

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

PANTON VALENTİNE LÖKOSİDİN (PVL) TOKSİNİNİN
REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE PROSTAT KANSERİ HÜCRE
HATTI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

RABİA YİĞİT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF20054 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen bana her konuda destek olan benimleengin bilgilerini paylaşan beni çıkıttığım bu yolda en doğru şekilde yönlendiren danışmanım Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'na çok teşekkür ederim. Ayrıca bana sadece tez hakkında değil her konuda yanımda olan ve beni sabırla dinleyip herşeyimi paylaşabildiğim, her konuda düşüncelerine önem verdiğim ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e aynı zamanda bana yol gösteren Erman ORYAŞIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans boyunca bana kattıkları güzel dostluk ve yardımlarını esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve her türlü destekleri için eşim Şevket Murat YİĞİT'e ve tüm yaşamın boyunca maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen, her konuda yanında olan annem Havva TOZLU'a ve babam Ahmet TOZLU'a ayrıca yaşadığım her sorunda bana akıl veren ablam Elif YORULMAZ ve Alper YORULMAZ'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2. 1. Rekombinat DNA Teknolojisi	2
2. 2. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2. 2. 1. Tarihçesi	3
2. 2. 2. Taksonomi	4
2. 2. 3. Morfolojisi	5
2. 2. 4. Hücre Duvar Yapısı	6
2. 2. 5. Virulans Faktörleri	7
2. 2. 6. <i>Staphylococcus aureus</i> Toksinleri	7
2. 3. Panton-Valentine Lökosidin'in (PVL)	15
2. 3. 1. Panton-Valentine Lökosidin'in (PVL) Tarihi	16
2. 3. 2. Panton-Valentine Lökosidin'in (PVL) Mekanizması	17
2. 4. Prostat Kanseri	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3. 1. Gereç	22
3. 1. 1. Cihazlar	22
3. 1. 2. Kullanılan Malzemeler	24
3. 1. 3. Bakteri Suşları ve Plazmidler	26
3. 2. Yöntem	27
3. 2. 1. Deneysel Çalışma	27

3. 2. 2. Protein Analizi.....	31
3. 2. 3. Hücre Kültürü.....	34
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR.....	56
EKLER	73
BİLİMSEL ETİK BEYANI	74
ÖZ GEÇMİŞ.....	75



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AML : Akut Miyeloid Lösemi

CTCL : Kutanöz T Hücreli Lenfoma

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP : Deoksiribonukleazid Trifosfat

FBS : Fetal Bovine Serum

Gr : Gram

IPTG : İzopropiltiogalaktozidaz

L : Litre

M : Molar

mL : mililitre

mM : milimolar

MRSA: Mentisilin Dirençli *S. aureus*

NCBI : National Center For Biotechnology Information

NCIC : National Cancer Information Center

PBS : Fosfat Buffer Salin

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PMN : Polimorfonükleer Lökosit

PSA : Prostat Spesifik Antijen

PVL : Panton-Valentine Lökosidin

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

μL : Mikro Litre

WHO : World Health Organization



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Rekombinant DNA Aşamaları	3
Şekil 2. <i>S. aureus</i> 'un mikroskop görüntüsü	5
Şekil 3. <i>S. aureus</i> ' un hücre duvar yapısı	6
Şekil 4. Süperantijenlerin mekanizması	8
Şekil 5. Hemolysin- α (Hla) etki mekanizması	10
Şekil 6. Lökotoksinlerin etki mekanizması	12
Şekil 7. Fenolde çözünür modüller için por oluşum mekanizması modeli	15
Şekil 8. PVL'nin doku nekroz modeli	18
Şekil 9. PVL'nin apoptoz mekanizması.....	19
Şekil 10. Dünya çapında 2020 yılına ait kanser verileri.....	20
Şekil 11. 2020 yılına ait dünya çapında erkeklerde kanser türlerinin görülme sıklığı.....	21
Şekil 13. rPVL'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranının grafiği	48
Şekil 14. LukS-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranının grafiği.....	49
Şekil 15. LukF-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranının grafiği.....	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. National Center For Biotechnology Information (NCBI)'in genbank sitesi uygun şekilde primer dizaynı	36
Resim 2. <i>Staphylococcus aureus</i> suşlarında Panton-Valentine Lökositin (PVL) genlerinin varlığının araştırması	37
Resim 3. pET30a(+) plazmidinin jel elektroforez görüntüsü.	38
Resim 4. Transformasyondan sonra kanamisinli besiyerinde oluşan koloniler.	39
Resim 5. Rekombinant elde edilen kolonilerin PCR sonuçları.	40
Resim 6. rPVL'nin sekans sonucunun değerlendirilmesi	41
Resim 7. LukS-PV' nin sekans sonucunun değerlendirilmesi.....	41
Resim 8. LukF-PV 'nin sekans sonucunun değerlendirilmesi.....	42
Resim 9. rPVL'nin SDS PAGE jel görüntüsü	43
Resim 10. LukS-PV'nin SDS PAGE jel görüntüsü.	43
Resim 11. LukF-PV'nin SDS PAGE jel görüntüsü	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>S. aureus</i> ' un taksonomik sınıflandırılması	5
Tablo 2. Lökositlerin alt birimleri ve özgü olduğu hücre tipleri	12
Tablo 3. PCR Reaksiyonun hazırlanma oranları.....	28
Tablo 4. PCR reaksiyonunun aşamaları.....	28
Tablo 5. Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu için gerekli miktarlar	29
Tablo 6. %8 Seperasyon jeli için gerekli malzeme ve miktarları	32
Tablo 7. %8 Stacking jeli için gerekli malzeme ve miktarları	33
Tablo 8. Raw264.7 hücre hattına rPVL uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	45
Tablo 9. Raw264.7 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	45
Tablo 10. Raw264.7 hücre hattına LukF-PV uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	45
Tablo 11. RWP-1 hücre hattına rPVL uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	46
Tablo 12. RWP-1 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	46
Tablo 13. RWP-1 hücre hattına LukF-PV uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	46
Tablo 14. PC3 hücre hattına rPVL uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü.....	47
Tablo 15. PC3 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	47
Tablo 16. PC3 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD ₄₅₀ ölçümü	47
Tablo 17. rPVL'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranı	48
Tablo 18. LukS-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranı	49
Tablo 19. LukF-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranı	50

ÖZET

PANTON VALENTİNE LÖKOSİDİN (PVL) TOKSİNİNİN REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Yiğit R. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler
Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.**

Amaç: Bu çalışmanın amacı sitotoksik etkisi olan Panton-Valentine lökositini (PVL) rekombinant olarak üretmek ve prostat kanser hücre hattı üzerinde etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak NCBI (CP084892) tüm genom sekans dizisine göre PVL, LukS-PV ve LukF-PV gen bölgelerini içeren primerler tasarlandı ve çoğaltılan genler pET30a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı. Sekans analizi ile doğrulanan klonlar rekombinant protein eldesi için kullanıldı. Sentezlenen proteinler saflaştırılarak makrofaj üzerindeki etkisi araştırıldı. Daha sonra normal prostat hücre hattı (RWP-1) ve prostat adenokarsinom hücre hattı (PC3) üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 testi ile ölçüm yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

Bulgular: Rekombinant LukS-PV ve LukF-PV tek başlarına ve birlikte elde edildi. Daha sonra elde edilen proteinlerin makrofaj üzerinde etkisine bakıldığında rPVL ve LukS-PV'nin etkili olduğu ancak LukF-PV'nin etkisi olmadığı görüldü. Aynı şekilde prostat normal hücre hattına (RWP-1) ve adenokarsinom hücre hattına (PC3) uygulandığında, elde edilen rekombinant ürünlerin iki hücre hattına da etkisinin olmadığı görüldü.

Sonuç: Panton Valentine Lökositin'in makrofaj hücre hattına sitotoksik etkisi varken prostat normal hücre hattı (RWP-1) ve adenokarsinom hücre hattı (PC3) üzerinde etkisi saptanamamıştır.

Anahtar kelimeler: Hücre Hattı, Prostat Kanseri, Panton-Valentine Lökositini, Rekombinant

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF RECOMBINANT PANTON VALENTINE LÖKOSİDİN (PVL) TOXIN ON PROSTATE CANCER CELL LINE

Yiğit R. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Molecular Biotechnology Program, Master Thesis, Aydın, 2022.

Objective: The aim of this study is to generate the cytotoxic Panton-Valentine lökosidine (PVL) using recombinant technology and to examine its effect on the prostate cancer cell line.

Materials and Methods: Primers to amplify LukS-PV and LukF-PV genes separately and together were designed according to genebank (NCBI CP084892), Amplified fragments were cloned into the pET30a(+) expression vector. Cloned fragments were confirmed by sequence analysis and used to obtain recombinant proteins. The synthesized proteins were purified partially and their effects on macrophages were investigated. Then, the cytotoxic effect of LukS and LukF separately and together were tested on the normal prostate cell line (RWP-1) and prostate adenocarcinoma cell line (PC3). Cytotoxic effects were measured with the WST-1 test and the results were evaluated.

Results: Recombinant LukS-PV and LukF-PV and in combination were obtained. Then, their effects on macrophages were examined, it was seen that rPVL and LukS-PV had cytotoxic effect on macrophage, but LukF-PV had no effect. When applied to prostate normal cell line (RWP-1) and adenocarcinoma cell line (PC3), the recombinant products obtained did not have any cytotoxic effect on either cell line.

Conclusion: Although Panton Valentine Lökosidin had sitotoxic effect on macrophage cell line, no sitotoxic effect was observed on prostate normal cell line (RWP-1) and adenocarcinoma cell line (PC3).

Keywords: Cell Line, Panton-Valentine Lökosidin, Prostate Cancer, Recombinant.

1. GİRİŞ

Rekombinant DNA teknolojisi farklı hücrelere ait genlerin sentezlenmesi için başka hücreye aktarılmasıdır (Berk, 2000). Rekombinant DNA'nın aktarıldığı hücre içindeki replikasyonunu belirten ilk yayın 1972 yılında yapılmıştır (Jankson, 1972). Son yıllarda, moleküler biyolojinin de gelişmesiyle, rekombinant DNA teknolojisi daha da önem kazanmaya başlamıştır. Gen terapisi ve genetik modifikasyonlarda dâhil olmak üzere ciddi hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bazı araştırma sonuçları bakterilerin kanser tedavisinde kullanımlarının umut verici yeni bir strateji olduğunu göstermiştir. Bakteriyel toksinler, hücre döngüsünü, apoptozu ve farklılaşmayı kontrol eden hücresel süreçleri değiştirebilirler (Patyar, 2010).

Kanser erkeklerde kadınlara oranla %25 daha fazla görülmektedir (Ceyhan, 2018). Prostat kanseri, kanser kaynaklı ölümlerde akciğer kanserinden sonra gelen ve erkeklerde en sık görülen ikinci malign tümör tipidir (Williamson, 2013). Hastalık ancak ileri evrelerde belirti gösterir. Metastaz oluşuktan sonra prostat kanserinin tedavisi için kullanılabilecek ilaçlar yetersizdir.

Panton Valentine Lökosidin, bir lökotoksindir ve polimorfonükleer lökositlerde (PMN), por oluşumu yapar (Bu, 2013). PVL iki farklı proteinden oluşur; biri LukS, diğeri ise LukF dir. Bu bileşenler oktameler halinde polimorfonükleer hücrelerde por oluşturur (Liu, 2018). İnsan PMN'lerinde önemli bir sitotoksik role sahip olan PVL'nin düşük konsantrasyonlarda apoptoza ve yüksek konsantrasyonlarda nekroza yol açtığı bulunmuştur (Genestier, 2005). Ayrıca PVL'nin, insan makrofajlarında apoptozu indüklediği bilinmektedir (Wu, 2010).

Bu çalışmanın amacı sitotoksik etkisi olan Panton- Valentine lökositini klonlamak, rekombinant olarak üretmek ve prostat kanser hücre hattı üzerinde etkisini araştırmaktır.

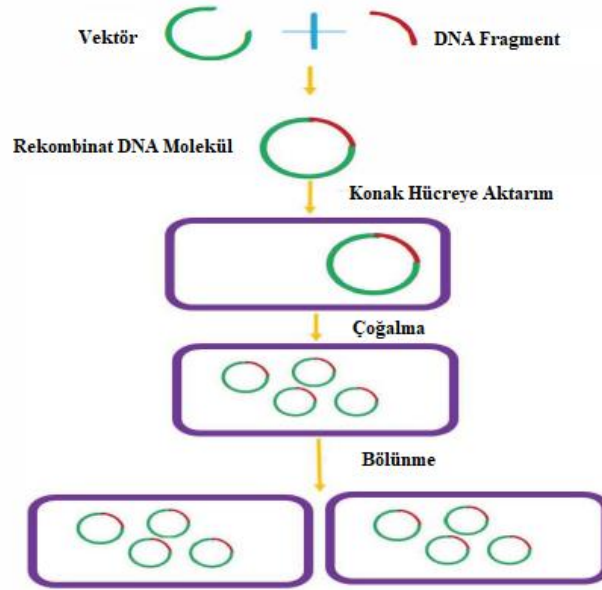
2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Rekombinat DNA Teknolojisi

DNA'nın keşifinden sonra rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı moleküler biyoloji alanında devrim yaratmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi, canlı organizmalarda istenen özellikleri ve ürünleri elde etmek için genetik materyalin değiştirilmesini içeren bir teknolojidir (Khan ve diğerleri, 2016). İstenilen özellikleri organizmaya kazandırma isteği 1960'larda restriksiyon enzimlerinin keşfi, bu fikri yavaş yavaş gerçeğe dönüşmüştür (R. K. Bose, 2022). İlk rekombinant DNA (rDNA) molekülleri 1973 yılında Stanford Üniversitesi ve California San Francisco Üniversitesi'nden Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang ve Stanley Cohen tarafından üretilmiş (Khan ve diğerleri, 2016) ve günümüze kadar gelmiştir. Günümüzde bu teknoloji aşağıdaki bir dizi aşamaları içerir:

- Genetik materyalin izolasyonu
- Vektör DNA ve ilgili genin restriksiyon enzimi ile kesilmesi
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile genin amplifikasyonu
- Ligaz enzimi kullanılarak yabancı gen parçasının vektör ile birleştirilmesi

Yukarıda verilen aşamalar sonucunda rekombinant vektör elde edilir daha sonra rekombinant vektör konak hücreye transformasyon adı verilen bir süreçle sokulur (Higgins ve Cozzarelli, 1979)



Şekil 1. Rekombinant DNA Aşamaları (Ijaz ve Haq, 2019).

2. 2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus ilk tarif edilen patojenlerden biridir ve insanlarda enfeksiyonların en yaygın nedenleri arasındadır. Birçok antibiyotik sınıfına karşı direnci olması tedaviyi zorlaştırır. Özellikle hafif cilt enfeksiyonlarından, yaşamı tehdit eden hastalığa kadar değişen semptomlarla hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların ana nedenlerinden biri olarak kabul edilir (Nejabat ve diğerleri, 2009; Kwiecinski ve diğerleri, 2014). Ayrıca ciddi septik şok sendromuna neden olabilir. Klinik olarak oldukça önemlidir çünkü biyomateriyallere (örneğin ortopedik eklem protezleri, yapay kalp kapakçıkları, damar içi cihazlar) yapışması ve biyofilm oluşturması ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmasıyla da ilgilidir (Figueiredo ve diğerleri, 2017; Oliveira ve diğerleri 2018).

2. 2. 1. Tarihçesi

Louis Pasteur'un 1860 yılında yara enfeksiyonları üzerine yaptığı deneylerden etkilenen Joseph Lister, ameliyat sonrası enfeksiyonları önlemek için denemeler yapmıştır. Daha sonra Alexander Ogston 1880'de, diz eklemindeki cerrahi dokuda oluşan apseden üzüm benzeri bakteri kümelerini gözlemlemiştir ve bunları *Staphylococcus* olarak adlandırmıştır.

Alman hekim Friedrich Julius Rosenbach 1884 yılında organizmaları saf kültürde yetiştirmiş ve onları altın renkli (*S. aureus*) beyaz renkli (*Staphylococcus albus*) olarak renklerine göre ayırmıştır (Licitra, 2013). Daha sonra Alexander Fleming, 1928'de *Staphylococcus aureus* bulunan kültürün kontamine olduğunu görmüş ve bu kültürden *Penicillium notatum*'da penisilini keşfetmiştir (Fleming, 1929). 1939'da Howard Walter Florey ve Ernst Boris Chain (Abraham ve Chain, 1940) başarılı bir şekilde penisilini elde etmişlerdir. Penisilin ilk klinik kullanımından bir yıl önce 1940'ta penisiline dirençli *S. aureus* raporu yayınlanmıştır (Abraham ve Chain, 1940). 1959'da İngiliz ilaç şirketi penisiline dirençli *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonları engellemek için yarı sentetik olan penisilin olan metisilini geliştirmişlerdir. Metisilin geliştirilmesinden 2 yıl sonra metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları saptanmıştır. (Jevons, 1961; Parker ve diğerleri, 1964). 1970'lerin sonlarına doğru MRSA suşlarının çoklu ilaç direnci (MDR) fark edilmiştir (Brumfitt ve diğerleri, 1989; Casewell ve diğerleri, 1986). Vankomisine dirençli *S. aureus*'un (VRSA) ilk klinik izolatu 2002'de, Linezolid dirençli ilk stafilokok vakası ise 2001'de ortaya çıkmıştır (Tsiodras ve diğerleri, 2001). Linezolid dirençli *S. aureus* suşları izole edilmiştir (Ross ve diğerleri, 2011). Antibiyotik keşfedilmeden önce *S. aureus* enfeksiyonundan ölen insanların oranı yüzde 82'ye kadar çıkmıştır (Kahrstrom, 2013). Penisilin enfeksiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmasıyla bu oran oldukça azalsa da günümüzde *S. aureus* izolatlarının >%80 penisiline dirençli hale gelmiştir. Çoklu antibiyotik dirençli suşların yaygınlaşmasıyla *S. aureus* enfeksiyonları dünya çapında yeniden önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

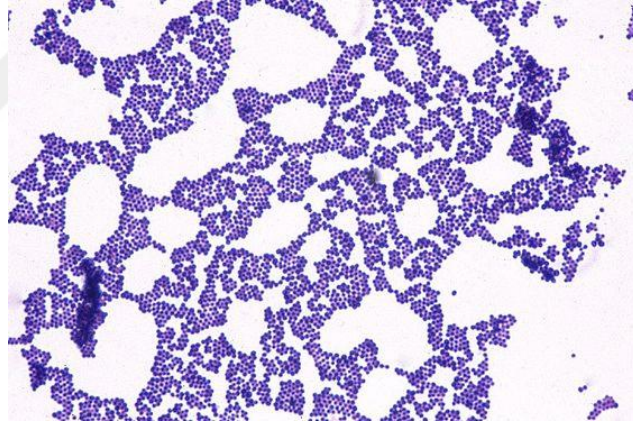
2. 2. 2. Taksonomi

S. aureus, bacteria alemine ait, *Staphylococcus* cinsinde yer alan bir bakteri türüdür. Staphylococcaceae ailesi ne ait en fazla nüfusa sahip olan *Staphylococcus* cinsi 55 tür ve 23 alt tür içermektedir.

Tabl° 1. *S. aureus*' un taksonomik sınıflandırılması (Rosenberg, 2014; Madhaiyan, 2020).

Domain:	Bacteria
Şube:	Firmicutes
Sınıf:	Bacilli
Takım:	Bacillales
Familya:	Staphylococcaceae
Cins:	<i>Staphylococcus</i>
Tür:	<i>S. aureus</i>

2. 2. 3. Morfolojisi

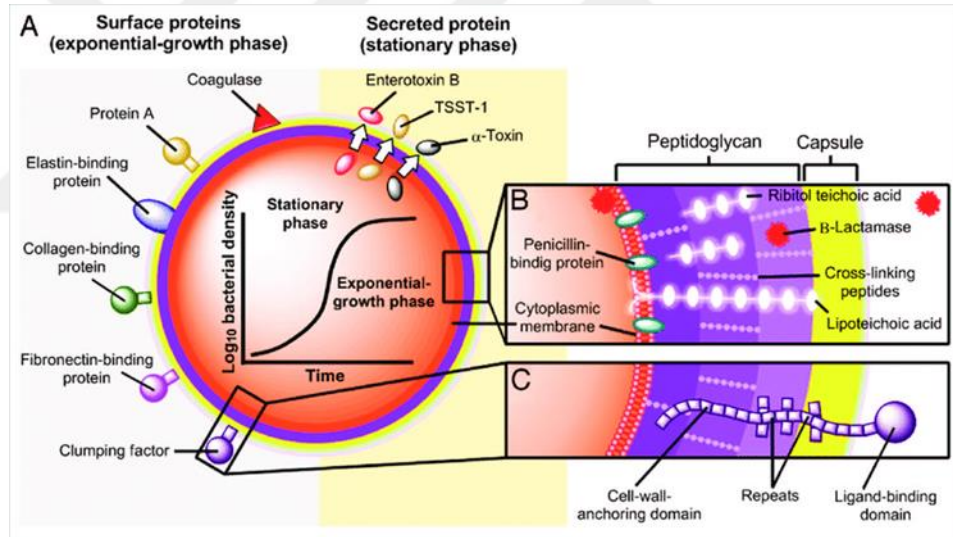


Şekil 2. *S. aureus*'un mikroskop görüntüsü (Taylor ve Unakal, 2021).

Staphylococcus aureus, üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan 1 µm çapında küresel Gram pozitif bakterilerdir. Sirküler bir kromozom sahip olan *S. aureus*'un genomları yaklaşık olarak 2,8 Mbp'dir.(Lowy, 1998). Spor oluşturmazlar ve koloniler genellikle altın veya sarı renktedir. Bu organizmalar 18°C ile 40°C arasındaki sıcaklıklarda aerobik veya anaerobik olarak (fakültatif) büyüeyebilir. Halofilik olmamalarına rağmen %7,5 tuz içeren ortamda bile karşı direnç gösterebilirken %10'luk ortamda hala üreme faaliyeti gösterebilmektedirler. *S. aureus* hemoliz yapma özelliğine sahiptir.

