table 1. YFiR-YFiB (59-168) ile peonidin arasındaki moleküler doking analizi.

| Reseptör | Ligand | Bağlanma enerjisi/ ΔG (kcal/mol) | Intermol enerji (kcal/mol) | Toplam internal enerji (kcal/mol) |
|--------------------|--|--|----------------------------|-----------------------------------|
| YFiR-YFiB (59-168) | C ₁₆ H ₁₃ O ₆ | -5.3 | -7.09 | -1.14 |

Peonidin, YFiR (1-150.) aminoasit dizisi üzerinde Arg44, Glu77, Tyr78, Glu140 ve Gly142 ile etkileşime girmiştir. Bu alanda DUF4154 olarak adlandırılan domain bulunmaktadır (Şekil 3) ve fonksiyonu bilinmemektedir. DUF4154 domaini üzerinde iki konvansiyonel hidrojen bağı olmak üzere bir pi-donor hidrojen bağı, iki van der Waals ve bir pi-kasyon etkileşimi bulunmaktadır. Peonidin, YFiB (151-262.) amino asit dizisi üzerinde ise Leu153, Asn154, Val155, Gly156 ve Gly157 rezidüleri ile etkileşime girmiştir. Bu alanda 153-260. aminoasit arasında OmpA-benzeri peptidoglikan-bağlanma domaini bulunmaktadır (Şekil 3) ve bu proteinler hücre morfolojisi, zar stabilitesi, biyofilm ve dış zar vezikül oluşumu için önemlidir. OmpA-benzeri peptidoglikan-bağlanma domaini üzerinde ise bir konvansiyonel hidrojen bağı olmak üzere üç van der Waals ve bir pi-alkil etkileşimi bulunmaktadır. OmpA proteinleri, doğuştan gelen bağışıklık sistemi (tamamlayıcı sistem) de dahil olmak üzere ökaryotik hücelere yapışmanın yanı sıra biyofilmlerdeki komşu bakteri hücreleriyle etkileşime girerek enfeksiyon sırasında bakteri ve konakçı arasındaki etkileşimlerde yer almaktadır [30].



Şekil 3. YFiR-YFiB (59-168) bölgesi üzerinde DUF4154 ve OmpA korunmuş domainlerinin gösterimi [31].

5. Sonuçlar

YFiBNR, *P. aeruginosa* bakterisinin biyofilm formasyonunda ve in vivo sürekliliğinde önemli bir regülatör sistemdir. Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda *P. aeruginosa* ciddi enfeksiyonlara sebep olmakta ve biyofilm oluşturma özelliğine sahip olması bu bakteriye karşı tedaviyi zorlaştırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, karbapenem dirençli *P. aeruginosa* için yeni tedavi stratejilerine yönelik araştırma ve geliştirmeye yönelik ihtiyacın varlığını önemle vurgulamıştır [32]. Moleküler doking temelli çalışmalar ile ligand-protein etkileşim çalışmalarının hızlıca gerçekleştirilmesi yeni tedavi stratejileri için zaman ve maliyet açısından önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışma ile bir antosiyanin olan peonidin ile YFiBNR üçlü sinyal dizisinin YFiR-YFiB (59-168) bölgesinin etkileşimi gösterilmiştir. Ligand ve protein arasında bir etkileşim meydana gelmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen sonuçların biyofilm formasyonunun inhibisyonu çalışmalarına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- [1] Sinha, S., & Vohora, D. (2018). Chapter 2 - drug discovery and development: An overview. Pharmaceutical medicine and translational clinical research (pp. 19-32). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802103-3.00002-X>
- [2] Crampon, K., Giorkallos, A., Deldossi, M., Baud, S., & Steffanel, L. A. (2022;2021;). Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. Drug Discovery Today, 27(1), 151-164. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.007>
- [3] Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020;2019;). Microbe profile: Pseudomonas aeruginosa : Opportunistic pathogen and lab rat. Microbiology (Society for General Microbiology), 166(1), 30-33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
- [4] LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012). Growth and laboratory maintenance of pseudomonas aeruginosa. Current Protocols in Microbiology (Online), Chapter 6, Unit 6E.1.
- [5] Olson, M. V., Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warren, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., . . . Lory, S. (2000). Complete genome sequence of pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature (London), 406(6799), 959-964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- [6] Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance, 11, 1645-1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- [7] Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS, 112(18), 5649-5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- [8] Sohail, M., Rashid, A., Aslam, B., Waseem, M., Shahid, M., Akram, M., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2016). Antimicrobial susceptibility of acinetobacter clinical isolates and emerging antibiogram trends for nosocomial infection management. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 49(3), 300-304. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0111-2016>
- [9] Harrison, F. (2007). Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. Microbiology (Society for General Microbiology), 153(4), 917-923. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004077-0>
- [10] Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis, and treatment of pseudomonas aeruginosa infections. Adis International. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>
- [11] Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews. Microbiology, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- [12] Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 15(4), 305-311. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000400002>
- [13] Newell, P. D., Boyd, C. D., Sondermann, H., & O'Toole, G. A. (2011). A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. PLoS Biology, 9(2), e1000587-e1000587. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000587>
- [14] Jenal, U., Reinders, A., & Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. Nature Reviews. Microbiology, 15(5), 271-284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>
- [15] Malone, J. G., Jaeger, T., Spangler, C., Ritz, D., Spang, A., Arriumerlou, C., Kaefer, V., Landmann, R., & Jenal, U. (2010). YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in pseudomonas aeruginosa. PLoS Pathogens, 6(3), e1000804. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000804>
- [16] Giardina, G., Paiardini, A., Fericola, S., Franceschini, S., Rinaldo, S., Stelitano, V., & Cutruzzolà, F. (2013). Investigating the allosteric regulation of YfiN from pseudomonas aeruginosa: Clues from the structure of the catalytic domain. PloS One, 8(11), e81324-e81324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081324>
- [17] Mecocci, P., Tinarelli, C., Schulz, R. J., & Polidori, M. C. (2014). Nutraceuticals in cognitive impairment and alzheimer's disease. Frontiers in Pharmacology, 5, 147-147. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00147>
- [18] Kwon, J. Y., Lee, K. W., Hur, H. J., & Lee, H. J. (2007). Peonidin inhibits phorbol-ester-induced COX-2 expression and transformation in JB6 P.sup.+ cells by blocking phosphorylation of ERK-1 and -2. Annals of the New York Academy of Sciences, 1095, 513. <https://doi.org/10.1196/annals.1397.055>

