

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI HABİTATLARDAN İZOLE EDİLEN AKTİNOMİSET
GENOMLARINDA YENİ İLAÇ ADAYLARININ TARANMASI**

Süleyman ÖZAKIN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

DİYARBAKIR

Eylül 2015

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI HABİTATLARDAN İZOLE EDİLEN AKTİNOMİSET
GENOMLARINDA YENİ İLAÇ ADAYLARININ TARANMASI**

Süleyman ÖZAKIN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

DIYARBAKIR

Eylül 2015

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DIYARBAKIR

Süleyman ÖZAKIN tarafından yapılan “Farklı Habitatlardan İzole Edilen Aktinomiset Genomlarında Yeni İlaç Adaylarının Taranması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri

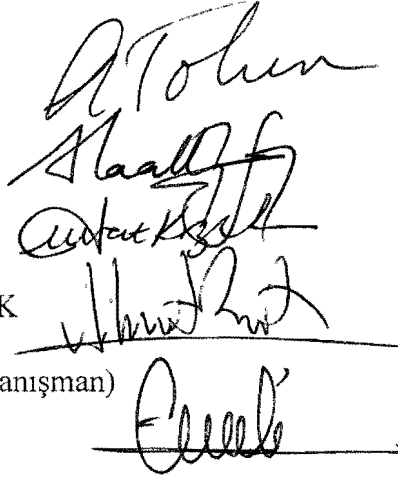
Başkan: Prof. Dr. Aslı TOLUN

Üye : Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Üye : Prof. Dr. Murat KIZIL

Üye : Prof. Dr. Murat BİRİCİK

Üye : Doç. Dr. Ebru İNCE (Danışman)



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 18/09/2015

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../201..

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca tecrübesini, her anlamda yardımını, ilgisini, bilgisini esirgemeyen ve danışmanım olmasından dolayı şanslı olduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Ebru İNCE'ye sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki araştırmalarımda destek ve yardımlarından dolayı Kaliforniya Üniversitesi Scripps Deniz Bilimleri Enstitüsü Deniz Biyoteknolojisi ve Biyotıp Merkezinden Dr. Paul R. JENSEN'e teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında değerli bilgi ve tecrübesini esirgmeden yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Dicle Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden kıymetli hocam Prof. Dr. Murat KIZIL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez jüri üyelerinden Prof. Dr. Aslı Tolun'a, Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e, Prof. Dr. Murat KIZIL'a, Prof. Dr. Murat BİRİCİK ve Prof. Dr. Ebru İNCE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Selçuk ERTEKİN'e teşekkür ederim.

Sitotoksitite deneylerinin gerçekleştirildiği Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden sayın hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e ve Moleküler Biyokimya Laboratuvarı araştırmacılarından Gurbet ÇELİK'e emeklerinden ötürü teşekkür ederim.

Kimyasal yapı tayini çalışmalarındaki emek ve çabalarından ötürü Villanova Üniversitesi (PA, ABD) Kimya Bölümünden Dr. Thomas P. UMILE, Dr. Kevin P.C. MINBIOLE ve Dr. Robert W. DAVIS'e teşekkürü bir borç bilirim.

Hesaplamalı kimya çalışmalarındaki yardım ve desteklerinden ötürü Dicle Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden kıymetli hocam Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇCIOĞLU'na teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden ötürü Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a teşekkür ederim.

Her daim yardım ve desteğini esirgemeyen değerli dostlarım Hayrettin DİNÇ'e ve Fırat ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım İsmail ACER'e, Bülent BALI'ye, İlknur PORSUK'a, Ekrem KUM'a ve Ömer ACER'e teşekkür ederim. Biyoorganik Araştırma Laboratuvarı çalışma arkadaşlarım Dr. Bircan TOPTANCI, Dr. Sevil EMEN TANRIKUT, Dr. Sevcan ALTAŞ ve Veysel GÜZEL'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