Biyokimyasal tanımlama testleri arasında katalaz pozitif (tüm patojenik *Staphylococcus* türleri), koagülaz pozitif (*Staphylococcus aureus*'u diğer *Staphylococcus* türlerinden ayırt etmek için), novobiocine duyarlı (*Staphylococcus saprophyticus*'tan ayırt etmek) ve mannitol fermantasyonu pozitifdir (*Staphylococcus epidermidis*'ten ayırt etmek için) (Rasigade ve Vandenesch, 2014). Asetoin ve D-Mannitolden, D-Mannozdan, D-Trehalozdan gibi yapılardan asit oluşturma pozitifdir. *S. aureus*' un ayırt edici özelliğinden biri de biyofilm oluşturmalarıdır. Bu bakteriler nem, ısı ve pH gibi değişken çevre koşullarında hayatta kalabilmek için biyofilm oluşturmalar. Çok fazla yüzeyde *S. aureus*'un biyofilmlerini görmek mümkündür (Costerton, 1995). *S. aureus* bakterisine biyofilm 2 avantaj sağlar. Bunlardan birincisi; hayatta kalma oranını arttırmak, ikincisi; *S. aureus*' un konak savunmasından kaçmasına yardımcı olur (Otto, 2013).

2. 2. 4. Hücre Duvar Yapısı



Şekil 3. *S. aureus*' un hücre duvar yapısı (Lowy, 1998).

S. aureus, kalın bir hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarı peptidoglikan yapıdadır ve lipoteikoik asit bağlantısı ile fosfolipid hücre membranına tutunurlar (Shockman ve Barren, 1983). Peptidoglikan hücre duvarının ana bileşimidir ve peptidoglikan monomeri 1,4-β bağlantıya sahip N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit olmak üzere iki şeker birleşenden ve N-asetilmuramik aside bağlı tetrapeptid zincirden oluşur. İki monomerin peptid bölümleri arasında *S. aureus*'a özgü bir pentaglisin köprüsü bulunur.

Peptidoglikana kovalent olarak bağı olan Ribitol teikoik asitler, hücre duvarının ana bileşenleridir. Lipoteikoik asit, sitoplazmik membrana sabitlenmiş bir glikolipid terminaline bağı bir gliserol fosfat polimeridir. Birlikte, bu iki hücre duvarı bileşeni ağırlığın % 90'ını oluşturur, geri kalan %10'unu yüzey proteinleri, ekzoproteinler ve otolizinlerden oluşur (Harris ve diğeri, 2002). Teikoik asitler stafilokok hücre yüzeyine negatif yük verir ve metal iyonlarının elde edilmesinde ve lokalizasyonunda rol oynar (Knox ve Wicken, 1973).

2. 2. 5. Virulans Faktörleri

S. aureus, çeşitli direnç mekanizmalarına ve virülans faktörlerine sahiptir ve konak hücrenin doğal savunmasından kaçınmasını sağlar. Bu mikroorganizma tarafından üretilen çoklu virülans faktörleri arasında toksinleri, enzimleri ve hücre yüzeyi ile ilişkili antijenleri numaralandırmak mümkündür (Oliveira ve arkadaşları, 2018).

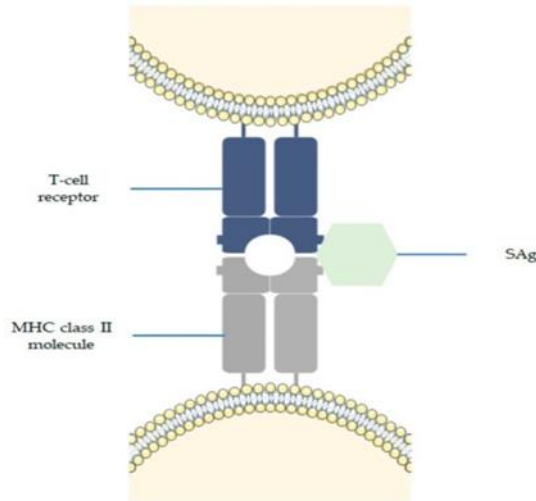
2. 2. 6. *Staphylococcus aureus* Toksinleri

S. aureus toksinleri üç ana gruba ayrılabilir: Ana *S. aureus* toksinleri, süperantijenler (SAg'ler), eksfoliyatif toksinler (ET'ler) ve por oluşturan toksinler (PFT'ler) olmak üzere üç ana gruba ayrılabilir. Por oluşturan toksinler ayrıca dört tipe ayrılabilir: Hemolysin- α (Hla veya α -toksin), Hemolysin- β , lökotoxinler ve fenolde çözünen modüller (PSM'ler) dir (Grumann ve diğeri, 2014). Bu toksinler, çok farklı mekanizmaya sahiptir ve bu mekanizmanın anlaşılması, stafilokok enfeksiyonlarının daha iyi kontrol edilmesini sağlayacaktır. *S. aureus* toksinleri toksik şok sendromu (TSS), stafilokok haşlanmış cilt sendromu (SSSS), nekrotizan pnömoni veya cilt enfeksiyonları (Dinges ve diğeri, 2000; Holtfreter ve Bröcker, 2005; Jarraud ve diğeri, 1999, 2002; Ladhani, 2003) gibi bazı hastalıklarla ilgilidir. Toksinler, hücreler arası bağlantıları bozarak veya bağışıklık tepkilerini modüle ederek konağın hücre zarlarına zarar verebilir (Grumann ve diğeri, 2014).

2. 2. 6. 1. Süperantijenler (SAg)

İlk başlarda süperantijenler (SAG'ler), kusma ve ishal gibi *S. aureus*'un gıda zehirlenmesine özgü semptomlara neden oldukları için stafilocokal enterotoksinler (SE'ler) olarak adlandırılmıştır (Grumann ve diğerleri, 2014). Ancak, bu gruba ait en son tanımlanmış toksinlerin bazıları bu özellikleri göstermediğinden, 2004 yılında SAg diye adlandırılmıştır. 23'ten fazla stafilokok SAg toksini vardır (Grumann ve diğerleri, 2014, 2011; Lina ve diğerleri, 2004; Ono ve diğerleri, 2008; Proft ve Fraser, 2003; Wilson ve diğerleri 2011). SAg'lerin etki mekanizması ilk olarak 1988'de Bernhard Fleischer ve Hubert Schrezenmeier tarafından tanımlanmıştır. Salınan SAg'ler hareket eder ve T hücrelerinin proinflamatuvar sitokin (IL-2, IFN- γ ve TNF) üretmesi için tetikler. Böylece semptomların (örn: yüksek ateş, döküntü, deskuamasyon) ortaya çıkmasına neden olur bu semptomlar sonucunda kusma, ishal, hipotansiyon ve sıklıkla çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanabilir (Bergdoll ve diğerleri, 1981; McCormick ve diğerleri, 2001). Böylece yüksek miktarda sitokin üretiminden sonra, T hücrelerinin çoğalamadığı, IL-2 salgılayamadığı veya hücre ölümüne T hücrelerinin yanıt vermez (Rellahan, 1990; Alderson, 1995). Bu, SAg'lerin güçlü immünojenler olduğunu, antikor tepkisini ortaya çıkardığını ve nötralize ettiğini gösterir.

2. 2. 6. 2. Eksfoliyatif Toksinler (ET'ler)



Şekil 4 Süperantijenlerin mekanizması (Oliveira ve diğerleri, 2018).

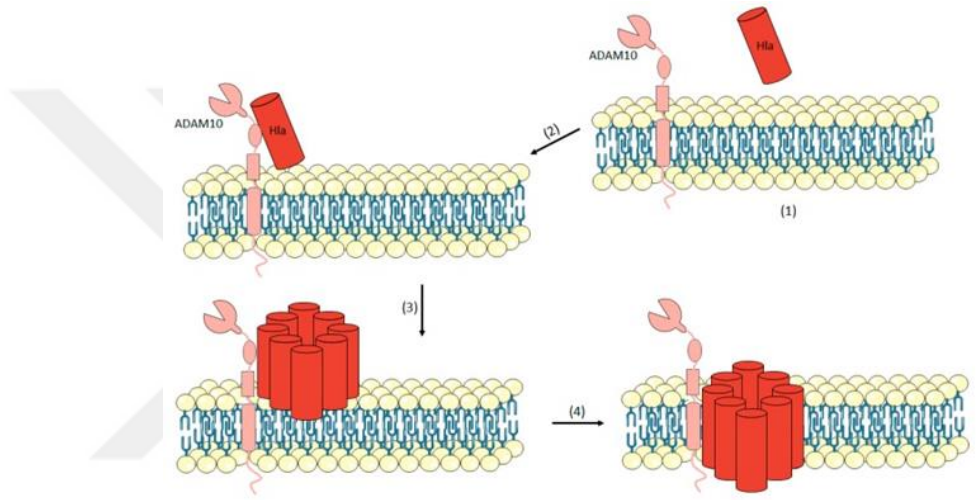
Von Rittershain 1878'de, yenidoğanların epidermal üzerinde oluşan pul pul dökülmenin klinik özelliklerini tanımladı. Lyell 1967'de *S. aureus* ile pul pul dökülme arasındaki ilişki (Lyell, 1967) keşfedilmiştir. 1972 yılında Melish ve arkadaşları, daha önce Lyell tarafından önerilen varsayımsal bir toksinin varlığını keşfetti ve bu toksinlerin (deney modelleri olarak kullanılan) yeni doğan farelerde patojenik rolünü gösterdi (Melish ve diğerleri, 1972). Epidermolitik toksinler olarak da bilinen eksfoliyatif toksinler (ET'ler), *S. aureus* tarafından salgılanan son derece spesifik serin proteazlardır. Bu proteazlar, derinin yüzeysel katmanlarındaki desmoglein-1'i tanırlar ve hücreler arası bağ oluşturan bu proteini parçalarlar (Mariutti ve diğerleri, 2017; Bukowski ve diğerleri, 2010). Deride soyulma ve kabarcık oluşumuna neden olabilen ekzotoksinlerdir (Nishifuji ve diğerleri, 2008; Amagai ve diğerleri, 2002; Melish ve Glasgow, 1971). Şimdiye kadar bilinen, eksfoliyatif toksin A/B/C/D'dir (ETA, ETB, ETC, ETD). ETA ve ETB, insan derisi hasarında, ETC ise yalnızca bir at enfeksiyonundan izole edilmiş ve insan hastalığı ile hiçbir ilişki bulunamamıştır (Lee ve diğerleri, 1987). ETD sadece 2002 yılında *S. aureus*'un klinik bir örneğinde tanımlanmıştır. *S. aureus* suşlarının yaklaşık %5'i tarafından üretilir, ETA en yaygın olarak Avrupa, Afrika ve Amerika'da ve ETB Japonya'da daha yaygındır (Ladhani, 2001). Bazı *S. aureus* suşlarında ET'lerin üretimi, epidermal enfeksiyonlar ve SSSS gibi genelleştirilmiş hastalıklar ile ilişkilidir (Mariutti ve diğerleri, 2017). SSSS, ciltte pul pul dökülme ile karakterize bir sendromdur, bu sendrom esas olarak bebekler ve çocuklarda görülmektedir (Ladhani, 2003; Bukowski ve diğerleri, 2010). Ancak bu sendrom yetişkinlerde, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olanlarda %59'luk bir ölüm oranına sahiptir (Popov ve diğerleri, 2014).

2. 2. 6. 3. Por Oluşturan Toksinler

Hemolizin- α (Hla veya α -Toksin)

Hla, klinik *S. aureus* suşlarının %95'i tarafından salgılanan 33 kDa polipeptittir (Honeyman ve diğerleri, 2006; Grumann ve diğerleri, 2014). Hla, suda çözünen bir monomer olarak salgılanan bir beta-barrel oluşturan toksindir. Hla hedef hücrelerine bağlandığında, por oluşturmada önce oligomer yapı oluşturur ve beta barrel yapısı lipid çift tabakasında transmembran kanalı oluşturmak için hücre zarına saldırır (Seilie ve Wardenburg, 2017).

Bu toksin, küçük beta-barrellik por oluşturan sitotoksin (PT'ler) sınıfının ilk örneğidir (Bhakdi ve diğerleri, 1991; Van der Goot, 2001; Prévost ve diğerleri, 2006; Parker ve Feil, 2005). Son çalışmalar hücre çoğalması, inflamatuvar yanıtlar, sitokin salgılanması ve hücre-hücre etkileşimlerini içeren hücre sinyal yollarının değiştirilmesinin önemini göstermiştir (Song ve diğerleri, 1996; Gouaux ve diğerleri, 1994). Bu toksin epitel hücreleri, endotel hücreleri, T hücreleri, monositler ve makrofajlar dahil olmak üzere çok çeşitli insan hücre tiplerini etkilemektedir (Bhakdi ve Tranum, 1991; Powers ve diğerleri, 2012; Hildebrand ve diğerleri, 1991; Berube ve Wardenburg, 2013; Wardenburg ve diğerleri, 2007; Nygaard ve diğerleri, 2012; Manohar ve diğerleri, 1967; Bhakdi ve diğerleri, 1988).



Şekil 5. Hemolysin- α (Hla) etki mekanizması (Oliveira ve diğerleri, 2018).

Hla monomer olarak salgılanır (Gorwitz ve diğerleri, 2008). Hla, α toksini için hücresel reseptör olan transmembran proteini ADAM10'a bağlanır (Mainous, 2006). Daha sonra toksin plazma zarında bir heptamer haline gelir ve bir ön por oluşur (Tong ve diğerleri, 2015) ve sonunda transmembran kanalının oluşumu gerçekleşir (Howden ve diğerleri, 2010; Oliveira ve diğerleri, 2018).

Hemolizin-β (Sfingomyelinaz C)

Hemolizin-β ilk olarak 1935 yılında Glenni ve Stevens tarafından tanımlanmış ve gen *hly* dizisi 1989 yılında Projan ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Glenni ve Stevens, 1935; Projan ve diğerleri, 1989). Bu toksinin koyunlardaki eritrositlere karşı yüksek hemolitik olsada, tavşanlarda değildir. Eritrositlere duyarlılık farkı, hücrelerin farklı Sfingomyelin içeriğinden kaynaklanabilir (Doery ve diğerleri, 1965). Sfingomyelinazlar, ökaryotik membranda en bol bulunan sfingolipid olan sfingomyelinleri parçalayan fosfodiester hidrolazlardır (Flores ve diğerleri, 2016). Bu toksinin hastalıktaki rolü net olarak anlaşılamamıştır. Bu toksin, sığır mastitisinden (Aarestrup ve diğerleri, 1999) ve insan derisi kronik enfeksiyonlarından izole edilen suşlarda büyük miktarlarda üretilmektedir (Katayama ve diğerleri, 2013). β-hemolizin, insan keratinositlerine, polimorfonuklear lökositlere, monositlere ve T lenfositlerine karşı sitotoksiktir ve endotel hücreleri tarafından interlökin-8 (IL-8) ekspresyonunu inhibe eder. Bunlar *S. aureus*'un fagozomal kaçışına ve biyofilm oluşumunun indüksiyona katkıda bulunabilir (Tajima ve diğerleri, 2009; Huseby ve diğerleri, 2010, 2007; Walev ve diğerleri, 1996).

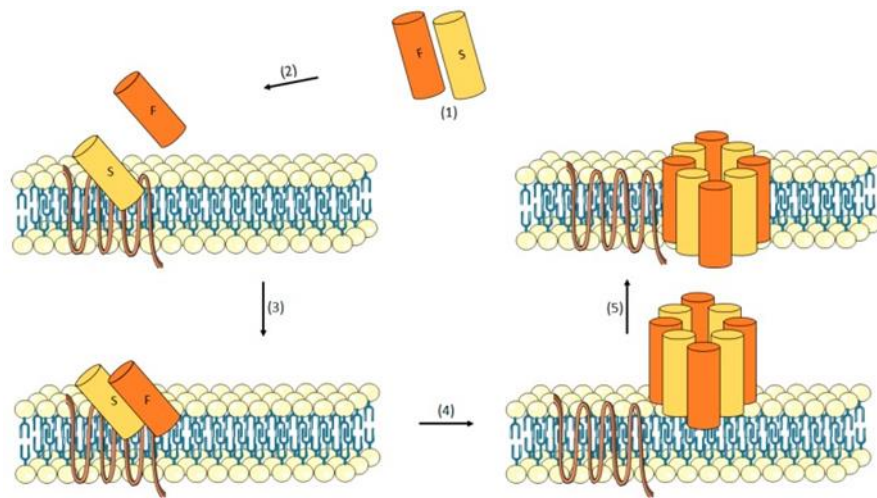
Lökotoksin

Lökotoksinler, por oluşturmak için bir araya gelen iki farklı protein bileşeninden oluşur (Yamashita ve diğerleri, 2011; Aman ve diğerleri, 2010). Dört alt gruba ayrılır: Gama (γ)-Hemolin (HlgA, HlgC, HlgB), Lökotoksin ED (LukE, LukD), Lökotoksin AB/GH (LukAB/LukGH) ve Panton-Valentine Lökosidin (PVL)dir (Yoong ve Torres, 2013).

Tablo 2. Lökositlerin alt birimleri ve özgü olduğu hücre tipleri

Lökotoksin	S Alt Birliği	F Alt Birliği	Hücre Özgüllüğü
PVL	Luks-PV	Lukf-PV	Lökositler ve nötrofiller
LukAB / LukGH	Luka/LukH	LukB/LukG	İnsan monositleri, dendritik hücreler, nötrofiller ve lökositler
LukED	Luke	LukD	Tavşan kan hücreleri ve lökositler, insan nötrofilleri ve fare fagositleri
c-Hemolizin	HlgA, HlgC	HlgB	İnsan kırmızı kan hücreleri, nötrofiller ve insan ve tavşan lökositleri

Por oluşturan bu toksinler "S" ve "F" olarak sınıflandırılan iki farklı protein bileşeninden oluşur. S bileşeni hücrel reseptörlere bağlanır (Yamashita ve diğerleri, 2011; Aman ve diğerleri, 2010; Yoong ve Torres, 2013). F-bileşenleri ile dimerizasyona izin veren bir konformasyonel değişikliğe uğrar ve por oluşturmak için bir oligomerizasyon meydana gelir (Spaan ve diğerleri, 2015). Bu iki bileşenli toksinlerin hücre zarı ile por oluşum mekanizması aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 6 . Lökotoksinlerin etki mekanizması (Oliveira ve diğerleri, 2018).

γ-Hemolizin (HlgAB/HlgCB)

HlgAB 1938'de tanımlanmıştır, ancak biyolojik ve biyokimyasal işlevleri 1970'lerin sonunda bulunmuştur (Smith ve diğerleri, 1938; Guyonnet ve Plommet, 1970). *γ*-Hemolizin grubu içinde, HlgAB, HlgCB veya HlgACB, farklı alt birim kombinasyonlarına sahip üç proteindir. HlgAB ve HlgCB, aynı F alt birimini (HlgB) paylaşır, ancak S alt birimi (HlgA veya HlgC) farklıdır (Yoong ve Torres, 2013; Kamio ve diğerleri, 1993). HlgA (32 kDa) ve HlgC (32 kDa) sadece HlgB (36 kDa) ile birleştirildiğinde litik aktivite sergiler (Cooney ve diğerleri, 1993). HlgAB, insan kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasında etkilidir ve insan ve tavşan lökositlerine karşı sitolitik aktivite sergiler (Prévost ve diğerleri, 1995; Spaan ve diğerleri, 2015; Fackrell ve Wiseman, 1976). Buna karşılık, HlgCB kırmızı kan hücrelerine karşı sınırlı aktivite sergiler. HlgAB'nin, muhtemelen makrofaj kaçırma ve eritrositlerden besin (Fe 2+) salınımı yoluyla kan dolaşımı enfeksiyonu sırasında *S. aureus*'un hayatta kalması ve çoğalması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Spaan ve diğerleri, 2015; Spaan ve diğerleri, 2014).

LukED

LukED, tavşan kan hücrelerine ve lökositlere karşı sitolitik aktivitesini göstermiştir, ancak sonraki çalışmalar bu toksinin fare fagositlerini yüksek verimlilikle öldürebilen tek toksin olduğunu göstermektedir (Seilie ve Wardenburg 2017; Alonzo ve diğerleri, 2012, 2013). Dünyadaki MRSA suşlarında %88-99'unda izole edilmiştir ve bu toksinin *S. aureus* patojenitesi için potansiyel katkısını düşündürmektedir (Yoong ve Torres, 2013; Morinaga ve diğerleri, 2003; Liu ve diğerleri, 2018; Vandenesch ve diğerleri, 2003).

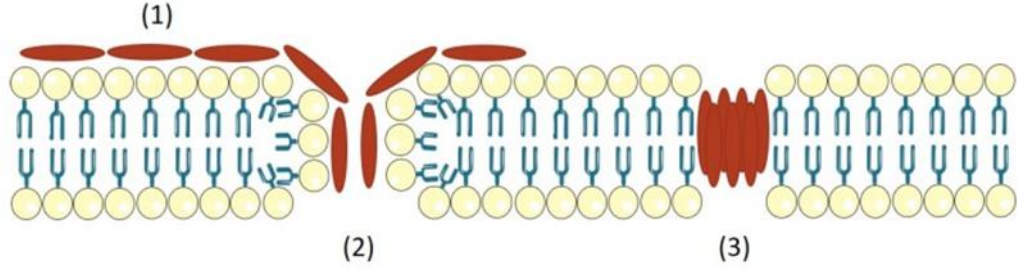
LukAB/GH

LukAB (LukGH olarak da bilinir), lökotoxin grubu içinde keşfedilen en son toksindir (Ventura ve diğerleri, 2010; Dumont ve diğerleri, 2011). Öte yandan, *in vitro* çalışmalar LukAB/GH'nin monositleri, dendritik hücreleri ve lökositleri hedeflediğini ve birlikte eksprese edildiğinde Panton-Valentine lökositin (PVL) ile işbirliği yapabileceğini bildirmiştir (Shukla ve diğerleri, 2010; Dumont ve diğerleri, 2011; Melehanı ve diğerleri, 2015). Bu iki bileşenli lökotoxin, fagositler ve nötrofillerden kaçmada rol oynadığı için *S. aureus*'un hayatta kalmasını arttırdığı bilinmektedir (Dumont ve diğerleri, 2011; Dumont ve diğerleri, 2013). Hücre yüzeyine bağlandıktan sonra oligomerize olan monomerler olarak salgılanan diğer lökotoxinlerin aksine, LukAB/GH hücre yüzeyi reseptörüne bağlanmadan önce heterodimerize olur. Bu, LukAB/GH dimerizasyonunun salgılamadan önce meydana geldiğini düşündürür, çünkü alt birimlerin birlikte ifadesi, ayrı ayrı saflaştırılmış alt birimlerin karışımından daha toksik görünmektedir (Dumont ve diğerleri, 2013; Badarau ve diğerleri, 2015).