- [19] Sun, H., Zhang, P., Zhu, Y., Lou, Q., & He, S. (2018). Antioxidant and prebiotic activity of five peonidin-based anthocyanins extracted from purple sweet potato (*ipomoea batatas* (L.) lam.). *Scientific Reports*, 8(1), 5018-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23397-0>
- [20] Morris, G. M., Huey, R., & Olson, A. J. (2008). Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 8, Unit 8.14.
- [21] Huey, R., Morris, G. M., & Forli, S. (2012). Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. *The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory*, 10550, 92037.
- [22] Baig, M. H., Ahmad, K., Roy, S., Ashraf, J. M., Adil, M., Siddiqui, M. H., Khan, S., Kamal, M. A., Provazník, I., & Choi, I. (2016). Computer aided drug design: Success and limitations. *Current Pharmaceutical Design*, 22(5), 572.
- [23] Scotti, L., & Scotti, M. T. (2015). Computer aided drug design studies in the discovery of secondary metabolites targeted against age-related neurodegenerative diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(21), 2239.
- [24] Veit-Acosta, M., & de Azevedo Junior, W. F. (2021). The Impact of Crystallographic Data for the Development of Machine Learning Models to Predict Protein-Ligand Binding Affinity. *Current Medicinal Chemistry*, 28(34), 7006-7022.
- [25] Abelian, A., Dybek, M., Wallach, J., Gaye, B., & Adejare, A. (2021). *Pharmaceutical chemistry*. In Remington (pp. 105-128). Academic Press.
- [26] Horowitz, S., & Trievel, R. C. (2012). Carbon-oxygen hydrogen bonding in biological structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41576-41582. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.418574>
- [27] Arthur, D. E., & Uzairu, A. (2019). Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. *Journal of King Saud University. Science*, 31(4), 1151-1166. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.01.011>
- [28] Xavier, M. M., Heck, G. S., Avila, M. B. d., Levin, N. M. B., Pintro, V. O., Carvalho, N. L., & Azevedo, W. F. d. (2016). SAnDReS a computational tool for statistical analysis of docking results and development of scoring functions. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19(10), 801.
- [29] Ducati, R. G., Basso, L. A., Santos, D. S., & de Azevedo, W. F. (2010). Crystallographic and docking studies of purine nucleoside phosphorylase from mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(13), 4769-4774. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.05.009>
- [30] Paulsson, M., Kragh, K. N., Su, Y., Sandblad, L., Singh, B., Bjarnsholt, T., & Riesbeck, K. (2021). Peptidoglycan-binding anchor is a pseudomonas aeruginosa OmpA family lipoprotein with importance for outer membrane vesicles, biofilms, and the periplasmic shape. *Frontiers in Microbiology*, 12, 639582-639582. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.639582>
- [31] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, Erişim: 12 Eylül 2022
- [32] Tacconelli, E. (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development.