26.05.2014-26.05.2015 tarihleri arasındaki yurt dışı çalışmalarına 2214/A programı ve 109T843 nolu proje ile maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK BİDEB ve TBAG'ye teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgmeden her türlü zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme sevgi ve saygıyla en içten şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
	<u>No</u>
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
ÇİZELGE LİSTESİ.....	XII
RESİM LİSTESİ.....	XIII
KISALTIMA ve SİMGELER.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri.....	1
1.1.1. <i>Streptomyces</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	3
1.1.2. <i>Salinispora</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	4
1.2. Doğal Ürünler.....	7
1.3. Mikrobiyal Doğal Ürünler.....	9
1.4. Aktinomisetlerin Doğal Ürünleri.....	10
1.4.1. Ribozomal Olmayan Peptidler (NRP).....	11
1.4.2. Poliketid Bileşikler (PK).....	11
1.5. Doğal Ürün Biyosentez Mekanizmaları.....	12
1.5.1. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS).....	12
1.5.2. Poliketid Sentazlar (PKS).....	14
1.6. Doğal Ürün Tarama Stratejileri.....	17
1.6.1. Kimyasal Tarama Yöntemi.....	19
1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Temelli Tarama Yöntemi.....	19
1.6.3. Genom Tarama (Genome Mining) Yöntemi.....	20
1.6.3.1. Kütle Spektroskopisi Temelli (MS) Genom Taraması.....	21
1.6.4. Moleküler Ağ (Network) Analizi.....	25
1.7. Antibiyotik Dirençliliği.....	27
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	29
3. MATERYAL ve METOT.....	45
3.1. Materyal.....	45
3.1.1. Biyolojik Materyal.....	45

3.1.1.1	<i>Streptomyces</i> İzolatları.....	45
3.1.1.2	<i>Salinispora</i> İzolatları.....	46
3.1.1.3.	Antimikrobiyal Aktivite Test Organizmaları.....	48
3.1.2	Kullanılan Çözeltiler.....	49
3.1.2.1.	Tris-HCl Sükröz EDTA (TSE).....	49
3.1.2.2.	Tris-baz Asetik Asit EDTA (TAE, 50x).....	49
3.1.3.	Kullanılan Besiyerleri.....	49
3.1.4.	DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	51
3.1.5.	Agaroz jel Elektroforezi İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	51
3.1.6.	Kullanılan Enzimler.....	51
3.1.7.	Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Gerekli Kimyasallar.....	52
3.1.8.	Jelden DNA'nın Geri Kazanılması İçin Kullanılan Malzemeler.....	52
3.1.9	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması İçin Kullanılan Malzemeler.....	52
3.1.10.	Ligasyon İçin Kullanılan Malzemeler.....	52
3.1.11.	Transformasyon ve Rekombinant Seçimi İçin Kullanılan Kimyasallar....	53
3.1.12.	Plazmid İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar.....	53
3.1.13.	Restrüksiyon enzimleri.....	53
3.1.14.	Doğal Ürün Safılaştırmada Kullanılan Malzemeler.....	53
3.1.15.	DPPH Radikali Söndürme Aktivitesinde Kullanılan Kimyasallar.....	53
3.1.16.	LC/MS Analizlerinde Kullanılan Kimyasallar.....	53
3.1.17	Sitotoksite Testinde Kullanılan Kimyasallar.....	54
3.1.18.	Kullanılan Cihazlar.....	54
3.2.	METOT	54
3.2.1.	Organizmaların Üretilmesi.....	54
3.2.2.	Kromozomal DNA İzolasyonu.....	55
3.2.3.	<i>Streptomyces</i> İzolatlarının NRPS Geninin A Domainin Amplifikasyonu.....	55
3.2.4.	<i>Streptomyces</i> İzolatlarının PKS-I Geninin KS Domainin Amplifikasyonu.....	56
3.2.5.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	57
3.2.6.	Jelden PCR Ürünlerinin Geri Kazanılması.....	57
3.2.7.	<i>E. coli</i> DH5- α Kompetent Hücrelerin Hazırlanışı.....	57
3.2.8.	PCR Ürünlerinin Ligasyonu.....	58
3.2.9.	Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Seçimi.....	58
3.2.10.	Plazmid İzolasyonu.....	58
3.2.11.	Plazmidlerin Restrüksiyon Enzimleri İle Kesilerek DNA Dizi Analizi	58