Fenolde Çözünür Modüller

Fenolde çözünür modüller (PSM'ler) 1999 yılında Mehlin ve diğerleri tarafından *S. epidermidis* kültüründe keşfedilmiştir (Mehlin ve diğerleri, 1999). Bu çalışmada, PSM α , PSM β ve PSM γ olmak üzere üç peptit tanımlandı (Yoshida, 1963; Wang ve diğerleri, 2007). PSM γ , *S. epidermidis* δ -toksin ile aynı olduğu için δ -toksin olarak da adlandırılır (McKevitt ve diğerleri, 1990). *S. aureus*'ta, PSM'ler genomda üç farklı lokasyonda kodlanmıştır (Wang ve diğerleri, 2007). PSM α peptidleri (PSM α 1-PSM α 4), *psm α* operonunda kodlanır; PSM β (PSM β 1, PSM β 2), *psm β* operonunda kodlanır; δ -toksin RNAIII (Peschel ve Otto, 2013) kodlama dizisi içinde kodlanır. PSM'lerin sitoplazmik membrana spesifik olmayan bir şekilde bağlandığına ve bunun da membran parçalanmasına yol açabileceğine inanılmaktadır. Fosfolipid bileşiminin ve zar yükünün, hücrenin PSM'lere duyarlılığı için önemli olduğu düşünülmüştür (Otto, 2014). PSM α pozitif yüklüdür ve PSM β negatif yüklüdür, δ -toksin ise nötrdür (Peschel ve Otto, 2013). Wang ve arkadaşları, PSM α peptitlerinin, toplumla ilişkili MRSA'nın cilt enfeksiyonuna ve bakteriyemiye neden olma yeteneği üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Wang ve diğerleri, 2007).

SM'lerin üretimini, insan nötrofillerini parçalama ve inflamatuvar yanıtları uyarma yeteneklerinden dolayı, stafilokok türlerinin istilacı enfeksiyonlara neden olma kapasitesi ile yüksek oranda ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Wang ve diğerleri, 2007; Rautenberg ve diğerleri, 2011).



Şekil 7. Fenolde çözünür modüllerin için por oluşum mekanizması modeli (Oliveira ve diğerleri, 2018).

PSM'ler sitoplazmik membrana spesifik olmayan bir şekilde bağlanır (Gorwitz ve diğerleri, 2008). Bu membran parçalanmasına (Mainous, 2006) yol açabilir. PSM'ler, oligomerlerde toplanma ve kısa ömürlü bir por oluşturma eğilimindedir (Tong ve diğerleri, 2015).

2. 3. Panton-Valentine Lökositidin'in (PVL)

S. aureus virülans faktörlerinin önemli bir grubu, lökositidinler olarak da bilinen iki bileşenli por oluşturan toksinlerdir. Por oluşturan bu toksinler, hücre zarında ifade edilen spesifik reseptörlerle etkileşime girerek bağışıklık sisteminin belirli hücrelerini hedef alırlar. Toplum kökenli MRSA suşlarının yayılmasına ve artan virülansına katkıda bulunan önemli bir faktör olarak iki bileşenli toksinlerden biri olan Panton-Valentine Lökositidin'dir.

2. 3. 1. Panton-Valentine Lökositidin'in (PVL) Tarihi

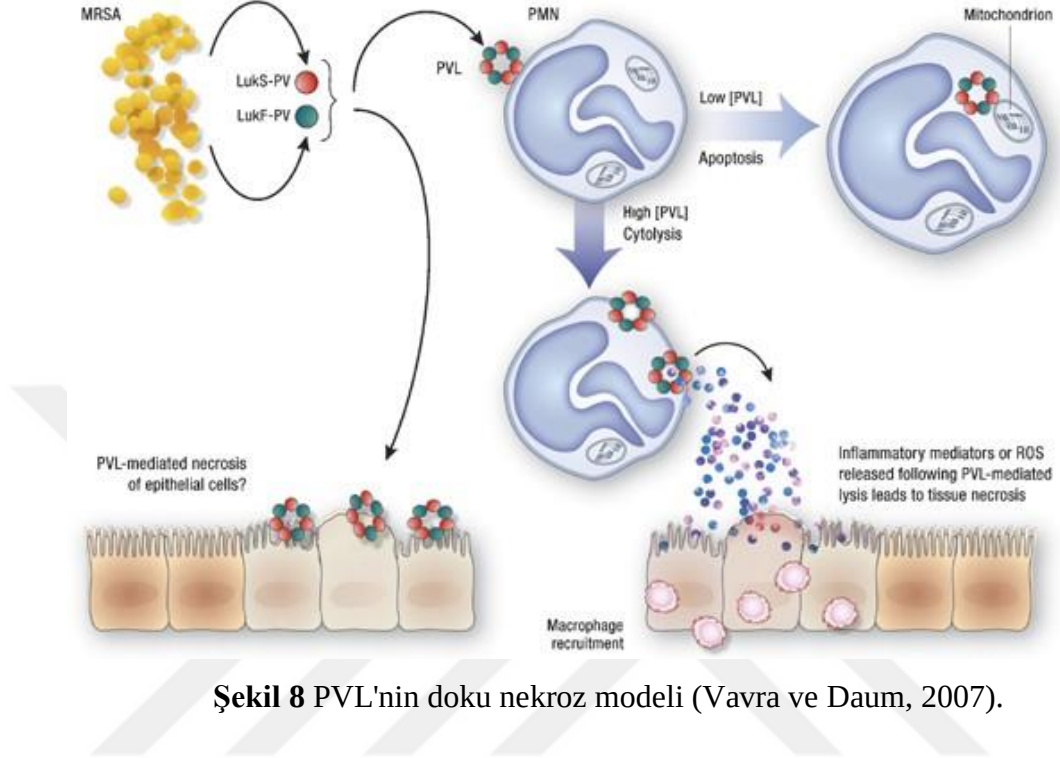
S. aureus ait lökasitler ile ilgili çalışmaların 110 yılı aşkın bir geçmişi vardır. 1894'te Van de Velde, *S. aureus*'un tavşan lökositleri üzerindeki lökosidal aktivitesini gösteren ilk çalışmaları yayınlamıştır (Van de Velde, 1894; Denys ve Van de Velde, 1895). Bu lökotoksik maddeye "lökositidin" adı verilmiştir. O yıllarda lökasidinin bileşimi bilinmediği için lökosidinin yeni salgılanan bir maddemi yoksa hemolizinin ikinci bir etkisi mi bilinmemiştir. Van de Velde'nin lökosidal aktivite tanımlamak için yaptığı deneylerde bu aktivitenin lökosidinden mi yoksa bakteri kültüründeki karmaşık ortamda bulunan diğer toksik moleküller tarafından olup olmadığı bulunamamıştır. Daha sonra Denys ve Van de Velde, tavşanların lökosidine karşı antikor üretebildiğini de göstermiştir (Denys ve Van de Velde, 1895). 1900'lerin başında Neisser ve Wechsberg, *S. aureus*'un lökosidal ve hemolitik aktivitelerinin bağımsız toksik maddelerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için çalışmalar yaparak Van de Velde'nin çalışmalarını takip etmiştir (Neisser ve Wechsberg 1901). 1932'de, Philip Panton ve Francis Valentine, ciddi insan infeksiyonlarından *S. aureus* bakterisini elde etmişler ve toksik yapılarını karşılaştırmışlardır. Bu deney sonucunda, lökosidin ve alfa-hemolizinin birbirine benzemeyen maddeler olduğu doğrulanmıştır. Bazıları güçlü hemolitik aktiviteye sahip ancak lökosidal aktiviteye sahip olmayan ya da hemolitik aktiviteye sahip değilken lökosidal aktiviteye sahip *S. aureus* suşlarını ayrıntılı bir şekilde fenotipik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sayesinde hemolitik ve lökosidal aktivitelerinin iki benzersiz maddeden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Boyle, 2007). 1936 yılında yapılan çalışmalar bu sonucu doğrulamış ve lökosidinin tekrar Panton-Valentine lökosidin (PVL) olarak yeniden adlandırılmıştır. Woodin, PVL'nin "S" veya yavaş (LukS-PV) ve "F" veya hızlı (LukF-PV) olarak adlandırılan iki ayrı protein bileşeninden oluştuğuna dair ilk kanıtı sağlamıştır (Woodin, 1960).

Daha sonra Kamio ve arkadaşları yaptığı çalışmalar ile Panton-Valentine l kasidin genlerinin phiPVL ve phiSLT fajları tarafından taşındığını bulmuşlardır (Narita ve diğerleri, 2001). 2002 yılında Dufour ve arkadaşları MRSA infeksiyonlu hastalarda PVL genlerini bulmuşlardır (Dufour ve diğerleri, 2002). Bu sonuçlar bilim insanların dikkatini çekmeye neden olmuştur ve PVL hala günümüzde araştırılmaya devam edilmektedir. Spaan ve arkadaşları PMN'ler ve makrofajlarda bulunan insan C5a reseptörü 1 (C5aR1) ve ilgili C5aR2'nin (C5aL2) hem LukS-PV'yi bağlayabildiğini hem de porleri kolaylaştırabildiğini bulmuşlardır (Spaan ve diğerleri, 2013). PVL, sadece tavşan ve insan l kositlerini öldürür bunun nedeni ise insan ve tavşan G-proteinine bağlı reseptörlerin (GPCR'ler), C5aR1 ve C5aR2'nin hedeflenmesinden kaynaklandığı bulunmuştur (Spaan ve diğerleri, 2013, 2015).

2. 3. 2. Panton-Valentine Lökosidin'in (PVL) Mekanizması

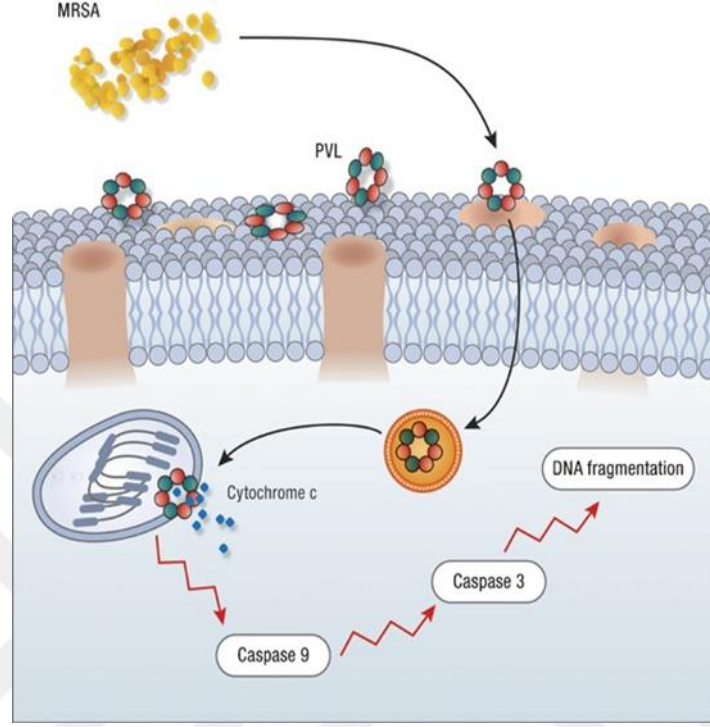
PVL iki alt birimden oluşur bunlardan biri S alt birimleri (31-32 kDa) ve diğer i se F (34-35 kDa) alt birimidir. S alt birimleri LukS-PV diye, F alt birimleri i se LukF-PV şeklinde adlandırılmıştır (Barbançon ve diğerleri, 1991; Spaan ve diğerleri, 2013) PVL'nin iki bileşeni, LukS-PV ve LukF-PV, polimorfonükleer lökosit (PMN) membranları üzerinde heptamer halinde birleşmeden önce salgılanır ve LukS-PV, hücreler  zerindeki C5aR1 tanır ve bağlanır. Daha sonra LukF-PV i le dimerize olur, ardından heptamer bir yapı oluşturmak için LukF-PV ve LukS-PV bileşenleri seri bir şekilde bağlanma gerçekleştirir. S birleşeni bağlandığında protein kinaz (A veya C) LukS-PV'yi fosforile eder ve sonra hücre yüzeyindeki Ca⁺⁺ iyon kanallarının aktive olmasıyla PMN hücreler lizis olur. (Kaneko ve Kamio, 2004). PMN'ler üzerinde yüksek yüksek PVL konsantrasyonu, lizize, düşük PVL konsantrasyonu i se mitokondriyal membrana bağlanarak apoptoza neden olur (Genestier ve Michallet, 2005).

Doku nekrozu, parçalanmış PMN'lerden reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınmasından ya da parçalanmış PMN'lerden granül içeriğinin salınması, inflamatuvar yanıtı harekete geçirir ve doku nekrozu gerçekleşir.



Şekil 8 PVL'nin doku nekroz modeli (Vavra ve Daum, 2007).

Düşük PVL konsantrasyonları, mitokondriyal membran üzerinde PVL por oluşturur ve sitokrom C'nin salınmasına neden olur. Sitokrom C ise kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün indüklenmesine yol açarak hücrede apoptoza neden olur.

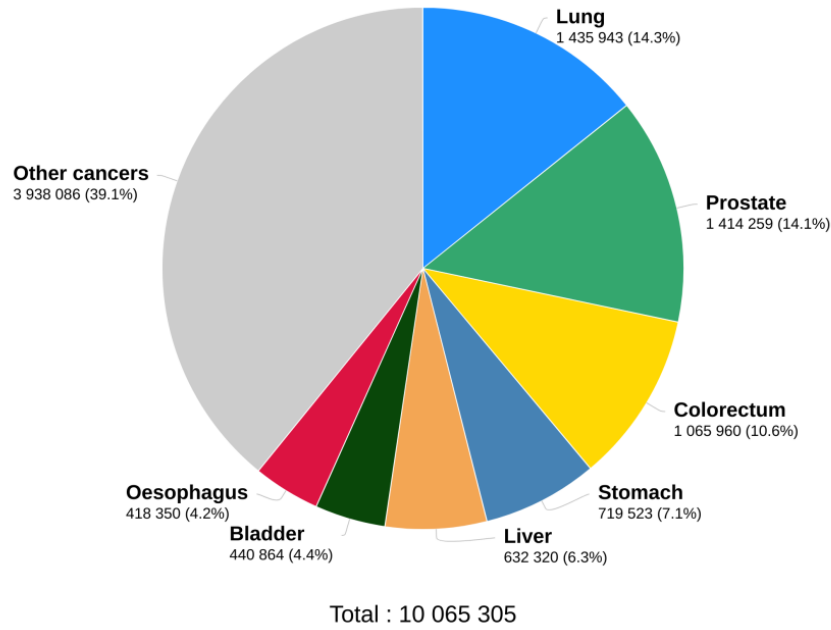


Şekil 9 PVL'nin apoptoz mekanizması (Vavra ve Daum, 2007).

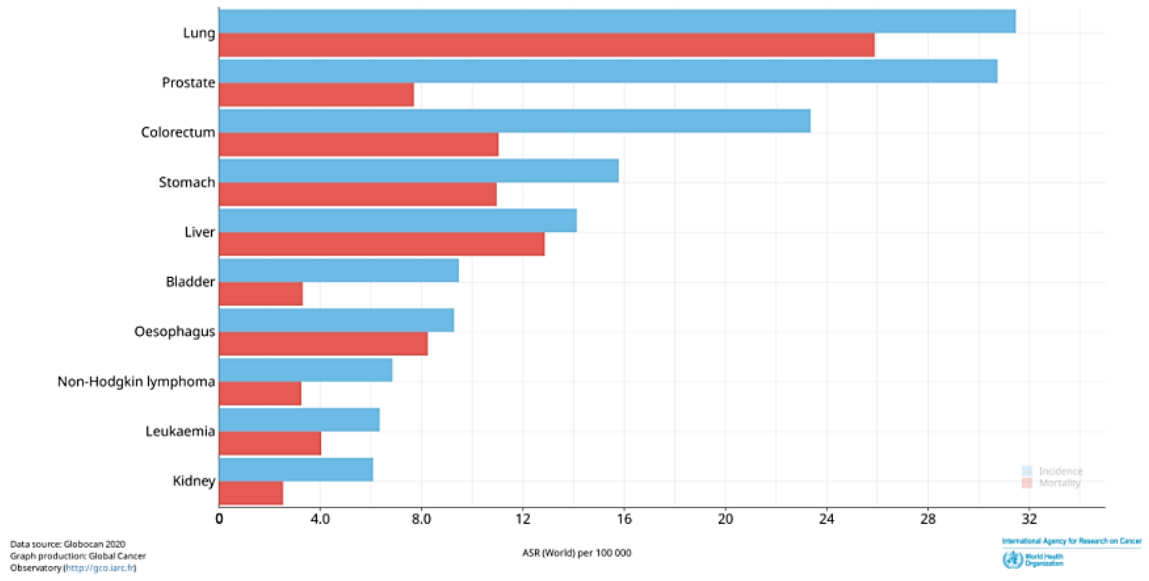
2. 4. Prostat Kanseri

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunda hemen hemen her yerde başlayabilir. Dünyada görülme sıklığı ile kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. 2020 yılında 19,2 milyon insan kanser ile mücadele ettiği ve bunların 9,9 milyonu ise hayatını kaybettiği bilinmektedir (Şekil 12). Yeni vakaların ve ölüm oranlarının erkeklerde, kadınlara göre fazla olduğu bilinmektedir. Şekil 13' de görüldüğü gibi erkeklerde en sık görülen kanserler arasında, akciğer kanserinden sonra prostat kanseri gelmektedir. Prostat kanserinin kesin nedeni belirlenmemiş olsa da, yaygın risk faktörleri arasında yaş, aile öyküsü, ırk (Afrikalı Amerikalı), erkek hormonları, diyabet, obezite, enfeksiyonlardır (National Cancer Information Center, 2015; America Cancer Society, 2010).

En güçlü faktör yaştır ve 50 yaş üstü erkekler genç erkeklere göre daha fazla etkilenir. Birçok kanserde olduğu gibi, prostat kanserinde de kendine özgü erken belirtileri yoktur. Ancak ileri evrede belirtiler ortaya çıkınca kişiler sağlık kuruluşuna başvurmaktadır. Prostat kanserinin erken evresinde, kanser ilerledikçe ortaya çıkma eğilimi gösteren hiçbir semptom görülmez. Tarama, erken aşamada kanseri bulmaya yardımcı olabilir. Ayrıca tarama testi ile saptanan prostat kanseri en etkin şekilde tedavi edilebilmektedir. Prostat kanseri için en yaygın tarama testlerinden ikisi PSA (Prostat Spesifik Antijen) testi ve DRE (Dijital Rektal Muayene)'dir. PSA testi, kandaki prostat bezi tarafından üretilen bir protein olan PSA düzeyini ölçmek içindir ve yüksek bir PSA düzeyi, prostat kanseri riskinin daha yüksek olduğu anlamına gelir. Doktorlar, prostat taraması için yaygın olarak DRE ile birlikte kullanılmaktadır. DRE, normal PSA düzeyine sahip ancak prostat kanserine sahip erkeklerde yüksek oranda bulunabilir. Bu nedenle, düzenli PSA veya DRE testi prostat kanseri daha erken teşhis edilebilir ve prostat kanseri tedavi edilerek ölüm oranları azaltılabilir (NCIC, 2015).



Şekil 10. Dünya çapında 2020 yılına ait kanser verileri (WHO, 2020)



Şekil 11. 2020 yılına ait dünya çapında erkeklerde kanser türlerinin görülme sıklığı (WHO, 2020).

Metastatik prostat kanseri için tedaviler yetersizdir ve yetersiz tedaviler kanser olan erkekler için hala tıbbi sorun olmaya devam etmektedir. Bazı araştırmalar, bakterilerin kanser tedavisinde umut verici yeni bir strateji olduğunu öne sürmüşlerdir ve bakteriyel toksinlerin antitümör aktivitesi son zamanlarda araştırılmıştır. Bakteriyel toksinler, hücre döngüsünü, apoptozu ve farklılaşmayı kontrol eden hücresel süreçleri değiştirir (Patyar ve diğerleri, 2010). Tümörün seçici ölümünü amaçlayan Denileukin diftotox (Duvic ve diğerleri, 2002), *Clostridium perfringens* enterotoksin ST (Michl ve diğerleri, 2001) gibi birçok bakteri toksini kullanılırken (Duvic ve diğerleri, 2002), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tarafından salgılanan lökotoksin (LtxA) AML tedavisinde kullanılmıştır (Kachlany ve diğerleri, 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Gereç

3. 1. 1. Cihazlar

3. 1. 1. 1. Thermal cyclers

PCR reaksiyonu gerçekleştirmek için LONGGENE A300 thermal cyclers kullanıldı ve istenilen gen bölgesi çoğaltıldı.

3. 1. 1. 2. Thermo shaker

Reaksiyonlarda gerekli olan ısı derecesini sağlamak için MSC-100 Thermo Shaker Incubator kullanıldı.

3. 1. 1. 3. Otoklav

Kullanılan besiyerlerini ve kimyasalları sterilizasyon işlemleri Hirayama HV-50L (Japonya) markalı cihaz kullanılarak yapıldı.

3. 1. 1. 4. Santrifüj

Bateri çöktürmek ve DNA izolasyonunda Hettich Microlitre centrifuge MIKRO 200 (Almanya) santrifüj kullanıldı.

3. 1. 1. 5. Etüv

Bakteriyi kültür ortamında büyütebilmek için Memmert Incubator Oven INB200 etüv kullanıldı.

3. 1. 1. 6. Terazı / Hassas Terazı

Çözeltilerin hazırlanmasın gerekli olan miktar KERN ABJ-220-4NM markalı cihaz ile ölçüldü.

3. 1. 1. 7. Elektroforez Cihazı

Elde edilen DNA örneğının boyutuna göre ayırabilmek için Thermo Electron Corporation EC330 electrophoretic gel system kullanıldı.

3. 1. 1. 8. Sonikatör / Homojenizatör

Hücrelerini parçalamak için BANDELİN SONOPULS markalı sonikatör cihazı kullanıldı.

3. 1. 1. 9. pH Metre

Çözeltilerin pH değerlerini ölçmekte HANNA instruments HI2211 PH/ORP Meter marka cihaz kullanıldı.

3. 1. 1. 10. Distile Su Cihazı

Gerekli distile su Sartorius Arium Pro ile sağlandı.

3. 1. 1. 11 Hücre Kültürü Steril Kabin

Hücre steril ortamda ekimi için ESCD classII BSC marka steril kabin kullanıldı

3. 1. 1. 12. CO2 inkübatör

Ekim yapılan hücrelerin büyümesi için uygun ortam ESCO CelCulture CO₂ INCUBATOR cihazı ile sağlandı.

3. 1. 2. Kullanılan Malzemeler

3. 1. 2. 1. Tripton-Kazein Soy Agar

Tripton soya agar (Biokar, Fransa) 12 g hassas terazide tartıldı ve 300 mL distile suda çözüldü. Daha sonra 121⁰C’de 15 dakika otoklavda steril edilip, besiyeri steril petrilere eşit şekilde dağıtıldı. Stokta bulunan bakteri suşlarını aktiveleştirmek için kullanıldı.

3. 1. 2. 2. Tripton-Kazein Soy Broth

Tripton soya broth (Bioka, Fransa) 9 g hassas terazide tartıldı ve 300 mL distile suda çözüldü. Daha sonra 121⁰C’de 15 dakika otoklavda steril edilip sıvı besiyerinde bakteri büyütmek için kullanıldı.

3. 1. 2. 3. EcoRI (10 U/μL) ve HindIII (10 U/μL)

HindIII FastDigest ve EcoRI FastDigest (Thermo Scientific™) enzimleri FastDigest buffer ile birlikte DNA ve plazmitten istenilen gen bölgesini elde etmek için klonlama da kullanıldı.

3. 1. 2. 4. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Stok Solüsyonu

SDS,100g tartıldı ve 1L distile su içinde çözdürölüp pH:6,6 olacak şekilde ayarlandı. SDS jelini hazırlarken kullanıldı.

3. 1. 2. 5. RIPA Buffer Hazırlama

1M Tris-HCl (pH:7,4)’dan 5 mL, 5M NaCl’dan 3 mL, %10 Sodyum Deoksikloatdan 5mL, 0,5M EDTA, NP-40 ve %10 SDS’den 1 mL olacak şekilde karıştırıldı ve üzerine 84 mL distile su ilave edildi.

3. 1. 2. 6. Separasyon Buffer

Tris Base' den 18,25 g tartıldı ve 40 mL distile su içinde çözdürüldü. Ph 8,8'e ayarlanıp ve 50 mL tamamlandı. SDS jeli hazırlarken kullanıldı.

3. 1. 2. 7. Stacking Buffer

Tris Base'den 3 g tartıldı ve 10 mL distile su içinde çözdürüldü. Daha sonra pH 6,8 ayarlanır ve 50 mL' ye tama mlandı. SDS jeli hazırlarken kullanıldı.

3. 1. 2. 8. Sample Buffer

0,6 M Tris-HCl (pH:6,8)'den 5 mL, SDS ve Sükrozdan 5 g, β -merkaptoetanol 25 mL, %0,5 Bromfenol Blue'den 5 mL koyuldu daha sonra son hacim 50 mL'ye tamamlandı. SDS jelini hazırlarken kullanıldı.

3. 1. 2. 9. Running Buffer

Tris Base'den 30,3 g, Glisin 28,8 g ve SDS'den 10 g tartıldı ve 500 mL distile su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra 1L olacak şekilde tamamlandı.

3. 1. 2. 10. Destaining Solüsyonu

Metanol 100 mL, Asetik Asit 100 mL koyuldu ve üzerine 800 mL distile su eklendi. SDS jeli boyama işlemi yapıldıktan sonra jelden boyayı uzaklaştırmada kullanıldı.

3. 1. 2. 11. Coomassie Brilliant Blue Solüsyonu

Coomassie Brilliant Blue' den 0,25 g tartıldı daha sonra üzerine metanol'den 50 mL, Glasiyel Asetik Asit 10 mL ve 40 mL distile su eklenerek hazırlandı.

3. 1. 2. 12. Amonyum Persülfat (APS)

İlk olarak 75 mg APS tartıldı ve üzeri 5 mL Distile su eklendi. SDS jel hazırlanmasında kullanıldı.

3. 1. 2. 13. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base 121,1 g, Borik Asit 61,83 g ve EDTA 5,84 g tartıldı ve 1L distile suda çözdürüldü. Daha sonra 121⁰C’de 15 dakika otoklav edildi. pH 8,0 ayarlanarak buzdolabında saklandı.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE’den 50 mL ölçülüp üzerine 950 mL distile su eklendi.

3. 1. 2. 14. Kanamisin Stok Solüsyonu

İlk olarak 50 mg Kanamisin (Sigma) tartıldı ve üzerine 1 mL distile su eklendi daha sonra karışım çözdürülüp, 0.22 µm por çaplı filtreden süzdürüldü.

3. 1. 2. 15. IPTG (0.1M)

1.2 g IPTG (izopropil-β-D-1 tiyogalakpiranosid) tartıldı ve üzerine 50 mL distile su eklendi. Karışım tamamen çözdürülüp 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirildi ve daha sonra 4°C de saklandı.

3. 1. 3. Bakteri Suşları ve Plazmidler

3. 1. 3. 1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus Saureus suşu REDPROM laboratuvarında bulunan suş koleksiyonundan temin edildi. TSA besiyerine stoktan ekim yapıldı ve 37⁰C’de 1 gece boyunca inkubasyona bırakıldı.

3. 1. 3. 2. BL21 ve Kompetan Hücre

Klonlamada kullanılan pET30a(+) vektörü ve kompetan hücre olan *Escherichia coli* BL21 TSA besiyerine stoktan ekim yapıldı ve 1 gece 37⁰C’de inkübasyona tabi tutuldu. Sıvı kültürü için TSB besiyeri kullanıldı.

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Deneysel Çalışma

3. 2. 1. 1. *Staphylococcus aureus* suşlarında *pvl*, *luks-PV* ve *lukf-PV* genlerin varlığının araştırılması

Bunun için <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> sitesi kullanılarak klonlama için restriksiyon kesim bölgelerini içeren pET30a(+) uygun primerler dizayn edildi. *Staphylococcus aureus* gen varlığı açısından dizayn edilen primerler vasıtasıyla tarandı.

rPVL Forward (EcoRI): 5’-atagaattcaaggaaatgattttatggtc-3’

rPVL Rwers (HindIII): 5’-ataaagcttactatctgtttgctcatagg-3’

LukS-PV Forward (EcoRI): 5’-atagaattcaaggaaatgattttatggtc-3’

LukS-PV Rwers (HindIII): 5’-attaagctttcaattatgtcctttcac-3’

LukF-PV Forward (EcoRI): 5’-attgaattcatgaaaaaatagtaa-3’

LukF-PV Rwers (HindIII): 5’-ataaagcttactatctgtttgctcatagg-3’

3. 2. 1. 2. PCR

1. 2. 1. PCR reaksiyonu hazırlanması

Tablo 3. PCR Reaksiyonun hazırlanma oranları

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

PCR amplifikasyonu tek bir örnek için toplam hacim 50 µl olacak şekilde, 10X Taq enzimi 1X, dNTP 0,2 mM, primer 0,4 pmol, Taq DNA polimerase 0,3 µl/50 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri yukarıdaki tablo 3’de verildi. Kaç tane örnek varsa her malzemedeki miktar hesaplandı ve her bir örnek için ayrı eppendorf tüplerinin içine 50 µL ilave edildi. Eppendorfların içine 2 µL izole edilen DNA koyuldu ve üzerine numara verilerek PCR cihazına koyuldu. Aşağıdaki tablo 4’ de belirtilen süre ve sıcaklıkta reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 4. PCR reaksiyonunun aşamaları

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma	35	50	30 sn
Uzama	35	72	60 sn
Son Uzama	1	72	6 dk

3. 2. 1. 2. 2. pET30a(+) İçeren *E. coli* BL21 Suşundan Plazmid Ekstraksiyonu

İlk olarak pET30a(+), kanamisin (final konsantrasyonu 50 mg/ mL) ve Tryptic Soy Agarb(TSA) içeren besiyerine ekim yapıldı ve bir gece inkübe edildi. Daha sonra 10 mL Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine 50mg/ mL kanamisininden 10 µL koyuldu ve katı besiyerinden tek koloni alınarak ekim yapıldı ve tekrar gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün bu örneklerden GeneDireX Plazmid miniPREP kit (katolog no:NA005-0300) protokolüne uygun olarak plazmid izalasyonu gerçekleştirildi.

3. 2. 1. 2. 3. Restriksiyon

pvl, *luks-pv* ve *lukf-pv* genleri PCR ile çoğaltıldı ve daha sonra GeneFlow PCR Cleanup Kiti (Katolog no: DFC100) ile saflaştırıldı. İzolasyonu yapılan pET30a(+) plazmid DNA'sı ve *pvl*, *luks-pv* ve *lukf-pv* ampliconları EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesildi. Aşağıda tablo 5'de kesim için kullanılan malzemeler verilmiştir. İşlemler iki ayrı eppendorfta gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5. Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu için gerekli miktarlar

pET30 Restriksiyon Enzimleri İle Kesim	Ampliconun Restriksiyon Enzimleri İle Kesim
2µL Fastdigest Enzim Tampon	2µL Fastdigest Enzim Tampon
1µL Restriksiyon Enzimi (EcoRI)	1µL Restriksiyon Enzimi (EcoRI)
1µL Restriksiyon Enzimi (HindIII)	1µL Restriksiyon Enzimi (HindIII)
6µL H ₂ O	6µL H ₂ O
TOPLAM: 20 µL	TOPLAM: 20 µL

2 ayrı tüp 30 dk 37°C inkübe edildi. Daha sonra 5 µL jelde yürütülmek için diğer kalan 15 µL presipitasyon reaksiyonu için ayrıldı. Fenol-kloroform-isoamil alkol protokolü uygulandı. Kalan 15 µl kesilmiş ampliconlara ve plazmide 85 µl distile su eklendi sonra 100 µl Fenol:Kloroform:İzoamilalkol eklenip karıştırıldı. 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst fazlar yeni bir eppendorfa alındı (amplicon ve plazmid birleştirildi). 1/10 volüm 3M Sodyum Asetat (pH:5.2) eklenip sonra üzerine v/v isopropanol eklenerek karıştırıldı. 20 dakika -20°C'de bekletilip, 30 dakika +4°C maksimum hızda santrifüj işlemi yapıldı. Üst sıvı atılarak pellet üzerine 300 µl %70'lik ethanol eklendi ve tekrar +4°C maksimum hızda 5 dakika santrifüj işlemi yapıldı.

3. 2. 1. 2. 4. Ligasyon

Restriksiyonun ardından presipitasyonla ligasyona hazır hale getirilen plazmid ve ampikonlar için ligasyon reaksiyonu uygulandı. 17 µL vektör-total DNA karışımı, 2 µL T4 Ligaz tamponu (10X), 1 µL T4 DNA ligaz (5 U/µL) bir eppendorfta birleştirildi ve hazırlanan reaksiyon 22⁰C’de 1 saat bekletildikten sonra 16⁰C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

3. 2. 1. 2. 5. Kompetan Hücrenin Hazırlanması

Klonlamada kullanılacak olan kompetan, kimyasal kompetan hazırlama prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. BL21 10 µL TSB’ye koyuldu ve gecelik bakteriler kültüre bırakıldı daha sonra 50 mL TSB’ye 1 mL gecelik kültürden eklendi 37⁰C’de yaklaşık 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, bakteri kültürünü içeren tüp 10 dakika buz içerisinde bekletildi ve 5000 rpm’de 10 dakika +4⁰C santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine 10 mL soğuk distile su ilave edilerek homojenize edildi. 5000 rpm’de +4⁰C’de 10 dakika santrifüj edildi ve bu işlem ikinci kez tekrar edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine 10 mL %10’luk soğuk gliserollü su eklenerek homojenize edildi, 5000 rpm’de +4⁰C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 30 mL, 80 mM MgCl₂ 40 mM CaCl₂ karışımından eklenerek homojenize edildi. 5000 rpm’de +4⁰C’de 10 dakika santrifüj yapıldı ve daha sonra pellet yoğunluğuna göre 500-1000 µL CaCl₂ eklenerek homojenize edildi. Hazırlanan kompetan hücre buz üzerinde her birinde 100 µL olacak şekilde eppendorflara dağıtıldı. Üzerine 10 µL ligant eklendi bir eppendorfun içine ise kontrol için 10 µL pET30(+) eklendi. 30 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde 42⁰C’de 2 dakika thermoshaker’da inkübe edildi ve sonra 5 dakika buzda bekletildi. Daha sonra her birinde 900 µL olacak şekilde tüplere TSB eklendi ve Thermoshaker’da 37⁰C’de 1 saat bekletildi, ardından kanamisin içeren TSA’ya kontrolden 200 µL, liganttan ise 100 µL olacak şekilde ve öze yardımıyla yayma ekim yapıldı ve 37⁰C’de en az 24 saat olmak üzere inkübasyona bırakıldı.

3. 2. 1. 2. 6. İnsert Alan Rekombinant Plazmidleri İçeren Kolonilerin Seçimi ve Doğrulanması

Staphylococcus aureus'da bulunan *pvl*, *luks-pv* ve *lukf-pv* genlerinin varlığı açısından kolonileri değerlendirmek için belirtilen koşullarda primerler ile koloni PCR reaksiyonu kuruldu. Aynı zamanda pozitif çıkan koloniler TSA besiyerine ekim yapıldı ve 1 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. TSA besiyerinden tek koloni seçilerek 10 mL TSB içine ekim yapıldı ve tekrar bir gece inkübasyona bırakıldı, ertesi gün sıvı kültürde üreyen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldı. *Staphylococcus aureus*'da bulunan *pvl*, *luks-pv* ve *lukf-pv* genleri için kullanılan restriksiyon enzimi kullanılarak kesim yapıldı.

3. 2. 1. 2. 7. Sekans Analizi

Seçici besiyerinde seçilen klonların doğrulanma yapıldıktan sonra elde edilen klonlar primerleri ile PCR yapıldı ve sekans analizi için özel bir firmaya gönderildi. Rekombinant olarak PVL, LukS-PV ve LukF-PV elde edildi.

3. 2. 2. Protein Analizi

3. 2. 2. 1. Total Protein Ekstraktının Hazırlanması

Klonlanmış *pvl*, *luks-pv* ve *lukf-pv* genlerini içeren pET30a(+), BL21 50 mg/ mL kanamisin içeren 12 mL TSB (tryptic soy broth) sıvı besiyerlerine tek koloni ekim yapıldı. 37°C'de gecelik kültüre bırakıldı. Ertesi gün 50 mg/ mL Kanamisin içeren 200 mL TSB besiyerine, 7 mL gecelik kültürden koyularak ve 37°C'de yaklaşık 6 saat inkübe edildi. 6 saat inkübasyondan sonra sıvı besiyerine 1 mM IPTG'den 2 mL eklenerek bir gece boyunca 37°C'de kültüre bırakıldı. 200 mL bakteri kültürünü 50 mL'lik falkonlara dağıtıldı ve 5000 rpm'de 20 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Her falkondaki süpernatant atılarak dipteki bakteri pelleti üzerine 0,01 M 10 mL RIPA lysis buffer konularak homojenize edildi. Falkondaki homojenize edilmiş pellet birleştirildi. Bu homojenizatlar aynı falkonlar içerisinde tekrar 5000 rpm'de 20 dakika +4°C'de santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı. Pelletlerin üzerine 5 mL inhibitörlü PBS solüsyonundan konularak homojenize edildi. Sonikatör cihazı ve 30 frekansta 30 sn 5 kez (30sn'den sonra aralarda 1 dk beklenir) parçalama işlemi yapıldı.

Parçalanmış hücreler 10.000 rpm de 5 dakika +4⁰C’de santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant yeni bir falkona 0.45 µm por çapına sahip filtreden geçirildi, protein ekstraktı elde edildi.

3. 2. 2. 2. SDS Jelinin Hazırlanması

Proteinlerin görüntülenmesi için SDS-PAGE jeli hazırlandı ve örnekler yüklenerek proteinler jelde dikey elektroforez cihazıyla yürütüldü. Daha sonra jel boyanarak proteinler görüntülendi. Protein boyutuna göre seperasyon jeli hazırlandı.

Tablo 6. %8 Seperasyon jeli için gerekli malzeme ve miktarları (10 mL)

İçerik	%8’lik jel için gerekli miktar
%30 Akrilamid/Bis akrilamid	2,7 mL
Seperasyon Buffer	1,25 mL
%10 SDS	0,1 mL
%1.5 Amonyum PersüLfat	0,75 mL
Distile su	4,1 mL
TEMED	5 µl

TEMED ve Amonyum en son ilave edildi. Elde edilen seperasyon solüsyonu cam levhaların aralarına pipet yardımıyla aktarıldı. Aktarıldıktan sonra, üzeri etanol ile kaplandı. Yaklaşık 30-40 dakika separasyon jelinin donması için beklendi. Separasyon jelinin donmasının ardından üzerine örneklerin yüklenmesi için gerekli olan Stacking Jel hazırlandı. Seperasyon jelinin üzerine koyulan alkol giderildi ve stacking'nin jeli pipet yardımıyla seperasyon jelinin üzerine koyuldu ardından taraklar yerleştirildi.

Tablo 7. %8 Stacking jeli için gerekli malzeme ve miktarları (4 mL)

İçerik	%8'lik jel için gerekli miktar
%30 Akrilamid/Bis akrilamid	0.5 Ml
Stacking Gel Buffer	0.1 mL
%10 SDS	0.4 mL
% 1,5 Amonyum Persülfat (APS)	0.03 mL
TEMED	1.5 µl
Distile su	2.10 mL

3. 2. 2. 3. Örneklerin Hazırlanması ve Yürütülüp Boyanması

Her bir kuyucuğa yaklaşık 30 µl örnek ve sample buffer karışımı koyuldu. Örnekler hazırlanırken 30 µl örnek 10 µl sample buffer bir eppendorf içerisine konuldu ve 100°C'de 5-10 dakika denatüre edildi. Daha sonra örnekler ve marker kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Stacking jel kısmı kesilerek atıldı. Kalan seperasyon jeli boyamak için, commasie blue boyası kullanıldı. Commasie blue boyası jeli kapatacak şekilde üzerine koyuldu ve 1 dakika mikrodalga fırında ısıya tabi tutuldu. Daha sonra ise 15-20 dakika shaker'da yavaşça inkübe edildi. Boya dökülerek üzerine destain solüsyonu koyuldu ve mikrodalgada 1 dakika ısıtılıp 20-30 dakika karıştırıcıda yavaşça inkübe edildi. Bu işleme bantlar net görünene kadar devam edildi.

3. 2. 3. Hücre Kültürü

3. 2. 3. 1. Hücre Kültüründe Denenmesi

Çalışmamızda daha önce PVL'nin sitotoksik olduğu bilinen makrofaj hücre hattı (raw264.7), insan kökenli herhangi bir hastalığa sahip olmayan normal prostat epitel hücre hattı RWPE-1 ve prostat adenokarsinom hücre hattı PC3 kullanıldı. Çalışmada RWPE-1 hücre hattı için RPMI ve PC3 hücre hattı içinde DMEM besiyeri kullanıldı. Hücreler %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava koşullarında ve 37⁰C'de inkübe edildi. Sıvı nitrojende saklanan hücre hattının canlandırılması için hücreler 37⁰C'de su banyosunda hızlıca eritilerek ve 5 mL besiyeri içerisine transfer edildi. Kriyoprotektan maddelerin uzaklaştırılması için hücre ve besiyerinden oluşan karışım 400×g'de 10 dakika santrifüj edilerek ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 7 mL besiyerinde çözülerek 25 cm² flask içerisinde inkübasyona bırakılarak canlandırıldı. Hücreler flask yüzeyinin %80'ini kapladıktan sonra flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve flaska 5 mL fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) eklendi, hafifçe çalkalanarak yıkama işlemi gerçekleştirildi ve PBS döküldü. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Tripsin enzimi kullanılarak hücreler yüzeyden ve birbirinden uzaklaştırıldı. Bunun için Tripsin-EDTA (%0.25)' dan yüzeyi kaplayacak şekilde 500 µL flaska eklendi. Flaskın 37⁰C'de inkübasyonunun ardından %90 üzerinde ayrışmanın gözlenmesi için mikroskop altında gözlem yapıldı. Yeterli ayrışmanın ardından 5 mL antibiyotiksiz besiyeri derhal flaska eklendi ve hücrelerle birlikte alınarak 15 mL falkona koyup 400×g'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 1 mL besiyeri içerisinde çözüldü ve tripan mavisini ile bire bir oranda karıştırıldıktan sonra hemasitometrede hücre sayımı yapıldı. Maviye boyanmış hücreler cansız kabul edildi. Kültürde mL'de bulunan canlı hücre sayısı (canlı hücre sayısı x dilüsyon faktör x 1000) formülü ile hesaplanıp 10⁵ hücre/ mL yoğunluğu elde edilecek şekilde dilüsyon yapıldı.

3. 2. 3. 2. Hücreler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

96 kuyucuklu plakaya her bir kuyuya 100 µl hücre süspansiyonlarından eklendi ve 24 saat boyunca 37⁰C, %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Kuyulara 90 µl besiyeri ve 10 µl protein solüsyonundan eklendi ve kontrol olarak PBS kullanıldı.