	Öncesinde Gruplandırılması.....	
3.2.12.	DNA Dizi Analizi.....	59
3.2.13.	Biyoinformatik İncelemeler.....	59
3.2.14.	<i>Streptomyces</i> sp. CAH29'un Üretilmesi ve Doğal Ürünlerini Ekstraksiyonu.....	59
3.2.15.	Kolon Kromatografisi ile Biyoaktif Bileşiğin Saflaştırılması.....	60
3.2.16.	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC).....	61
3.2.17.	Yapı Aydınlatma Çalışmaları.....	62
3.2.18.	Disk Difüzyon Yöntemi İle Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini.....	62
3.2.19.	DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi.....	63
3.2.20.	Sitotoksikite Testi.....	64
3.2.21.	Docking Analizleri.....	64
3.2.22.	<i>Salinispora</i> İzolatlarının Doğal Ürün Biyosentez Gen Kümelerinin Biyoinformatik Programlardan İncelenmesi.....	65
3.2.23.	<i>Salinispora</i> İzolatlarının Üretilmesi ve Doğal Ürünlerinin Ekstraksiyonu.....	65
3.2.24.	<i>Salinispora</i> İzolatlarının Doğal Ürünlerinin LC/MS/MS Analizleri.....	65
3.2.25.	GNPS Dereplikasyon ve Moleküler Network Analizleri.....	66
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	67
4.1.	Bulgular	67
4.1.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	67
4.1.2.	NRPS ve PKS-I Genlerini <i>Streptomyces</i> Genomlarında PCR İle Taranması.....	67
4.1.2.1.	NRPS Geni A Domaini PCR Optimizasyonları.....	67
4.1.2.2.	PKS-I Geni KS Domaini PCR Optimizasyonları.....	73
4.1.3.	PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması.....	76
4.1.4.	PCR Ürünlerinin Klonlanması ve Gen Kütüphanelerinin Kurulması.....	76
4.1.4.1.	Pütatif NRPS Geni A Domainlerinin Klonlanması.....	76
4.1.4.2.	Pütatif PKS-I Geni KS Domainlerinin Klonlanması.....	77
4.1.5.	Biyoinformatik İncelemeler.....	77
4.1.5.1.	NRPS A Domainlerinin Biyoinformatik Analizleri.....	78
4.1.5.2.	PKS-I KS Domainlerinin Biyoinformatik Analizleri.....	103
4.1.6.	<i>Streptomyces</i> sp. CAH29 İzolatının Biyoaktif Doğal Ürünün Kimyasal Yapısının Aydınlatılması.....	109
4.1.7.	<i>Tetragomycin</i> 'in Biyolojik Aktivitesi.....	111
4.1.7.1.	<i>Tetragomycin</i> 'in Antimikrobiyal Aktivitesi.....	111
4.1.7.2.	<i>Tetragomycin</i> 'in DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi.....	112
4.1.7.3.	<i>Tetragomycin</i> 'in Sitotoksik Aktivitesi.....	114

4.1.7.4.	<i>Tetragomycin</i> 'in Docking Analizi.....	114
4.1.8.	<i>Salinispora</i> İzolatlarının Doğal Ürüne Biyosentez Gen Kümelerinin Biyoinformatik Programlardan İncelenmesi.....	116
4.1.9.	<i>Salinispora</i> İzolatlarının GNPS Dereplikasyon ve Network Analizleri.....	120
4.1.9.1.	GNPS Dereplikasyon Analizi.....	120
5.1.5.	GNPS Network Analizi.....	121
4.1.10.	MS Tabanlı Genom Taraması.....	125
4.1.10.1.	'A' Kümesinin MS Tabanlı Genom Taraması.....	125
4.1.10.2.	'B' Kümesinin MS Tabanlı Genom Taraması.....	132
4.1.10.3.	'C' Kümesinin MS Tabanlı Genom Taraması.....	133
4.1.10.4.	'D' Kümesinin MS Tabanlı Genom Taraması.....	135
4.2.	Tartışma	137
4.2.1.	<i>Streptomyces</i> İzolatu Genomlarında NRPS ve PKS-I Genlerinin Taranması.....	137
4.2.2.	<i>Tetragomycin</i> ve Biyolojik Aktivitesi.....	141
4.2.3.	<i>Salinispora</i> İzolatlarının Doğal Ürün Biyosentez Gen Kümelerinin Biyoinformatik Programlarda İncelenmesi.....	149
4.2.4.	<i>Salinispora</i> İzolatlarının GNPS Dereplikasyon ve Network Analizleri.....	151
5.	SONUÇLAR	155
6.	KAYNAKLAR	157
	ÖZGEÇMİŞ	172

ÖZET

FARKLI HABİTATLARDAN İZOLE EDİLEN AKTİNOMİSET GENOMLARINDA YENİ İLAÇ ADAYLARININ TARANMASI

DOKTORA TEZİ
Süleyman ÖZAKIN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2015

Yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi için, biyoteknolojik potansiyele sahip doğal ürünlerin mikroorganizmalardan eldesi son zamanlarda oldukça ilgi uyandıran bir araştırma konusudur. Karasal ve sucul habitatlardan izole edilen aktinomisetler yeni biyoaktif doğal ürünlerin keşfi için önemli kaynaklardan biridir. Bu potansiyellerinden ötürü aktinomiset genomlarında doğal ürün biosentez genlerinin taranması en güncel yaklaşımlardan biridir. Son yıllarda doğal ürün araştırmalarında farklı yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden biri dejenere polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) primerleri ile doğal ürünlerin biosentetik gen kümelerinin taranmasıdır, diğeri ise genom dizilimi bilinen izolatlarda doğal ürün gen kümelerine ait biyoinformatik verilerin, kimyasal verilerle birlikte değerlendirilmesi ilkesine dayalı kütle spektroskopisi (MS) temelli genom taramalarıdır.

Bu çalışmada karasal (*Streptomyces*) ve deniz (*Salinispora*) aktinomisetlerinin doğal ürün gen kümelerinin sırasıyla, PCR ve MS temelli genom tarama yöntemleri ile taranması sonucunda hem genetiksel hem de kimyasal olarak doğal ürün sentezleme potansiyelleri araştırıldı. Çalışmanın ilk kısmında endemik bitki kök çevresi *Streptomyces* izolatlarının NRPS ve PKS-I genlerinin sırasıyla, adenilasyon (A) ve ketosentaz (KS) domainleri, dejenere primerler kullanılarak PCR ile tarandı. PCR amplifikasyonları, klonlama ve DNA dizi analizleri sonucunda izolatların tümünün (altmış beş) genomunda A domaini, yaklaşık % 80'inin de ise KS domaini tespit edildi. A ve KS domaini DNA dizilimlerinin BLASTX analizlerine göre, elde edilen NRPS fragmentlerinin %34'ünün, PKS fragmentlerinin ise %56'sının Genbankasındaki en yakın akrabaları ile %70'in altında benzerlik gösterdiği görüldü. Özellikle, NRPS A domainlerinin büyük bir çeşitliliğe sahip olması bunların, farklı biosentetik metabolik yolların sentezinde görev aldığını düşündürdü. Ayrıca A domain veri tabanında incelenen klonların büyük bir bölümünde A domain motiflerinin substratları ilgili program tarafından tahmin edilemedi. Bu bulgu ilgili A domainlerinin yeni aminoasitleri substrat olarak tanıyabileceği anlamına gelmektedir. Bununla ilişkili olarak yeni NRPS ürünü olabileceğini düşündürmektedir.

Zorunlu deniz aktinomisetlerinden *Salinispora* cinsi üyeleri doğal ürün araştırmalarında kullanılan model mikroorganizmalardandır. Genom dizilimi bilinen otuz *Salinispora* izolatının genomları, doğal ürün gen kümelerini araştırmak için MS temelli genom tarama yöntemi ile tarandı. Biyoinformatik incelemeler sonucunda izolatların NRPS, PKS, terpen, indol, lantibiyotik, aminoglizokit ve siderefor gibi farklı doğal ürün ailelerine ait bileşikleri sentezleyebilme potansiyeline sahip oldukları tespit edildi. Bununla birlikte; hem dereplikasyon hem de kimyasal network analizleri için, *Salinispora* izolatı ham ekstraktlarından elde edilen sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi (LC/MS/MS) verileri, GNPS (Global Natural Product Society) veritabanında incelendi. Dereplikasyon analizleri sonucunda *lomaiviticin C*, *7-OH-staurosporine*, *staurosporine* ve *cyanosporaside B* doğal ürünlerinin izolatların ekstraktlarında bulunduğu tespit edildi. Ayrıca moleküler network analizleri ile izolatlara ait 1347 MS/MS

verisinin spektral benzerliği incelendi. Bu inceleme sonucunda *Salinispora tropica* CNT250, *Salinispora pacifica* CNY703, *Salinispora arenicola* CNY299 ve *Salinispora arenicola* CNY011 izolatlarına ait spesifik MS/MS spektrumları biyoinformatik veriler ile birlikte değerlendirildi. Kimyasal ve biyoinformatik değerlendirmeler sonucunda *S. pacifica* CNY703'un kùltür ortamında glikolize bir bileşige ve bu bileşigin sentezinden sorumlu olduğu düşünùlen NRPS-PKS-I gen kümesine ulaşıldı. Bu gen kümesinin sentezlediği bileşigin yapı aydınlatma çalışmalarını devam etmektedir.

Antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda karasal izolatlardan *Streptomyces* sp. CAH29'un güçlü ve geniş spektrumda biyoaktif doğal ürün sentezleme potansiyeli tespit edilmişti. Bu sebepten dolayı, bu izolatın kùltür ortamındaki biyoaktif bileşiklerinin saflaştırması, kimyasal yapı analizi ve değişik biyolojik aktivite testi çalışmalarını gerçekleştirildi. Spektroskopik analizler sonucunda biyoaktif bileşigin *tetrangomycin* olduğu tespit edildi. Antrakinin yapısındaki bu bileşigin *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, methicillin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı, sırasıyla 14, 10, 12 ve 8 mm'lik inhibisyon zonları ile antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Ayrıca *tetrangomycin*'in insan prostat kanseri (LNCaP) ve alveolar adenokarsinoma (A549) hücreleri üzerine sitotoksik etkisi yanısıra, düşük oranda DPPH radikalini söndürme etkisi olduğu gözlemlendi. *Staphyloxanthin* sentezinin ilk aşamasında dehidrosqualen sentaz (CrtM) enzimi görev almaktadır. *Tetrangomycin*'in anti-MRSA etkisinin incelenmesi amacıyla CrtM enzimi ile Docking analizleri gerçekleştirildi. Bu analizler sonucunda *tetrangomycin* ve pozitif kontrol dipotasyum (2-okso-2-{{3-(3-fenoksifenil) propil} amino}etil fosfonat) (830) ligandlarının dehidrosqualen sentaz CrtM enzime bağlanma enerjilerinin birbirine yakın olduğu belirlendi. Bundan dolayı *tetrangomycin*'in yeni bir anti-MRSA ajan olarak kullanılma potansiyeli tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: Aktinomisetler, Biyoaktif Doğal Ürün, Genom tarama, NRPS, PCR, PKS, *Salinispora*, *Streptomyces*

ABSTRACT

MINING OF ACTINOMYCETE GENOMES FOR THE DISCOVERY OF NEW NATURAL PRODUCTS

Ph.D. THESIS

Süleyman ÖZAKIN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2015

Biotechnological potential of natural products from microorganisms are receiving more attention for discovery of novel bioactive compounds. Terrestrial and marine actinomycetes are an important source for the discovery of novel bioactive compounds. Therefore, a new method genome mining is a good strategy for a natural product discovery. There are different strategies for genome mining. One of them is PCR based genome mining. Degenerate primers are used in order to defined biosynthetic gene clusters. The other is MS guided genome mining. The present study was designed to assess the genetic potential of rhizosphere streptomyces strains by amplifying adenylation and ketosynthase domains of NRPS and PKS-I genes, respectively. Using degenerate PCR and sequencing of cloned products, NRPSs were detected in all (sixty-five) isolates. PKS-I genes were successfully amplified from 80% of the isolates. Based on the BLASTX analysis, most of the NRPS (34%) and PKS (56%) fragments showed below 70% identity to their closest relatives. The results reveal that there is a great diversity in NRPS A domains in those habitats and the majority of domains cloned in this study are probably involved in different biosynthetic pathways. According to the bioinformatic analysis of NRPS genes, different A domains were determined in the obtained sequences, but in some cases their substrate specificity failed to be predicted. This means that these domains can recognize novel amino acids as substrate.

The obligate marine actinomycete genus *Salinispora* is model microorganism for natural product research. All *Salinispora* strains selected already had whole genome sequence data available and their natural product gene clusters were evaluated with MS guided genome mining. The draft genome sequences of all *Salinispora* strains were analyzed by bioinformatic tools for the MS-guided genome mining. These tools were used to determine the presence of biosynthetic gene clusters such as PKS, NPRS, terpene, indole, lantibiotic, siderophore so on. Molecular networks were generated when extracts of *Salinispora* strains were analyzed via LC/MS/MS. Molecular networking of the data resulted in dereplication of *lomaiviticin C*, *7-OH-staurosporine*, *staurosporine* and *cyanosporaside B*. As a result of molecular networking analysis, totally 1347 MS/MS data were compared with one another in the network. Finally, we determined specific MS/MS and bioinformatic data for *S. pacifica* CNY703, *S. tropica* CNT250 and *S. arenicola* CNY011 and CNY299. Both chemical and bioinformatic data showed that a

glycosylated natural product was found in *S. pacifica* CNY703 culture broth and reached NRPS-PKS-I glycosylated natural product gene clusters in *S. pacifica* CNY703 genome. Structural elucidation of a compound which is product of NRPS-PKS-I gene clusters is going on.