Hücreler uygulamanın ardından 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, hücreler üzerine etkisinin belirlemek için WST-1 assay gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa WST-1 solüsyonunda 10 µl eklenerek ve 1-4 saat boyunca 37⁰C’de inkübasyona bırakıldı. 1. 2. ve 4. saatlerde 450 nm’de optik dansite (absorbans) spektrofotometre ile ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Daha sonra Panton Valentine Lökositin etkisi değerlendirildi.

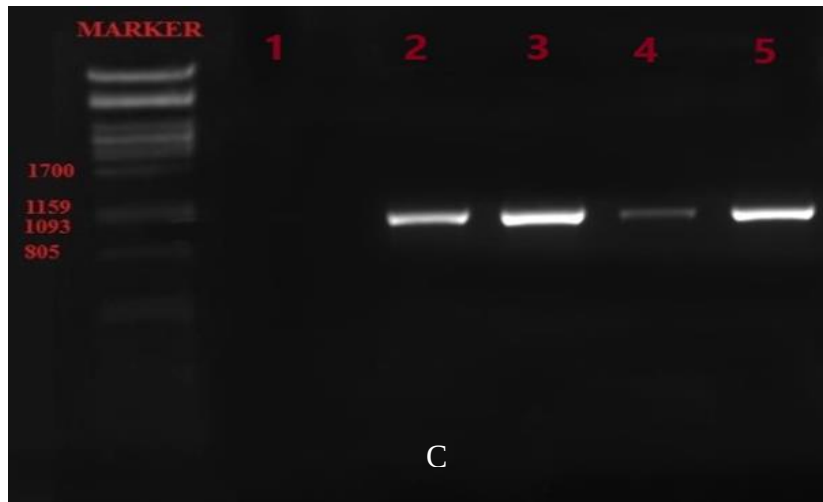
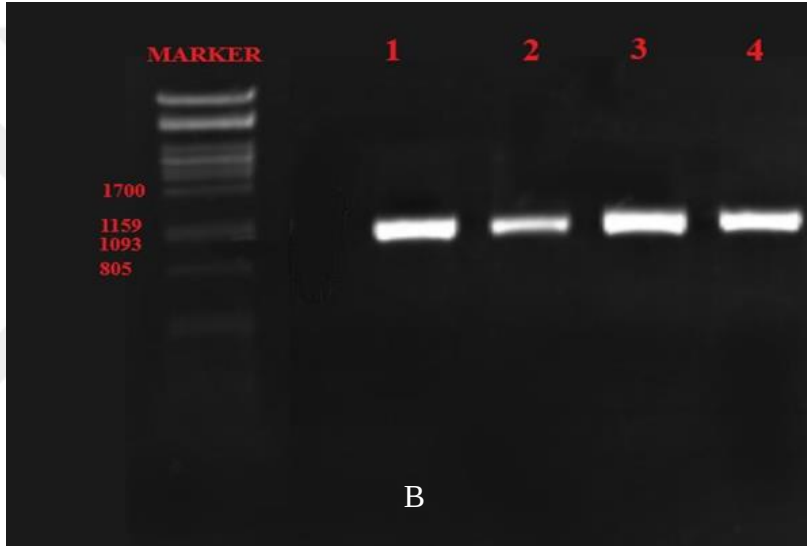
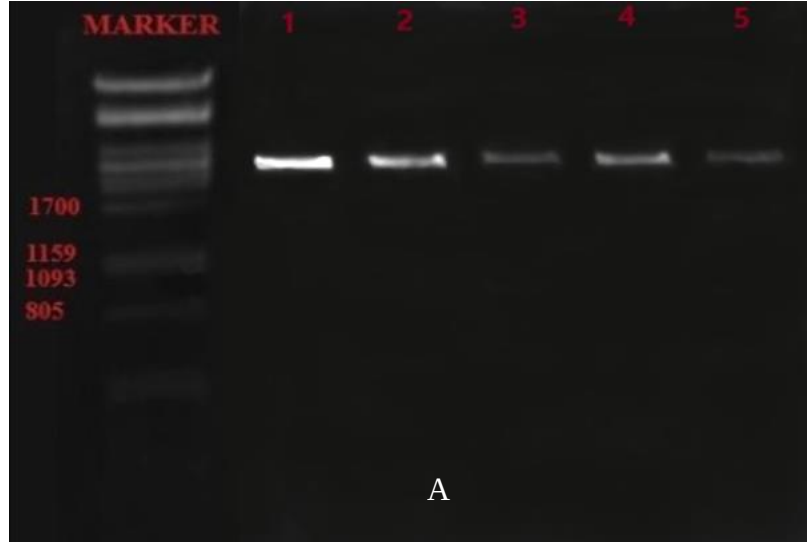


4. BULGULAR

Bu çalışmada Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan PVL pozitif olduğu bilinen *Staphylococcus aureus* şuşlar (BE92, BE148, BE163, BE173 ve BE190) ekim yapıldı ve DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra National Center For Biotechnology Information (NCBI)'ın Genbank sitesi kullanılarak klonlamada kullanılmak için restriksiyon kesim bölgelerini içeren pET30a(+) uygun primer dizayn edildi.

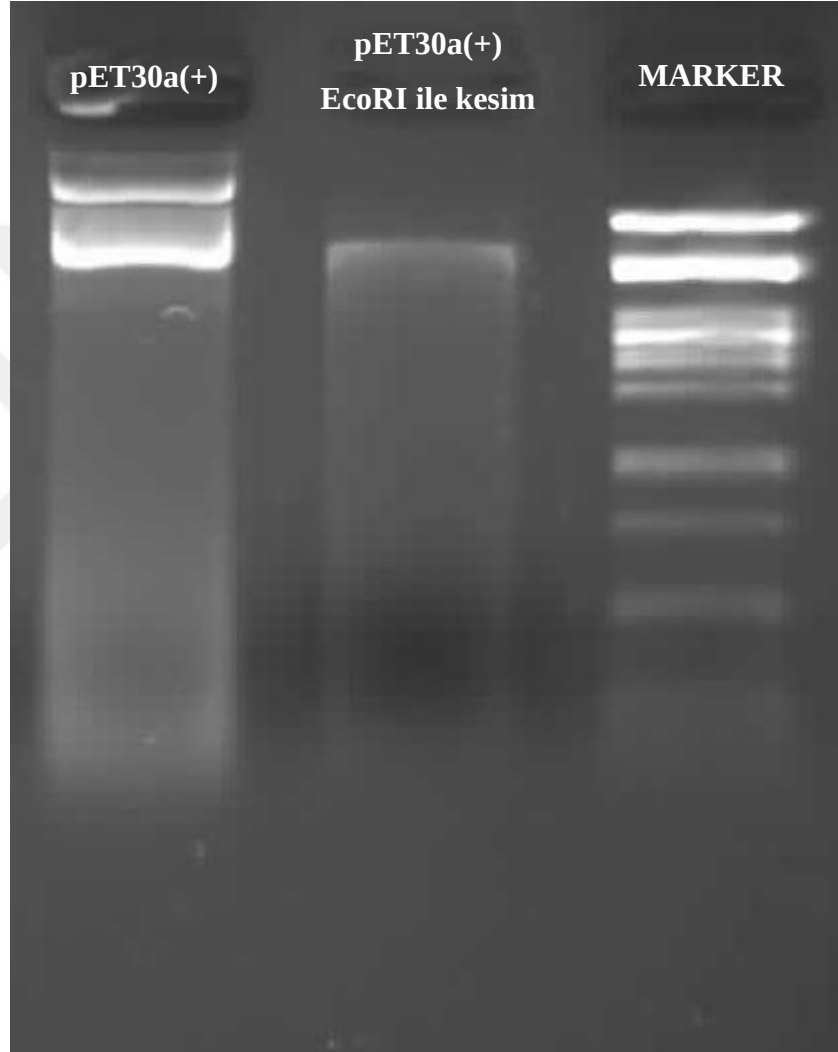
The screenshot displays the NCBI GenBank interface. At the top, the NIH logo and 'National Library of Medicine' text are visible. Below this is a search bar with 'Nucleotide' selected and a 'Search' button. The main content area shows the entry for 'Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300 strain NRS384'. The GenBank ID is CP027476.1. The entry includes links for 'FASTA' and 'Graphics'. The 'Go to:' section shows the locus information: CP027476, 2872762 bp, DNA, circular, BCT 14-MAR-2018. The 'DEFINITION' is 'Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300 strain NRS384'. The 'ACCESSION' is CP027476, and the 'VERSION' is CP027476.1. The 'DBLINK' section lists 'BioProject: PRJNA395593' and 'BioSample: SAMN07411405'. The 'KEYWORDS' section is empty. The 'SOURCE' section lists 'Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300'. The 'ORGANISM' section lists 'Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300', 'Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus'. The 'REFERENCE' section lists '1 (bases 1 to 2872762)'. On the right side, there is a 'Customize view' panel with options for 'Basic Features' (All features selected) and 'Display options' (Show sequence, Show reverse complement, Show gap features). Below this is an 'Analyze this sequence' panel with links for 'Run BLAST' and 'Pick Primers'.

Resim 1. National Center For Biotechnology Information (NCBI)'ın genbank sitesi uygun şekilde primer dizaynı



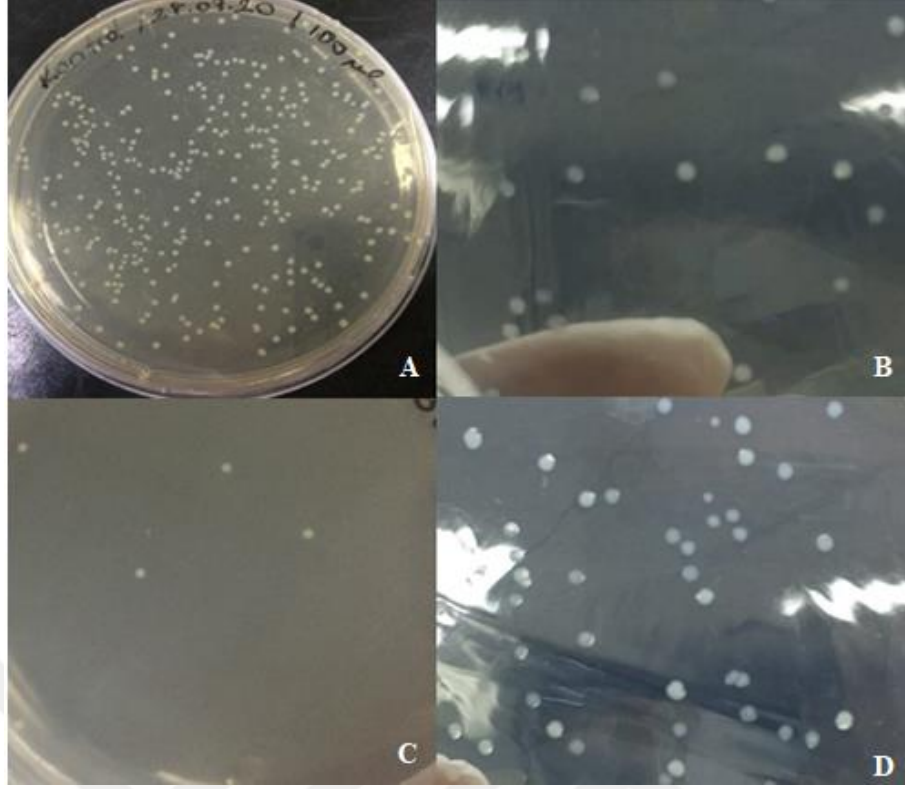
Resim 2 *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-Valentine Lökositin (PVL) genlerinin varlığının araştırması. A şekli PVL primerleri, B şekli LukS primerleri ve C şekli ise LukF primerleri ile taranan suşların sonuçları verilmiştir.

Bu primerler ile elimizde bulunan 5 suştan *pvl* geni PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı ve ardından jel elektroforezine yüklenerek görüntülendi (Resim 2). Pozitif olarak belirlenen suşlardan (PVL, LukS-PV ve LukF-PV) herbirinden bir tane olacak şekilde seçim yapıldı. Vektör olarak kullanılacak pET30a(+) kit yardımıyla izole edildi. Daha sonra pET30a(+) ve EcoRI enzimi ile kesim yapılarak oluşturan lineer yapısı jel elektroforez yüklendi. Resim 3 de jel elektroforez görüntüsü verildi.



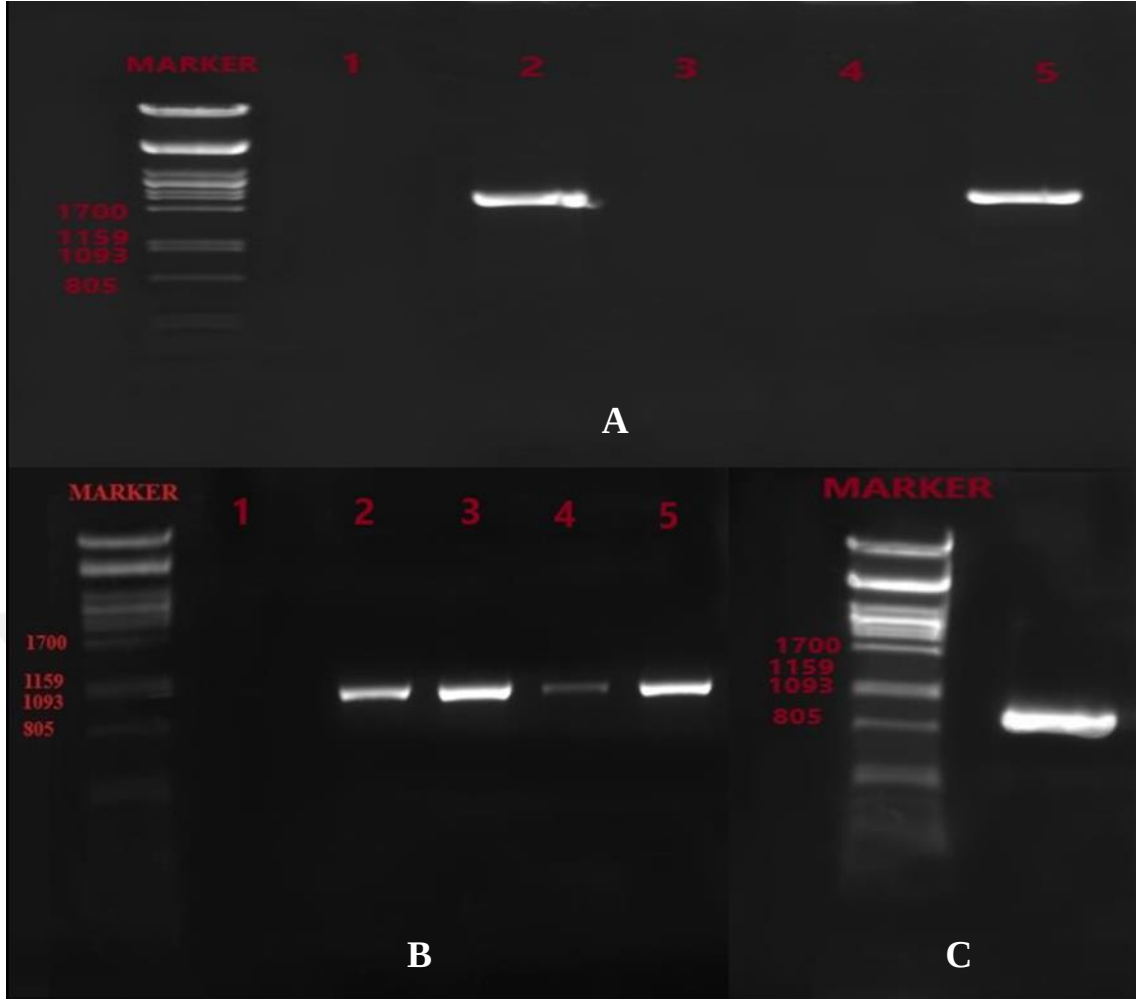
Resim 3 pET30a(+) plazmidinin jel elektroforez görüntüsü.

Ardından izole edilen pET30a(+) vektörü ve PCR amlikonları EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldı. Restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldıktan sonra ligasyon ve transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra kanamisin içeren besiyerine ekim yapıldı. Daha sonra 1 gece inkubasyona bırakıldı. Rekombinant PVL, LukF-PV ve LukS-PV elde edildi.



Resim 4 Transformasyondan sonra kanamisinli besiyerinde oluşan koloniler. Resim 4.A’da kontrol, Resim 4.B’de rPVL, Resim4.C LukS-PV ve Resim4.D ise LukF-PV transformasyon sonucu oluşan koloni görüntüleri

Resim 4’de görüldüğü gibi rekombinant olarak elde edilen kolonilerden birkaç koloni seçilerek daha önce tasarladığımız primerler ile koloni PCR kuruldu. PCR örnekleri jel elektroforezde yükleme işlemi yapıldı. PCR jel elektroforez görüntüsü sonucu Resim 4’de (Resim 4.A, 4.B ve 4.C) verilmiştir.



Resim 5 Rekombinant elde edilen kolonilerin PCR sonuçları. Şekil5.A'da rPVL, Şekil5.B'de LukS-PV, şekil5.C'de ise LukF-PV kolonilerin PCR sonuçları

Şekil 5.A'dan 2. Klon, Şekil 5.B'den 3. Klon ve Şekil 5.C'den 1.Klon seçildi ve seçilen klonların amplikonları doğrulamak için sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizinden NCBI sitesinden sekans sonuçları değerlendirildi. Resim 6, Resim 7. ve Resim 8 'de NCBI sekans sonuçları verilmiştir.

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show 100

☐ select all
 0 sequences selected

[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☐	Staphylococcus phage SA137ruMSSAST121PVL complete genome	Staphylococcus ...	1929	1929	95%	0.0	98.20%	45999	NC_055043.1
☐	Staphylococcus aureus strain Y26C panton-valentine leukocidin S (lukS-PV) and panton-valentine leukocidin ...	Staphylococcus ...	1929	1929	95%	0.0	98.20%	1918	KF773712.1
☐	Staphylococcus aureus strain HT20030539 LukS-PV (lukS-PV) gene complete cds and LukF-PV (lukF-PV) ...	Staphylococcus ...	1929	1929	95%	0.0	98.20%	1908	EU518767.1
☐	Staphylococcus aureus strain A80740 LukS-PV (lukS-PV) gene complete cds and LukF-PV (lukF-PV) gene ...	Staphylococcus ...	1929	1929	95%	0.0	98.20%	1908	EU518762.1
☐	Staphylococcus aureus TPS3156 DNA complete genome	Staphylococcus ...	1923	2231	95%	0.0	98.11%	2852412	AP023034.1

Resim 6 rPVL'nin sekans sonucunun değerlendirilmesi

Download

GenBank

Graphics

Next

Previous

Descriptions

Staphylococcus aureus strain D64 Panton-Valentine leukocidin S (lukS-PV) and Panton-Valentine leukocidin F (lukF-PV) genes, complete cds

Sequence ID: EU368820.1 Length: 1966 Number of Matches: 1

Range 1: 22 to 564

GenBank

Graphics

Next Match

Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
987 bits(334)	0.0	340/343(99%)	0/343(0%)	Plus/Plus
Query 216	AAGGAAATGATTTTATGGTC	275		
Subject 22	AAGGAAATGATTTTATGGTC	81		
Query 276	ATCACTCCTATTGCTACTTCGTTTCATGAATCTAAAGCTGATAACAAATATTGAGAATATT	335		
Subject 82	ATCACTCCTATTGCTACTTCGTTTCATGAATCTAAAGCTGATAACAAATATTGAGAATATT	141		
Query 336	GGTGATGGCGCTGAGGTAGTCAAAAGAACAGAGATACAAGTAGCGATAAGTGGGGGGTC	395		
Subject 142	GGTGATGGCGCTGAGGTAGTCAAAAGAACAGAGATACAAGTAGCGATAAGTGGGGGGTC	201		
Query 396	ACACAAAAATTTCAGTTTGTATTTGTTAAAGATAAAAAATATAACAAAGACGCTTTGATT	455		
Subject 202	ACACAAAAATTTCAGTTTGTATTTGTTAAAGATAAAAAATATAACAAAGACGCTTTGATT	261		
Query 456	TTAAAAATGCAAGGTTTATCAATTCAAAGACTACTTATTACAATTACAAAAACACAGAT	515		
Subject 262	TTAAAAATGCAAGGTTTATCAATTCAAAGACTACTTATTACAATTACAAAAACACAGAT	321		
Query 516	CATATAAAGCAATGAGGTGGCTTTTCCAAATACAAATATTGGTCTCAAAAACAAATGACCC	575		
Subject 322	CATATAAAGCAATGAGGTGGCTTTTCCAAATACAAATATTGGTCTCAAAAACAAATGACCC	381		
Query 576	AATGTAGATTTAATAAATTATCTACCTAAAAATAAAATAGATTGAGTAAATGTTAGTCAA	635		
Subject 382	AATGTAGATTTAATAAATTATCTACCTAAAAATAAAATAGATTGAGTAAATGTTAGTCAA	441		
Query 636	ACATTAGGTTATAACATAGGTGGGAATTTTAATAGTGGTCCATCAACAGGAGGTAATGGT	695		
Subject 442	ACATTAGGTTATAACATAGGTGGTAATTTTAATAGTGGTCCATCAACAGGAGGTAATGGT	501		
Query 696	TCATTTAATTATTCAAAAACAATTAGTTATAATCAACAAACATATATCAGTGAAGTAGAA	755		
Subject 502	TCATTTAATTATTCAAAAACAATTAGTTATAATCAACAAACATATATCAGTGAAGTAGAA	561		

Resim 7. LukS-PV'nin sekans sonucunun değerlendirilmesi

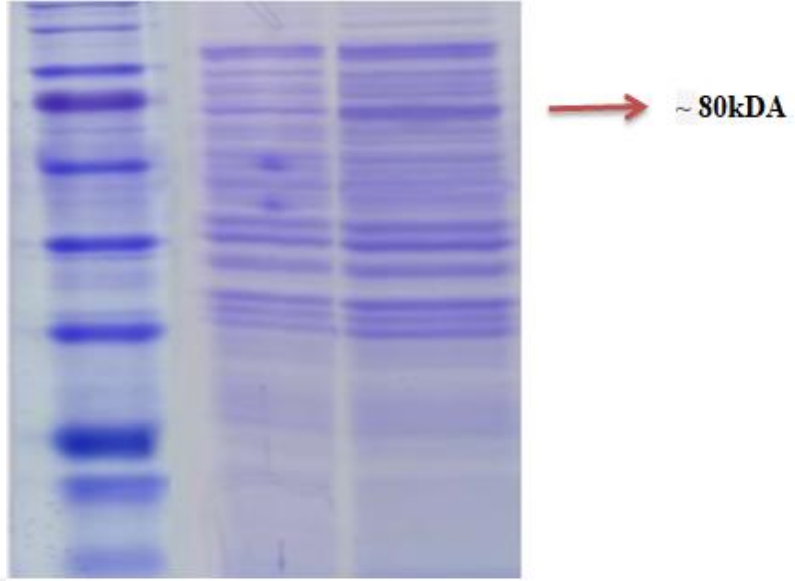
Staphylococcus aureus strain S242 Panton-Valentine leukocidin LukS-PV (lukS-PV) and Panton-Valentine leukocidin LukF-PV (lukF-PV) genes, complete cds
Sequence ID: [MK902785.1](#) Length: 1930 Number of Matches: 1

Range 1: 941 to 1482 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

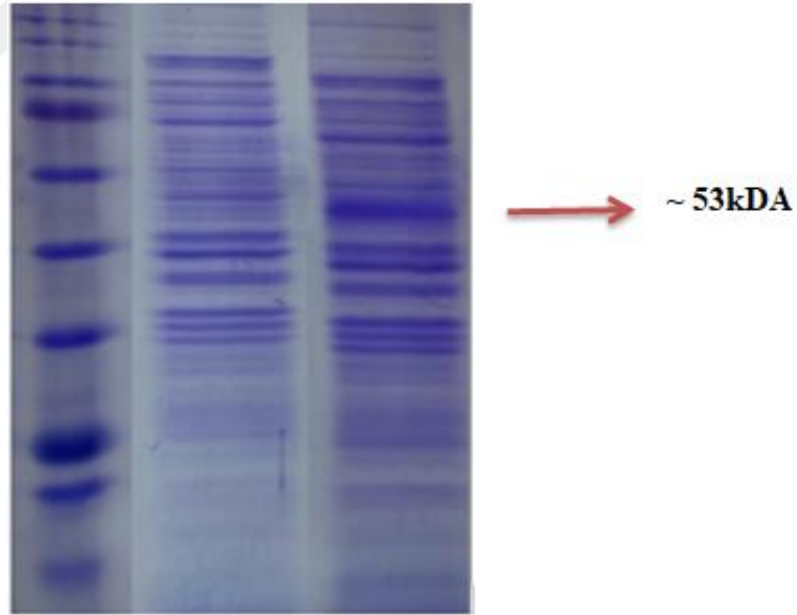
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
968 bits(524)	0.0	537/543(99%)	2/543(0%)	Plus/Plus
Query 212	ATGAAAAAAAAAGTCAAAATCATCAGTTGTTACATCAATTGCATTGCTTTTGCTATCCAAT	271		
Subject 941	ATGAAAAAAAAAGTCAAAATCATCAGTTGTTACATCAATTGCATTGCTTTTGCTATCCAAT	1000		
Query 272	ACAGTTGATGCAGCTCAACATATCACACCTGTAAAGTGAGAAAAAGTTGATGATAAAATT	331		
Subject 1001	ACAGTTGATGCAGCTCAACATATCACACCTGTAAAGTGAGAAAAAGTTGATGATAAAATT	1060		
Query 332	ACTTTGTACAAAACAACTGCAACATCAGATTCCGATAAGTAAAAATTTCTCAGATTTTA	391		
Subject 1061	ACTTTGTACAAAACAACTGCAACATCAGATTCCGATAAGTAAAAATTTCTCAGATTTTA	1120		
Query 392	ACTTTTAATTTTATTAAGATAAAATTTATGATAAGATACATTAATCTCAAGCTGCT	451		
Subject 1121	ACTTTTAATTTTATTAAGATAAAATTTATGATAAGATACATTAATCTCAAGCTGCT	1180		
Query 452	GSAAACATTTTATTCTGGCTATACAAGGCCAAATCCAAAGACACTATTAGTCTCAATTT	511		
Subject 1181	GSAAACATTTTATTCTGGCTATACAAGGCCAAATCCAAAGACACTATTAGTCTCAATTT	1240		
Query 512	TATTGGGGTCTTAAGTACAACATTTCATTAATTCAGATTCTAATGACTCAGTAAACGAT	571		
Subject 1241	TATTGGGGTCTTAAGTACAACATTTCATTAATTCAGATTCTAATGACTCAGTAAACGAT	1300		
Query 572	GTA-ATTATGCACCTAAAAATCAAAATGAAAGATTTCAGGTACAAACAAACGTAAGTTAT	630		
Subject 1301	GTAAGATTATGCACCTAAAAATCAAAATGAAAGATTTCAGGTACAAACAAACGTAAGTTAT	1360		
Query 631	TCTTATGGTGGAGATATTAATATCTCTAACGGCTTATCAGGTGGAGGTAAATGGTTCAAAA	690		
Subject 1361	TCTTATGGTGGAGATATTAATATCTCTAACGGCTTATCAGGTGGAGGTAAATGGTTCAAAA	1420		
Query 691	TCTTTTTCAAGACAATTAACTATAAACAAAGAAAGCTATAGAACTAGCTTACATAAAAG	750		
Subject 1421	TCTTTTTCAAGACAATTAACTATAAACAAAGAAAGCTATAGAACTAGCTTACATAAAAG	1479		
Query 751	AAC 753			
Subject 1480	AAC 1482			

Resim 8. LukF-PV 'nin sekans sonucunun değerlendirilmesi

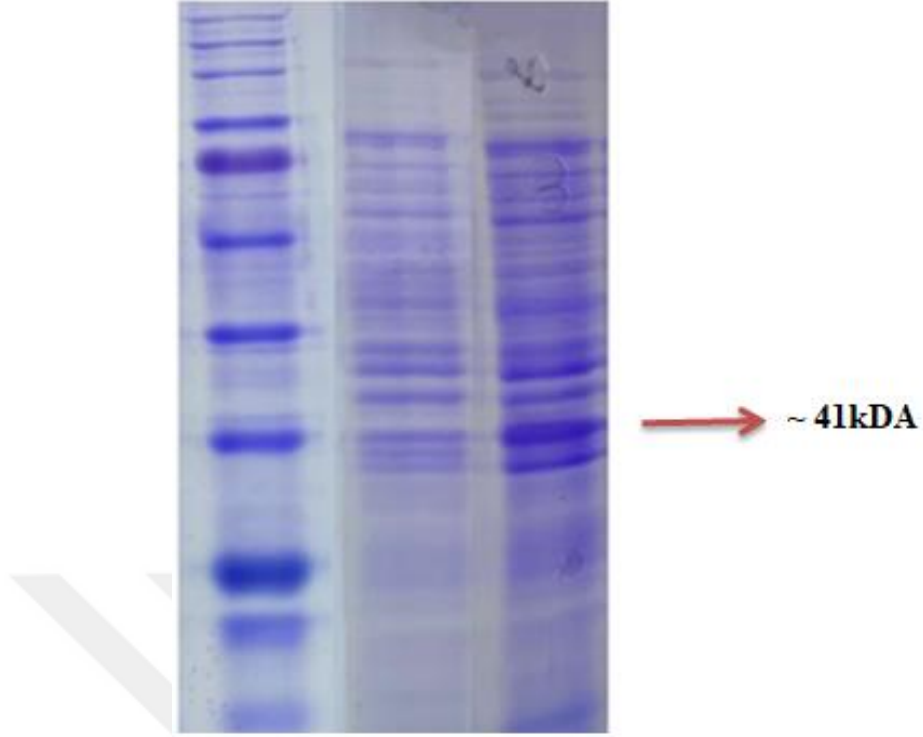
Sekans sonucuna göre rekombinant PVL NCBI sitesindeki *S.aureus* ait PVL geniyle %98.20 oranında benzerlik gösterdi. LukS %99 oranında PVL geninin S kısmıyla ve LukF, %99 oranında PVL geninin F kısmıyla benzerlik gösterdi. Sekans sonucu doğrulandı. Sekans sonucu ile doğrulanan klonlar skim milk içeren besiyerinde -20⁰C'de ve %10 gliserollü besiyerinde -80⁰C'de saklandı. Protein inkübasyonu için elde edilen ve doğrulanan her bir gene ait klonlar ayrı ayrı kanamisinli LB besiyerine ekim yapıldı. Ekimin ardından IPTG ile indükleme yapılmadan önce 1 mL örnek alındı daha sonra indükleme yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. Santrifüj yapılarak üsteki sıvı atıldı ve pellet üzerine 1 mL PBS koyularak, sonikatör cihazı ile parçalama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra %12,5'lük SDS page jel elektroforezine Resim 9, Resim 10 ve Resim 11'de görüldüğü gibi örnekler sırasıyla 1. kuyu marker, 2. kuyu indüklenmemiş ve 3. kuyu IPTG ile indüklenmiş olmak üzere sırasıyla yüklendi.



Resim 9. rPVL'nin SDS PAGE jel görüntüsü. 1. kuyu marker, 2. kuyu indüklenmemiş örnek
3. kuyu indüklenmiş örnek



Resim 10. LukS-PV'nin SDS PAGE jel görüntüsü. 1. kuyu marker, 2. kuyu indüklenmemiş
örnek 3. kuyu indüklenmiş örnek



Resim 11. LukF-PV'nin SDS PAGE jel görüntüsü. 1. kuyu marker, 2. kuyu indüklenmemiş örnek 3. kuyu indüklenmiş örnek

Boyutları doğrulanan protein örnekleri hücre kültüründe uygulanmak için hücre kültüründe kullanılan PBS solüsyonu ile buffer değişimi yapıldı. Buffer değişimi yapılan hücreler ilk olarak sitotoksik olduğu bilinen makrofaj (Raw 264. 7) hücre hattına protein örnekleri uygulandı, WST-1-assay eklenerek 1., 2. ve 4. saatlerde OD₄₅₀ ölçüm yapıp etkisi doğrulandı (Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10).

Tablo 8. Raw264. 7 hücre hattına rPVL uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	rPVL	PBS	DMSO
1. Saat	0,180	0,276	0,010
2. Saat	0,317	0,491	0,008
4. Saat	0,572	1,012	0,006

Tablo 9. Raw264.7 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	LukS-PV	PBS	DMSO
1. Saat	0,241	0,276	0,010
2. Saat	0,385	0,491	0,008
4. Saat	0,750	1,012	0,006

Tablo 10. Raw264.7 hücre hattına LukF-PV uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	LukF-PV	PBS	DMSO
1. Saat	0,781	0,276	0,010
2. Saat	0,827	0,491	0,008
4. Saat	1,546	1,012	0,006

Daha sonra makrofaj hücre hattına benzer şekilde, normal prostat hücre hattı ve prostat kanser hücre hattı üzerinde etkisine bakıldı ve OD₄₅₀ ölçüm yapıldı. Tablo 11’den Tablo 16’a kadar tüm veriler tablo şekilde verildi.

Tablo 11. RWP-1 hücre hattına rPVL uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	rPVL	PBS	DMSO
1. Saat	0,141	0,036	0,020
2. Saat	0,245	0,176	0,017
4. Saat	0,318	0,216	0,011

Tablo 12. RWP-1 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	LukS-PV	PBS	DMSO
1. Saat	0,208	0,036	0,020
2. Saat	0,377	0,176	0,017
4. Saat	0,384	0,216	0,011

Tablo 13. RWP-1 hücre hattına LukF-PV uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	LukF-PV	PBS	DMSO
1. Saat	0,285	0,036	0,020
2. Saat	0,538	0,176	0,017
4. Saat	0,440	0,216	0,011

Tablo 14. PC3 hücre hattına rPVL uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	rPVL	PBS	DMSO
1. Saat	0,776	0,362	0,110
2. Saat	0,834	0,594	0,100
4. Saat	1,436	1,055	0,096

Tablo 15. PC3 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	LukS-PV	PBS	DMSO
1. Saat	0,663	0,362	0,110
2. Saat	1,050	0,594	0,100
4. Saat	1,723	1,055	0,096

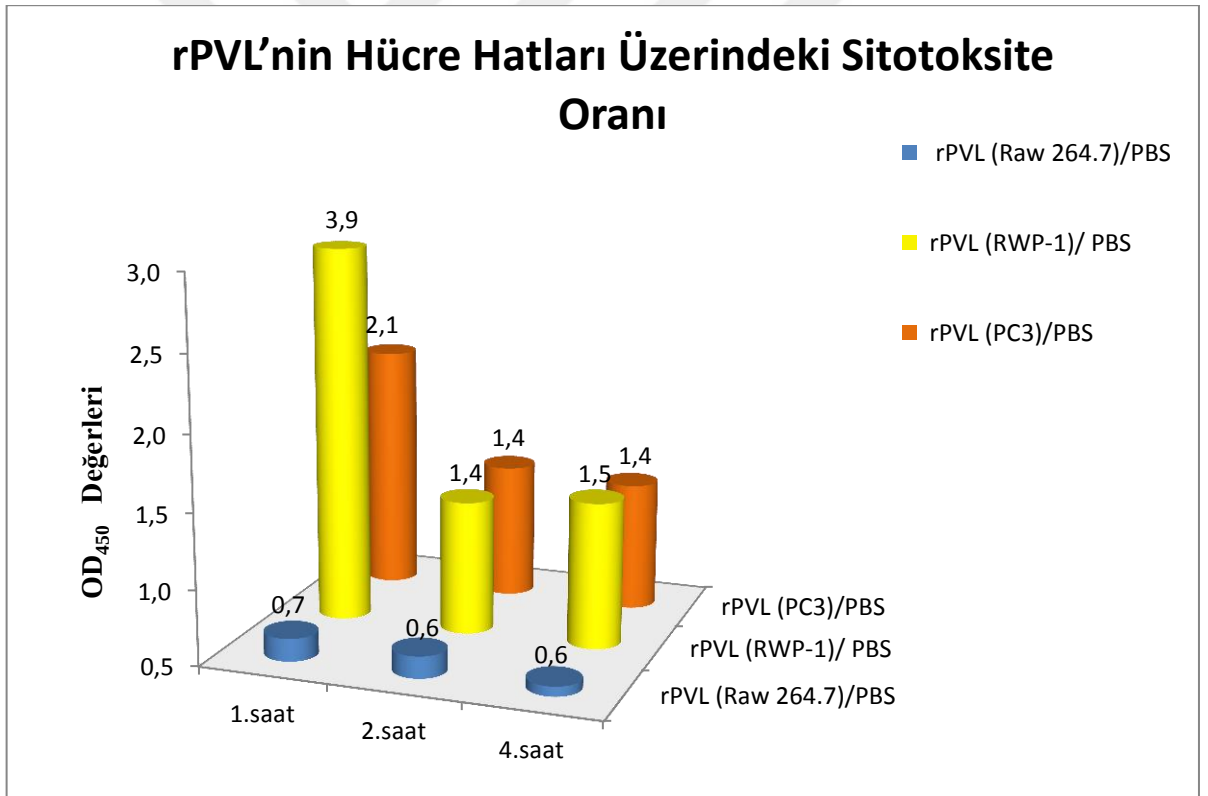
Tablo 16. PC3 hücre hattına LukS-PV uygulama sonrası OD₄₅₀ ölçümü

	LukF-PV	PBS	DMSO
1. Saat	0,969	0,362	0,110
2. Saat	1,168	0,594	0,100
4. Saat	1,957	1,055	0,096

Her hücre grubundaki örnekler, PBS uygulanmış hücre hattı ile karşılaştırıldı ve sitotoksite oranı (Protein OD₄₅₀ / PBS değeri) hesaplandı. Daha sonra sitotoksite oranları Tablo17 Tablo18 ve Tablo19’da tablo şeklinde verildi. Bu verilerden sütun grafiği oluşturuldu (Şekil12, Şekil13 ve Şekil14).

Tablo 17. rPVL’nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranı

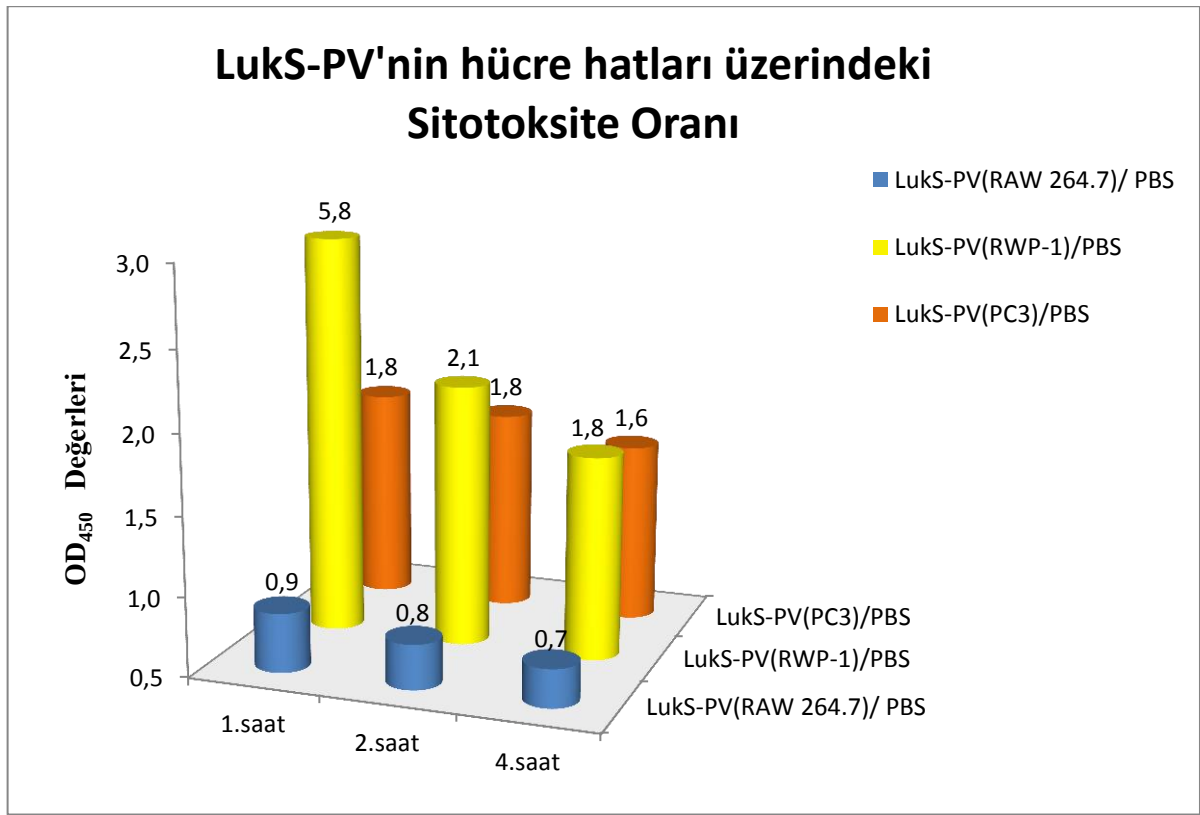
	rPVL (Raw 264. 7)/PBS	rPVL (RWP-1)/ PBS	rPVL (PC3)/PBS
1.saat	0,7	3,9	2,1
2.saat	0,6	1,4	1,4
4.saat	0,6	1,5	1,4



Şekil 12. rPVL’nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranının grafiği

Tablo 18. LukS-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranı

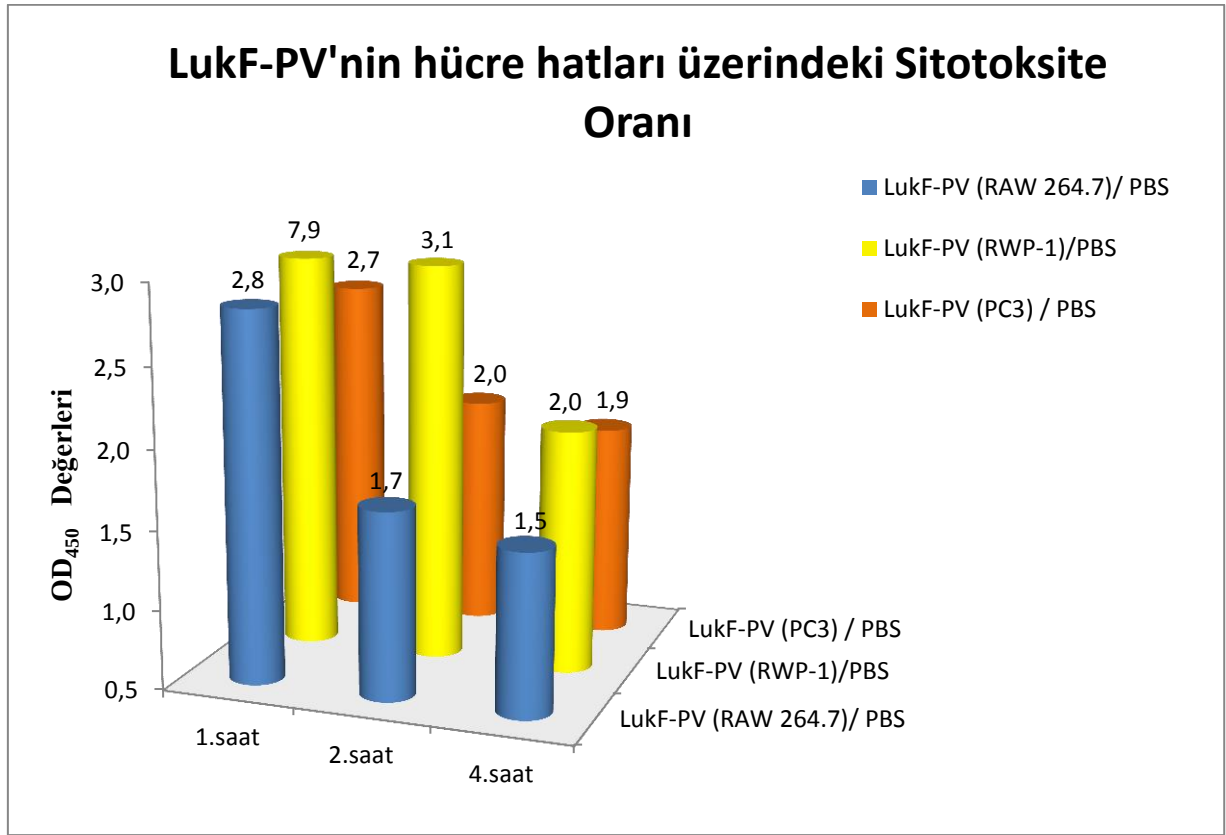
	LukS-PV(RAW 264. 7)/ PBS	LukS-PV(RWP-1)/PBS	LukS-PV(PC3)/PBS
1.Saat	0,9	5,8	1,8
2.Saat	0,8	2,1	1,8
4.Saat	0,7	1,8	1,6



Şekil 13. LukS-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranının grafiği

Tablo 19. LukF-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranı

	LukF-PV (RAW 264. 7)/PBS	LukF-PV (RWP-1)/PBS	LukF-PV (PC3)/PBS
1.Saat	2,8	7,9	2,7
2.Saat	1,7	3,1	2,0
4.Saat	1,5	2,0	1,9



Şekil 14. LukF-PV'nin hücre hatları üzerindeki sitotoksite oranının grafiği

5. TARTIŞMA

Rekombinant DNA teknolojisi canlı hücrelerin istenen proteinleri sentezlemesini sağlamak için başka hücreye ait genlerin bu hücelere aktarılmasıdır (Berk, 2000). Bu teknoloji moleküler biyoloji gelişmesiyle geçtiğimiz yıllardan bu güne kadar giderek önemi artmıştır. Ayrıca gen terapisi ve genetik modifikasyonlarda dahil olmak üzere ciddi hastalıkları tedavi etmek amacıyla hala kullanılmaktadır. Ciddi hastalıklar arasında vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalık olan kanser bulunmaktadır. Dünyada görülme olasılığı kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanserler arasında ise ikincisi prostat kanseri yer almaktadır ve hala prostat kanserinin nedenleri bilinmemektedir. Kanser tedavi etmekte kullanılan Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi dahil olmak üzere hepsinin bazı sınırlamaları vardır. Bu tedavi yöntemleri tümörün hacmi, yeri, evresi ve metastazı ile ilgili sorunlar dahil olmak üzere birçok etken kanserin tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde yeni yöntem aranmaya başlanmıştır. Son yıllarda mikroorganizmalardan elde edilen toksinler antikanser çalışmalarına ışık tutmuştur. Mikrobiyal toksinler, bakteriler, mantarlar, algler, protozoalar vb. dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalardan üretilebilir ve bu toksinler doğrudan hedeflenen tümör hücrelerini yok etmek için kullanılan umut verici olmuştur. Geçtiğimiz 150 yıl önce *Streptococcus pyogenes* enfeksiyonlu, kanserli hastalarda durumunun iyileştiği gözlenmiştir (Nauts, 1980). Ayrıca, yüzyılın sonlarına doğru streptokok bakterileri nedeniyle cilt enfeksiyonu oluşan hastalarda tümörlerin gerilediği görülmüştür. Bu, kanser immünoterapisinin yeniliğine yol açmıştır ve ardından, öldürülmüş bakteri türleri (Coley toksinleri) (Richardson, 1999) kullanılmaya başlanmıştır. Kanser tedavisinde mikrobiyal toksinler umut verici olmuştur. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle artık bakteriyel toksinler rekombinat olarak elde edilmeye başlamış ve çeşitli kanser türleri üzerinde etkileri bakılmıştır. Birçok bakteriyel toksin antikanser tedavisinde kullanılmak üzere test edilmiştir. Bazı araştırmalar, bakterilerin kanser tedavisinde umut verici yeni bir strateji olduğunu öne sürmüşlerdir ve bakteriyel toksinlerin antitümör aktivitesi üzerine araştırmalar artmıştır.

Bakteriyel toksinler, hücre döngüsünü, apoptozu ve farklılaşmayı kontrol eden hücresel süreçleri değiştirir (Patyar ve diğerleri, 2010). *Pseudomonas* ekzotoksin A (PE), meme tümörü seçici antikoru (MAB) ile konjugasyon halinde, insan meme tümörü hücre dizileri üzerinde sitotoksikite etkisi olan immünotoksinleri oluşturmuştur (Bjorn ve diğerleri, 1986). Tümörün seçici ölümünü sağlamayı amaçlayan Denileukin diftotox, kutanöz T hücreli lenfomayı (CTCL) tedavi etmek için kullanılmıştır (Duvic ve diğerleri, 2002). Bazı bakteriyel toksinler (*Bordetella pertussis*'nin AC toksini, shiga ve kolera toksini) iki hücre hattı, (mezotelyoma ve akciğer kanseri) üzerinde incelenmiş ve AC-toksini, her iki hücre üzerinde sitotoksitenin ve apoptozun konsantrasyonuna bağlı şekilde arttığını ancak kolera toksininin apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. (Nougayrède ve diğerleri, 2005). Botulinum nörotoksini (BoNT), ortaya çıkan anti-kanser bakteriyel toksinidir. Yapılan çalışmalarda BoNT'nin tümör damarlarını açarak kanser hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte kullanıldığında kanser hücrelerini etkili bir şekilde yok ettiği görülmüştür (Ansiaux ve Gallez, 2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tarafından salgılanan lökotoksin (LtxA) AML tedavisinde kullanılmıştır ve çeşitli diğer hematolojik maligniteler içinde araştırılmıştır (Kachlany, 2010). Sitolisin A (ClyA; HlyE olarak da bilinir), ökaryotik hücre zarlarında porler oluşturan ve kaspaz aracılı hücre ölümünü tetikleyerek çalışan bir bakteriyel toksindir. Birkaç çalışma, farelerin ClyA toksininin tümör büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır (Jiang ve diğerleri, 2010). *Pseudomonas aeruginosa* ait ekzotoksin T'nin ise çok çeşitli murin ve insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikiteyi indüklediği gösterilmiştir (Goldufsky diğerleri, 2015). Botulinum nörotoksin tip A (BoNT-A), apoptotik aktivite yoluyla prostatik hiperplazi (BPH) gibi bazı kanser türlerini iyileştirebilen, hücre büyümesini ve proliferasyonunu azalttığı ve bu toksinin sitotoksikiteyi indüklediği ve apoptoz yoluyla kanser hücre hattında ölüme yol açtığı bulunmuştur. Goldufsky ve çalışma arkadaşları, ExoT'nin ise meme kanseri ve çoklu primer tümörlerde tümör oluşumunu ve büyümesini azaltmak için sitotoksikiteye neden olduğunu göstermiştir. Başka çalışmalarında ise ExoT'nin kanser tedavisi için olası bir aday olma potansiyelini belirlemek amacıyla, cilt, meme, akciğer ve yumurtalık dahil olmak üzere dirençli tümör hücre hatlarına karşı ExoT'nin sitotoksikitesini araştırmışlardır ve çalışmalarının sonuçlarına göre, ExoT'nin incelenen tüm hücre hatlarında güçlü sitotoksikiteye neden olduğunu, ayrıca tümör oluşumunu ve B16 melanomunun büyümesini azalttığını göstermişlerdir (Goldufsky diğerleri, 2015).

Clostridium perfringens tarafından üretilen enterotoksin (CPE), anti-kanser tedavisinde, özellikle kolorektal kanserlerin tedavisi için araştırılmış ve Rekombinant CPE'nin (recCPE) hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda etkili bir antikanser ajanı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mide kanserinin tedavisinde etkili olduğu görülmüştür (Pahle diğerleri, 2017). Diğer bir çalışmada ise difteri toksini meme kanserine karşı antikanser aktivite göstermiştir (MCF 7) (Lewis ve diğerleri, 2017). Yukarıda bahsedilen deneylere ek olarak, bakteriyel toksinler ile çok sayıda araştırma yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Böylece, bakteriyel toksinler umut verici bir anti-kanser ajanı olarak ortaya çıkmıştır. Bizim çalışmamızda ise *S. aureus*'ta bulunan PVL toksininin prostat kanseri üzerine etkisine bakılmıştır. PVL toksini ile ilgili daha önce yapılan çalışmalara bakacak olursak genelde lösemi üzerine etkisi olup olmadığına bakılmıştır. PVL, insan PMN'lerinde önemli bir sitotoksik role sahip olduğunu ve düşük konsantrasyonlarda apoptoza ve yüksek konsantrasyonlarda nekroza yol açtığını bulmuşlardır (Genestier ve diğerleri, 2005). Spaan ve arkadaşları, ise LukS-PV'nin insan nötrofillerine ve monositlerine bağlanabildiğini, ancak lenfositlere bağlanmadığını bildirmişlerdir (Spaan ve diğerleri, 2013). Fare modeli üzerinde LukS-PV'nin HL-60 ve AML hücre hattında canlılığı inhibe ettiğini ve farklılaşmayı ve apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir (Shan ve diğerleri, 2015). Başka bir araştırmada ise LukS-PV'nin insan lösemi hücrelerinin farklılaşmasındaki potansiyel etkisini ve altta yatan mekanizmayı incelemişler ve insan akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinin farklılaşmasını indüklediğini bulmuşlardır. Ayrıca, LukS-PV, THP-1 ve HL-60 hücreleri için spesifik olarak anti-lösemi aktivitesine sahip olduğunu ancak A549, jurkat veya HeLa hücreleri için aktiviteye sahip olmadığını göstermişlerdir (Dai diğerleri, 2016). Zang ve arkadaşları; LukS-PV'nin insan akut miyeloid lösemi (AML) olan THP-1 ve HL-60 hücrelerinde apoptozu indüklediğini bulmuşlar ve bunun üzerine LukS-PV tarafından indüklenen lösemi hücrelerin apoptozunda C5aR rolünü araştırmışlardır. Bu sonucunda C5aR'nin aşırı ekspresyonu apoptozu artırdığını, ayrıca bu C5aR kanser hücrelerinde daha fazla ekspresyon olduğunu bundan dolayı ise tümör hücrelerin ilerlemesinde önemli rol oynadığını bulmuşlardır (Zhang diğerleri, 2019). Wang ve arkadaşlarının hepaselüler karsinom (HCC) hücreler üzerinde yaptığı çalışmalarda ise; LukS-PV'nin HCC hücrelerin hücre göçü üzerindeki etkisine bakmışlar ve hücre göçünü engellediğini buna bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ayrıca HCC hücre hatlarında konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptozu indüklediğini bulmuşlardır (Wang ve diğerleri, 2020; Ma ve diğerleri, 2020).

PVL, genellikle lösemi hücrelerinin üzerine etkisi araştırılmıştır ancak diğer kanser hücrelerin etkisine çok fazla bakılmamıştır. Özellikle prostat hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmada prostat hücreleri üzerindeki etkisini araştırdık. İlk olarak elde ettiğimiz rekombinat proteinleri daha önce etkisi olduğu bilinen makrofaj hücreleri üzerine denenmiş ve etkisini görülmüştür. Daha sonra prostat sağlıklı hücre ve prostat kanserli hücre üzerine etkisine bakılmıştır. Elde ettiğimiz rekombinant ürünlerin makrofaj üzerindeki etkisine baktığımızda rPVL ve LukS-PV makrofaj üzerinde sitotoksik etkisi görülmüş ancak LukF-PV makrofaj üzerinde çok fazla sitotoksik etkisi görülmemiştir. LukS-PV'nin sitotoksik olmasının sebebi hücre yüzeyinde bulunan C5aR reseptörüne bağlanmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. LukF-PV kendi başına makrofajlar üzerinde sitotoksik etkisi olmamasının sebebi ise LukS-PV'nin ortamda bulunmamasından dolayı kaynaklanmış olabilir. Daha sonra rekombinant ürünler RWP-1 (normal prostat hücre hattı) ve PC3(kanser hücre hattı) hücre hatları üzerinde etkilere bakıldığında ise RWP-1 ve PC3 üzerinde üretilen rekombinat ürünlerin sitotoksik etkisinin olmadığı ancak rPVL'nin diğer rekombinant ürünlerine göre sitotoksik oranının az da olsa fazla olduğu görülmüştür. Rekombinant LukS-PV ve LukF-PV hücreler üzerinde hiçbir sitotoksik etkisi görülmemiştir. Prostat hücre yüzeyinde PVL ait reseptör olmadığı için ya da saf şekilde uygulama yapılmadığı için etkisi görülmemiştir. Saf şekilde elde edilip tekrar uygulama yapılabilir. Ancak PC3 hücre hattında, hücrelerin yüzeyden kalktığı ancak PBS uygulanan hücrelerin kalkmadığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni bu rekombinant ürünlerin enzimatik aktivitesi veya daha önce belirtildiği gibi saf uygulanma yapılmadığı için olduğu düşünülmektedir. Bunun üzerine ayrı bir çalışma gerçekleştirilebilir ya da başka hücre hatları üzerinde etkisine bakılabilir ve etki mekanizması araştırılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser tedavisinde yeni ve umut verici yöntemler bulmaya yönelik çalışmalar sürmektedir. Bu çalışmada prostat hücre hattı üzerinde rekombinant rPVL, LukS-PV ve LukF-PV proteinlerinin sitotoksik etkisine bakılmıştır. Deney sonuçlarına bakıldığında makrofajlar üzerinden rPVL ve LukS-PV proteinlerin sitotoksik etkilerinin görülmesine rağmen prostat hücre hatları üzerinde bu proteinlerin sitotoksik etkisi görülmemiştir. Çalışma sonuçları “PVL prostat kanser hücre hattında sitotoksik etki gösterir” hipotezini doğrulamamıştır. Ancak ileri çalışmalarla sitotoksik bir protein olan PVL’nin diğer kanser hücre hatları üzerinde etkisi olup olmadığına bakılabilir. Sitotoksik proteinlerin üretimi konusunda edindiğimiz tecrübe ile bakterilerdeki diğer sitotoksik genlerin klonlanması, rekombinant olarak sentezlenmesi ve kanser hücre hatları üzerine etkisinin gözlenmesi, yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi için yapılacak araştırmalar için baz oluşturabilir.

KAYNAKLAR

Aarestrup, F. M., Larsen, H. D. , Eriksen, N. H. R. , Elsberg, C. S. , & Jensen, N. E. (1999). Frequency of α - and β - haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin: A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *Apmis*, 107(1- 6), 425-430.

Abraham, E. P. , & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146(3713), 837-837.

Alderson, M. R. , Tough, T. W. , Davis-Smith, T. , Braddy, S. , Falk, B. , Schooley, K. A. , Goodwin, R. G., Smith, C. A. , Ramsdell, F. , & Lynch, D. H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 181(1), 71–77. <https://doi.org/10.1084/jem.181.1.71>

Alonzo, F. , 3rd, Benson, M. A. , Chen, J. , Novick, R. P. , Shopsis, B. , & Torres, V. J. (2012). *Staphylococcus aureus* l kosidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo. *Molecular microbiology*, 83(2), 423–435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07942.x>

Alonzo, F. , 3rd, Kozhaya, L. , Rawlings, S. A. , Reyes-Robles, T. , DuMont, A. L. , Myszk, D. G. , Landau, N. R. , Unutmaz, D. , & Torres, V. J. (2013). CCR5 is a receptor for *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED. *Nature*, 493(7430), 51–55. <https://doi.org/10.1038/nature11724>

Amagai, M. , Yamaguchi, T. , Hanakawa, Y. , Nishifuji, K. , Sugai, M. , & Stanley, J. R. (2002). Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *The Journal of investigative dermatology*, 118(5), 845–850. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01751.x>

Aman, M. J. , Karauzum, H. , Bowden, M. G. , & Nguyen, T. L. (2010). Structural model of the pre-pore ring-like structure of Pantone-Valentine l kosidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 28(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/073911010010524952>

America Cancer Society, 2010

Ansiaux, R. , & Gallez, B. (2007). Use of botulinum toxins in cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(2), 209-218.

Badarau, A. , Rouha, H. , Malafa, S. , Logan, D. T. , Håkansson, M. , Stulik, L. , . . . & Nagy, E. (2015). Structure-function analysis of heterodimer formation, oligomerization, and receptor binding of the *Staphylococcus aureus* bi-component toxin LukGH. *Journal of Biological Chemistry*, 290(1), 142-156.

Bergdoll, M. S. , Crass, B. A. , Reiser, R. F. , Robbins, R. N. , & Davis, J. P. (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet (London, England)*, 1(8228), 1017–1021. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92186-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92186-3)

Berube, B. J. , & Bubeck Wardenburg, J. (2013). *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins*, 5(6), 1140–1166. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>

Bhakdi, S. , & Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological reviews*, 55(4), 733–751. <https://doi.org/10.1128/mr.55.4.733-751.1991>

Bhakdi, S. , Muhly, M. , Mannhardt, U. , Hugo, F. , Klapettek, K. , Mueller-Eckhardt, C. , & Roka, L. (1988). Staphylococcal alpha toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *The Journal of experimental medicine*, 168(2), 527–542. <https://doi.org/10.1084/jem.168.2.527>

Bjorn, M. J. , Groetsema, G. , & Scalapino, L. (1986). Antibody-Pseudomonas exotoxin A conjugates cytotoxic to human breast cancer cells in vitro. *Cancer Research*, 46(7), 3262-3267.

Bose, R. & Bose, K. (2022). A Brief Introduction to Recombinant DNA Technology. 10.1007/978-981-16-4987-5_1.

Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, 87(1), 3-9.

Boyle-Vavra, S., & Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. *Laboratory investigation*, 87(1), 3-9.

- Brumfitt, W. , & Hamilton-Miller, J. (1989). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine*, 320(18), 1188-1196.
- Bubeck Wardenburg, J. , Patel, R. J. , & Schneewind, O. (2007). Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infection and immunity*, 75(2), 1040–1044. <https://doi.org/10.1128/IAI.01313-06>
- Bukowski, M. , Wladyka, B. , & Dubin, G. (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, 2(5), 1148–1165. <https://doi.org/10.3390/toxins2051148>
- Casewell M. W. (1986). Epidemiology and control of the 'modern' methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of hospital infection*, 7 Suppl A, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(86\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0195-6701(86)90002-2)
- Cooney, J. , Kienle, Z. , Foster, T. J. , & O'Toole, P. W. (1993). The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of lōkosidin. *Infection and immunity*, 61(2), 768–771. <https://doi.org/10.1128/iai.61.2.768-771.1993>
- Costerton, J. W. , Lewandowski, Z. , Caldwell, D. E. , Korber, D. R. , & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49, 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Dai, C. , Zhang, C. , Sun, X. , Pan, Q. , Peng, J. , Shen, J. , & Ma, X. (2016). LukS-PV induces differentiation by activating the ERK signaling pathway and c-JUN/c-FOS in human acute myeloid leukemia cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 76, 107-114.
- Denys, J., & Van de Velde, H. (1895). Sur la production d'une antileucocidine chez les lapin vaccinés contre le *Staphylocoque pyogène*. *La Cellule*, 11, 359-72.
- Dinges, M. M. , Orwin, P. M. , & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 16-34.
- Doery, H. M. , Magnusson, B. J. , Gulasekharam, J. , & Pearson, J. E. (1965). The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *Journal of general microbiology*, 40(2), 283–296. <https://doi.org/10.1099/00221287-40-2-283>

Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Floret, D., ... & Richet, H. (2002). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clinical Infectious Diseases*, 35(7), 819-824.

Dumont, A. L. , Nygaard, T. K. , Watkins, R. L. , Smith, A. , Kozhaya, L. , Kreiswirth, B. N. , Shopsin, B. , Unutmaz, D. , Voyich, J. M. , & Torres, V. J. (2011). Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Molecular microbiology*, 79(3), 814–825. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07490.x>

DuMont, A. L., Yoong, P., Surewaard, B. G., Benson, M. A., Nijland, R., van Strijp, J. A., & Torres, V. J. (2013). *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infection and immunity*, 81(5), 1830-1841.

Duvic, M. , Kuzel, T. M. , Olsen, E. A. , Martin, A. G. , Foss, F. M. , Kim, Y. H. , . . . & Liepa, A. (2002). Quality-of-life improvements in cutaneous T-cell lymphoma patients treated with denileukin diftitox (ONTAK®). *Clinical lymphoma*, 2(4), 222-228.

Fackrell, H. B. , & Wiseman, G. M. (1976). Properties of the gamma haemolysin of *Staphylococcus aureus* ‘Smith 5R’. *Microbiology*, 92(1), 11-24.

Figueiredo, A. , Ferreira, F. A. , Beltrame, C. O. , & Côrtes, M. F. (2017). The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Critical reviews in microbiology*, 43(5), 602–620. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1282941>

Finck-Barbançon, V., Pre, G., & Pie, Y. (1991). Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Research in microbiology*, 142(1), 75-85.

Fleming A. (1929) “On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*”. *British Journal of Experimental Pathology* 10. 3, 226-236.

Flores-Díaz, M. , Monturiol-Gross, L. , Naylor, C. , Alape-Girón, A. , & Flieger, A. (2016). Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(3), 597–628. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00082-15>

Genestier, A. L. , Michallet, M. C. , Prévost, G. , Bellot, G. , Chalabreysse, L. , Peyrol, S. , . . . & Genestier, L. (2005). Staphylococcus aureus Panton-Valentine lökosidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 115(11), 3117-3127.

Glenny, A. T. , & Stevens, M. F. (1935). Staphy-lococcus Toxins and Antitoxins. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 40, 201-10.

Goldufsky, J. , Wood, S. , Hajihossainlou, B. , Rehman, T. , Majdobe, O. , Kaufman, H. L. , . . . & Shafikhani, S. H. (2015). Pseudomonas aeruginosa exotoxin T induces potent cytotoxicity against a variety of murine and human cancer cell lines. *Journal of medical microbiology*, 64(Pt 2), 164.

Gorwitz, R. J. , Kruszon-Moran, D. , McAllister, S. K. , McQuillan, G. , McDougal, L. K. , Fosheim, G. E. , Jensen, B. J. , Killgore, G. , Tenover, F. C. , & Kuehnert, M. J. (2008). Changes in the prevalence of nasal colonization with Staphylococcus aureus in the United States, 2001-2004. *The Journal of infectious diseases*, 197(9), 1226–1234. <https://doi.org/10.1086/533494>

Gouaux, J. E. , Braha, O. , Hobaugh, M. R. , Song, L. , Cheley, S. , Shustak, C. , & Bayley, H. (1994). Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12828–12831. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12828>

Grumann, D. , Nübel, U. , & Bröker, B. M. (2014). Staphylococcus aureus toxins--their functions and genetics. *Infection, genetics and evolution journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 21, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>

Grumann, D. , Nübel, U. , & Bröker, B. M. (2014). Staphylococcus aureus toxins--their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583-592.

Grumann, D. , Ruotsalainen, E. , Kolata, J. , Kuusela, P. , Järvinen, A. , Kontinen, V. P. , Bröker, B. M. , & Holtfreter, S. (2011). Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in Staphylococcus aureus bacteremia. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 18(3), 487–493. <https://doi.org/10.1128/CVI.00329-10>

Guyonnet F. , Plummet M. (1970). Staphylococcal gamma lysine. Purification and Properties. *Ann. Inst. Pasteur.* 118:19–33.

Harris, L. G. , Foster, S. J. , & Richards, R. G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European cells & materials*, 4, 39–60. <https://doi.org/10.22203/ecm.v004a04>

Higgins, N. P. , & Cozzarelli, N. R. (1979). DNA-joining enzymes: a review. *Methods in enzymology*, 68, 50–71. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)68006-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)68006-0)

Hildebrand, A. , Pohl, M. , & Bhakdi, S. (1991). *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *The Journal of biological chemistry*, 266(26), 17195–17200.

Holtfreter, S. , & Bröker, B. M. (2005). Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 53(1), 13–27.

Honeyman A. , Friedman H. Bendinelli M. (2006) *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Springer Science & Business Media; Berlin/Heidelberg, Germany

Howden, B. P. , Davies, J. K. , Johnson, P. D. , Stinear, T. P. , & Grayson, M. L. (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 99–139. <https://doi.org/10.1128/CMR.00042-09>

Huseby, M. J. , Kruse, A. C. , Digre, J. , Kohler, P. L. , Vocke, J. A. , Mann, E. E. , Bayles, K. W. , Bohach, G. A. , Schlievert, P. M. , Ohlendorf, D. H. , & Earhart, C. A. (2010). Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14407–14412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911032107>

Huseby, M. , Shi, K. , Brown, C. K. , Digre, J. , Mengistu, F. , Seo, K. S. , . . . & Earhart, C. A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8719–8726.

Ijaz, S., & Haq, I. U. (2019). *Recombinant DNA technology*. Cambridge Scholars Publishing.

- Jarraud, S. , Cozon, G., Vandenesch, F. , Bes, M. , Etienne, J. , & Lina, G. (1999). Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *Journal of clinical microbiology*, 37(8), 2446–2449. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.8.2446-2449.1999>
- Jarraud, S. , Mougél, C. , Thioulouse, J. , Lina, G , Meugnier, H. , Forey, F. , Nesme, X. , Etienne, J. , & Vandenesch, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*, 70(2), 631–641. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002>
- Jevons M. P. (1961). “Celbenin” - resistant *Staphylococci*. *British Medical Journal*, 1(5219), 124–125.
- Jiang, S. N. , Phan, T. X. , Nam, T. K. , Nguyen, V. H. , Kim, H. S. , Bom, H. S. , . . . & Min, J. J. (2010). Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of *Escherichia coli*–mediated cytolytic therapy and radiotherapy. *Molecular therapy*, 18(3), 635–642.
- Kachlany, S. C. (2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *Journal of dental research*, 89(6), 561–570.
- Kachlany, S. C. , Schwartz, A. B. , Balashova, N. V. , Hioe, C. E. , Tuen, M. , Le, A. , . . . & Rao, J. (2010). Anti-leukemia activity of a bacterial toxin with natural specificity for LFA-1 on white blood cells. *Leukemia research*, 34(6), 777–785.
- Kåhrström, C. T. (2013). Entering a post-antibiotic era?. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 146–146.
- Kamio, Y. , Rahman, A. , Nariya, H. , Ozawa, T. , & Izaki, K. (1993). The two *Staphylococcal* bi-component toxins, lōkosidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS letters*, 321(1), 15–18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80611-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80611-w)
- Kaneko, J., & Kamio, Y. (2004). Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(5), 981–1003.

- Katayama, Y. , Baba, T. , Sekine, M. , Fukuda, M. , & Hiramatsu, K. (2013). Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 195(6), 1194-1203.
- Khan, S. , ullah, M. W. , Siddique, R. , Nabi, G. , Manan, S. , Yousaf, M. , & Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International journal of genomics*, 2016.
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of recombinant DNA technology to improve life. *International journal of genomics*, 2016.
- Knox, K. W. , & Wicken, A. J. (1973). Immunological properties of teichoic acids. *Bacteriological reviews*, 37(2), 215–257. <https://doi.org/10.1128/br.37.2.215-257.1973>
- Kwiecinski, J. , Jin, T. , & Josefsson, E. (2014). Surface proteins of *Staphylococcus aureus* play an important role in experimental skin infection. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 122(12), 1240–1250. <https://doi.org/10.1111/apm.12295>
- Ladhani S. (2001). Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(6), 301–307. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00258.x>
- Ladhani S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 39(2), 181–189. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00225-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00225-6)
- Lee, C. Y. , Schmidt, J. J. , Johnson-Winegar, A. D. , Spero, L. , & Iandolo, J. J. (1987). Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 169(9), 3904–3909. <https://doi.org/10.1128/jb.169.9.3904-3909.1987>
- Lewis, D. J. , Dao, H. , Nagarajan, P. , & Duvic, M. (2017). Primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma: Complete remission for 13 years after denileukin diftitox. *JAAD Case Reports*, 3(6), 501-504.

- Licitra G. (2013). Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerging Infectious Diseases*, 19(9), 1553. <https://doi.org/10.3201/eid1909.ET1909>
- Lina, G. , Bohach, G. A. , Nair, S. P. , Hiramatsu, K. , Jouvin-Marche, E. , & Mariuzza, R. A. (2004). Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of infectious diseases*, 189 12, 2334-6 .
- Liu, X. , Heitz, P. , Roux, M. , Keller, D. , Bourcier, T. , Sauer, A. , . . . & Gaucher, D. (2018). Pantone–Valentine Lökosidin Colocalizes with Retinal Ganglion and Amacrine Cells and Activates Glial Reactions and Microglial Apoptosis. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Lowy F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine*, 339(8), 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
- LYELL, A. (1967). A review of toxic epidermal necrolysis in Britain. *British Journal of Dermatology*, 79(12), 662-671.
- LYELL, A. (1979). Toxic epidermal necrolysis (the scalded skin syndrome): a reappraisal. *British Journal of Dermatology*, 100(1), 69-86.
- Ma, F. , Wang, Z. , Qiang, Y. , Xu, L. , Ding, P. , Wang, Y. , & Ma, X. (2020). LukS-PV inhibits hepatocellular carcinoma cells migration via the TNNC1/PI3K/AKT axis. *OncoTargets and therapy*, 13, 10221.
- Madhaiyan, M. , Wirth, J. S. , & Saravanan, V. S. (2020). Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov. , and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5926-5936.
- Mainous, A. G. , 3rd, Hueston, W. J. , Everett, C. J. , & Diaz, V. A. (2006). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. *Annals of family medicine*, 4(2), 132–137. <https://doi.org/10.1370/afm.526>
- Manohar, M. , Maheswaran, S. K. , Frommes, S. P. , & Lindorfer, R. K. (1967). Platelet damaging factor, a fifth activity of staphylococcal alpha-toxin. *Journal of bacteriology*, 94(1), 224–231. <https://doi.org/10.1128/jb.94.1.224-231.1967>

- Mariutti, R. B. , Tartaglia, N. R. , Seyffert, N. , de Paula Castro, T. , Arni, R. K. , Azevedo, V. A. , Le Loir, Y. , & Nishifuji, K. (2017). Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. In S. Enany, & L. E. C. Alexander (Eds.), *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in <i>Staphylococcus aureus</i>*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66528>
- McCormick, J. K. , Yarwood, J. M. , & Schlievert, P. M. (2001). Bacterial superantigens and toxic shock syndrome: an update. *Annu. Rev. Microbiol*, 55, 77.
- McKevitt, A. I. , Bjornson, G. L. , Mauracher, C. A. , & Scheifele, D. W. (1990). Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity*, 58(5), 1473–1475. <https://doi.org/10.1128/iai.58.5.1473-1475.1990>
- Mehlin, C. , Headley, C. M. , & Klebanoff, S. J. (1999). An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *The Journal of experimental medicine*, 189(6), 907-918.
- Melehani, J. H. , James, D. B. , DuMont, A. L. , Torres, V. J. , & Duncan, J. A. (2015). *Staphylococcus aureus* Lökosidin A/B (LukAB) Kills Human Monocytes via Host NLRP3 and ASC when Extracellular, but Not Intracellular. *PLoS pathogens*, 11(6), e1004970. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004970>
- Melish, M. E. , Glasgow, L. A. , & Turner, M. D. (1972). The staphylococcal scalded-skin syndrome: isolation and partial characterization of the exfoliative toxin. *The Journal of infectious diseases*, 125(2), 129–140. <https://doi.org/10.1093/infdis/125.2.129>
- Melish, M. E. , & Glasgow, L. A. (1971). Staphylococcal scalded skin syndrome: the expanded clinical syndrome. *The Journal of pediatrics*, 78(6), 958–967. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(71\)80425-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(71)80425-0)
- Michl, P. , Buchholz, M. , Rolke, M. , Kunsch, S. , Löhr, M. , McClane, B. , . . . & Gress, T. M. (2001). Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology*, 121(3), 678-684.
- Morinaga, N. , Kaihou, Y. , & Noda, M. (2003). Purification, cloning and characterization of variant Luke-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiology and immunology*, 47(1), 81–90. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb02789.x>

Narita, S., Kaneko, J., Chiba, J. I., Piémont, Y., Jarraud, S., Etienne, J., & Kamio, Y. (2001). Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, ϕ SLT. *Gene*, 268(1-2), 195-206.

National cancer information center, 2015

Nauts, H. C. (1980). The Beneficial Effects of Bacterial Infections on Host Resistance to Cancer End Results in 449 Cases: A Study and Abstracts of Reports in the World Med. Literature (1775-1980) and Personal Communications. Cancer Research Inst.

Neisser, M., & Wechsberg, F. (1901). Ueber das staphylotoxin. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 36(1), 299-349.

Nejabat, M., Khashei, R., Bazargani, A., Ebrahim-Saraie, H. S., & Motamedifar, M. (2015). Evaluation of high-level of mupirocin resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Shiraz, Iran (2008-2009). *Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 225-228.

Nishifuji, K. , Sugai, M. , & Amagai, M. (2008). Staphylococcal exfoliative toxins: “molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. *Journal of dermatological science*, 49(1), 21-31.

Nougayrède, J. P. , Taieb, F. , De Rycke, J. , & Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends in microbiology*, 13(3), 103-110.

Nygaard, T. K. , Pallister, K. B. , DuMont, A. L. , DeWald, M. , Watkins, R. L. , Pallister, E. Q. , Malone, C. , Griffith, S. , Horswill, A. R. , Torres, V. J. , & Voyich, J. M. (2012). Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PloS one*, 7(5), e36532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036532>

Oliveira, D. , Borges, A. , & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10(6), 252.

Oliveira, W. F. , Silva, P. , Silva, R. , Silva, G. , Machado, G. , Coelho, L. , & Correia, M. (2018). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. *The Journal of hospital infection*, 98(2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>

Ono, H. K. , Omoe, K. , Imanishi, K. , Iwakabe, Y. , Hu, D. L. , Kato, H. , Saito, N. , Nakane, A. , Uchiyama, T. , & Shinagawa, K. (2008). Identification and characterization of

two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infection and immunity*, 76(11), 4999–5005. <https://doi.org/10.1128/IAI.00045-08>

Otto M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>

Otto M. (2014). Staphylococcus aureus toxins. *Current opinion in microbiology*, 17, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>

Pahle, J. , Menzel, L., Niesler, N. , Kobelt, D. , Aumann, J. , Rivera, M. , & Walther, W. (2017). Rapid eradication of colon carcinoma by Clostridium perfringens Enterotoxin suicidal gene therapy. *BMC cancer*, 17(1), 1-14.

Parker, M. W. , & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in biophysics and molecular biology*, 88(1), 91-142.

Parker, M. T. , & Jevons, M. P. (1964). A Survey Of Methicillin Resistance IN Staphylococcus Aureus. *Postgraduate medical journal*, 40(Suppl), 170–178. <https://doi.org/10.1136/pgmj.40.suppl.170>

Patyar, S. , Joshi, R. , Byrav, D. P. , Prakash, A. , Medhi, B. , & Das, B. K. (2010). Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of biomedical science*, 17(1), 21.

Peschel, A. , & Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature reviews. Microbiology*, 11(10), 667–673. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3110>

Popov L, Kovalski J, Grandi G, Bagnoli F, Amieva MR. Three-Dimensional Human Skin Models to Understand Staphylococcus aureus Skin Colonization and Infection. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:41. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00041. PMID: 24567733; PMCID: PMC3915142.

Powers, M. E. , Kim, H. K. , Wang, Y. , & Bubeck Wardenburg, J. (2012). ADAM10 mediates vascular injury induced by Staphylococcus aureus α -hemolysin. *The Journal of infectious diseases*, 206(3), 352–356. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis192>

Prévost, G. , Cribier, B. , Couppié, P. , Petiau, P. , Supersac, G. , Finck-Barbançon, V. , Monteil, H. , & Piemont, Y. (1995). Panton-Valentine l kosidin and gamma-hemolysin from Staphylococcus aureus ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different

biological activities. *Infection and immunity*, 63(10), 4121–4129. <https://doi.org/10.1128/iai.63.10.4121-4129.1995>

Prévost, G. , Mourey, L. , Colin, D. A. , Monteil, H. , Serra, M. D. , & Menestrina, G. (2006). The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins.

Proft, T. , & Fraser, J. D. (2003). Bacterial superantigens. *Clinical & Experimental Immunology*, 133(3), 299-306.

Projan, S. J. , Kornblum, J. , Kreiswirth, B. , Moghazeh, S. L. , Eisner, W. , & Novick, R. P. (1989). Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic acids research*, 17(8), 3305. <https://doi.org/10.1093/nar/17.8.3305>

Rasigade, J. P. , & Vandenesch, F. (2014). *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 21, 510–514. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.018>

Rautenberg, M. , Joo, H. S. , Otto, M. , & Peschel, A. (2011). Neutrophil responses to staphylococcal pathogens and commensals via the formyl peptide receptor 2 relates to phenol-soluble modulins release and virulence. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(4), 1254–1263. <https://doi.org/10.1096/fj.10-175208>

Rellahan, B. L. , Jones, L. A. , Kruisbeek, A. M. , Fry, A. M. , & Matis, L. A. (1990). In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *The Journal of experimental medicine*, 172(4), 1091-1100.

Richardson, M. A. , Ramirez, T. , Russell, N. C. , & Moye, L. A. (1999). Coley toxins immunotherapy: a retrospective review. *Alternative therapies in health and medicine*, 5(3), 42.

Ritter, V. R. (1878). Die exfoliative dermatitis jüngerer Säulinge. *Cent. Z. Kinderheilkd*, 2, 3-23.

Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (Eds.). (2014). The prokaryotes: other major lineages of Bacteria and the Archaea.

- Ross, J. E. , Farrell, D. J. , Mendes, R. E. , Sader, H. S. , & Jones, R. N. (2011). Eight-year (2002-2009) summary of the linezolid (Zyvox® Annual Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) program in European countries. *Journal of chemotherapy*, 23(2), 71-76.
- Seilie, E. S. , & Bubeck Wardenburg, J. (2017). Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Seminars in cell & developmental biology*, 72, 101–116. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.003>
- Shan, W., Bu, S., Zhang, C., Zhang, S., Ding, B., Chang, W., Dai, Y., Shen, J., & Ma, X. (2015). LukS-PV, a component of Pantón-Valentine leukocidin, exerts potent activity against acute myeloid leukemia in vitro and in vivo. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 61, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.007>
- Shockman, G.D. , & Barrett, J. F. (1983). Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*, 37, 501–527. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.002441>
- Shukla, S. K. , Karow, M. E. , Brady, J. M., Stemper, M. E. , Kislow, J. , Moore, N. , Wroblewski, K. , Chyou, P. H. , Warshauer, D. M., Reed, K. D. , Lynfield, R. , & Schwan, W. R. (2010). Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 Staphylococcus aureus isolates. *Journal of clinical microbiology*, 48(10), 3582–3592. <https://doi.org/10.1128/JCM.00657-10>
- Smith, M. L. and Price, S. A. (1938), Staphylococcus γ hæmolysin. *J. Pathol.* 47: 379-393. <https://doi.org/10.1002/path.1700470303>
- Song, L. , Hobaugh, M. R. , Shustak, C. , Cheley, S. , Bayley, H. , & Gouaux, J. E. (1996). Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294), 1859-1865.
- Spaan, A. N. , Henry, T. , Van Rooijen, W. J. , Perret, M. , Badiou, C. , Aerts, P. C. , . . . & van Strijp, J. A. (2013). The staphylococcal toxin Pantón-Valentine Lökösidin targets human C5a receptors. *Cell host & microbe*, 13(5), 584-594.
- Spaan, A. N. , Reyes-Robles, T. , Badiou, C. , Cochet, S. , Boguslawski, K. M. , Yoong, P. , . . . & Torres, V. J. (2015). Staphylococcus aureus targets the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) to lyse erythrocytes. *Cell host & microbe*, 18(3), 363-370.

Spaan, A. N. , Schiepers, A. , De Haas, C. J. , Van Hooijdonk, D. D. , Badiou, C. , Contamin, H. , . . . & Van Strijp, J. A. (2015). Differential interaction of the staphylococcal toxins Panton–Valentine leukocidin and γ -hemolysin CB with human C5a receptors. *The Journal of Immunology*, 195(3), 1034-1043.

Spaan, A. N. , Vrieling, M. , Wallet, P. , Badiou, C. , Reyes-Robles, T. , Ohneck, E. A. , . . . & Henry, T. (2014). The staphylococcal toxins γ -haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nature communications*, 5(1), 1-11.

Tajima, A. , Iwase, T. , Shinji, H. , Seki, K. , & Mizunoe, Y. (2009). Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infection and immunity*, 77(1), 327-334.

Taylor, T. A. , & Unakal, C. G. (2021). *Staphylococcus aureus*. *StatPearls [Internet]*.

Tong, S. Y. , Davis, J. S. , Eichenberger, E. , Holland, T. L. , & Fowler, V. G. , Jr (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

Tsiodras, S. , Gold, H. S. , Sakoulas, G. , Eliopoulos, G. M. , Wennersten, C. , Venkataraman, L. , . . . & Ferraro, M. J. (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 358(9277), 207-208.

Van de Velde, H. (1894). Etude sur le mécanisme de la virulence du *Staphylocoque pyogene*. *La Cellule*, 10, 401-410.

Van der Goot, G. (Ed.). (2001). *Pore-forming toxins* (Vol. 257). Springer Science & Business Media.

Ventura, C. L., Malachowa, N., Hammer, C. H., Nardone, G. A., Robinson, M. A., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2010). Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PloS one*, 5(7), e11634.

Walev, I. , Weller, U. , Strauch, S. , Foster, T. , & Bhakdi, S. (1996). Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 64(8), 2974–2979. <https://doi.org/10.1128/iai.64.8.2974-2979.1996>

Wang, R. , Braughton, K. R. , Kretschmer, D. , Bach, T. H. , Queck, S. Y. , Li, M. , Kennedy, A. D. , Dorward, D. W. , Klebanoff, S. J. , Peschel, A. , DeLeo, F. R. , & Otto, M. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature medicine*, 13(12), 1510–1514. <https://doi.org/10.1038/nm1656>

Wang, Z. , Yu, W. , Qiang, Y. , Xu, L. , Ma, F. , Ding, P. , . . . & Ma, X. (2020). LukS-PV inhibits hepatocellular carcinoma progression by downregulating HDAC2 expression. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 17, 547-561.

Williamson, S. C. , Hartley, A. E. , & Heer, R. (2013). A review of tasquinimod in the treatment of advanced prostate cancer. *Drug design, development and therapy*, 7, 167.

Wilson, G. J. , Seo, K. S. , Cartwright, R. A. , Connelley, T. , Chuang-Smith, O. N. , Merriman, J. A. , Guinane, C. M. , Park, J. Y. , Bohach, G. A. , Schlievert, P. M. , Morrison, W. I. , & Fitzgerald, J. R. (2011). A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS pathogens*, 7(10), e1002271. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002271>

Woodin, A.M. (1960) Purification of the Two Components of Leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal*, 75, 158-165. <https://doi.org/10.1042/bj0750158>

World Health Organization, 2020

Wu, B. , Zhang, W. , Huang, J. , Liu, H. , & Zhang, T. (2010). Effect of recombinant Pantón–Valentine leukocidin in vitro on apoptosis and cytokine production of human alveolar macrophages. *Canadian journal of microbiology*, 56(3), 229-235.

Yamaguchi, T. , Nishifuji, K. , Sasaki, M. , Fudaba, Y. , Aepfelbacher, M. , Takata, T. , Ohara, M. , Komatsuzawa, H. , Amagai, M. , & Sugai, M. (2002). Identification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin-producing island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and immunity*, 70(10), 5835–5845. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5835-5845.2002>

Yamashita, K. , Kawai, Y. , Tanaka, Y. , Hirano, N. , Kaneko, J. , Tomita, N. , . . . & Tanaka, I. (2011). Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the

β -barrel pore formation mechanism by two components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), 17314-17319.

Yoong, P. , & Torres, V. J. (2013). The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Current opinion in microbiology*, 16(1), 63-69.

YOSHIDA A. (1963). Staphylococcal delta-hemolysin. I. Purification and chemical properties. *Biochimica et biophysica acta*, 71, 544–553. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)91126-0](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91126-0)

Zhang, P. , Yu, W. W. , Peng, J. , Xu, L. F. , Zhao, C. C. , Chang, W. J. , & Ma, X. L. (2019). LukS- PV induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells mediated by C5a receptor. *Cancer medicine*, 8(5), 2474-2483.