The major bioactive metabolite produced by *Streptomyces* sp. CAH29 was extracted, purified and identified as tetrangomycin. This known anthraquinone exhibited antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Candida albicans* with inhibition zones of 14, 10, 12 and 8 mm, respectively. *Tetrangomycin* showed moderate free DPPH radical scavenging activity and potent cytotoxic activity against cell lines LNCaP (human prostate adenocarcinoma cell) and A549 (human alveolar adenocarcinoma cell). Docking results demonstrate that tetrangomycin has a similar mode of action. As a result of this analysis, it was determined that the binding energy of tetrangomycin and positive control dipotassium (2-oxo-2 - {[3- (3-phenoxyphenyl) propyl] amino} ethyl phosphonate (830) to the dehidrosqual synthase CrtM enzyme of MRSA was found to be close to each other. Therefore, this result suggest that tetrangomycin has the potential to be used as an anti-MRSA agent.

Keywords: *Actinomycetes*, Bioactive Natural Product, Genom Mining, NRPS, PCR, PKS, *Salinispora*, *Streptomyces*

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
		<u>No</u>
Şekil 1.1.	<i>Salinosporamide A</i> ve <i>Omuralide</i> ' in molekül yapıları.....	3
Şekil 1.2.	Deniz aktinomisetlerinin filogenetik ilişkisi.....	5
Şekil 1.3.	<i>Anthracycline</i> ve <i>Teixobactin</i> ' nin moleküler yapısı.....	12
Şekil 1.4.	NRP sentezinin adenilasyon ve açılasyon aşamaları.....	13
Şekil 1.5.	NRP sentezinin kondensasyon basamağı.....	14
Şekil 1.6.	PK sentezinin başlama aşaması.....	16
Şekil 1.7.	PK uzama aşaması.....	16
Şekil 1.8.	<i>Epothilone (A)</i> (Tahmini) ve <i>Epothilone (B)</i> (Gerçek) moleküllerin kimyasal yapıları.....	21
Şekil 1.9.	Glikolize <i>Staurosporine</i> ve <i>Erythromycin</i> molekül yapısı.....	24
Şekil.1.10.	Moleküler Network (Ağ) Analizi.....	26
Şekil 3.1.	Çalışmalarda kullanılan DNA markörü.....	51
Şekil 3.2.	pGEM-T vektör haritası.....	52
Şekil 3.3.	NRPS genlerine ait A domaininde primerlerin lokalizasyonu.....	56
Şekil 3.4.	PKS-I genlerine ait KS domainlerde primerlerin lokalizasyonu.....	56
Şekil 3.5.	<i>Tetrangomycin</i> bileşiğinin ekstraksiyon şeması.....	60
Şekil 3.6.	<i>Tetrangomycin</i> bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırma şeması.....	61
Şekil 3.7.	F4d4 fraksiyonunun HPTLC tabakası üzerinde ayrılması.....	62
Şekil 3.8.	DPPH Radikalinin molekül yapısı.....	63
Şekil 4.1.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	68
Şekil 4.2.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	68
Şekil 4.3.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	69
Şekil 4.4.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	70
Şekil 4.5.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	70
Şekil 4.6.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	71
Şekil 4.7.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	71
Şekil. 4.8.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	72
Şekil. 4.9.	İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü.....	72
Şekil 4.10.	İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü.....	73

Şekil 4.11.	İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü.....	74
Şekil 4.12.	İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü.....	74
Şekil 4.13.	İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü.....	75
Şekil 4.14.	İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü.....	75
Şekil 4.15.	<i>Streptomyces</i> sp. CAH29 izolatu A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.....	76
Şekil 4.16.	<i>Streptomyces</i> sp. CAH29 izolatu KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.....	77
Şekil 4.17.	İzolatların A domain çeşitliliği.....	102
Şekil 4.18.	İzolatların A domaini BLAST analizleri.....	102
Şekil 4.19.	İzolatların KS domaini BLAST analizleri.....	109
Şekil 4.20.	<i>Streptomyces</i> sp. CAH29 izolatının filogenetik ağacı.....	110
Şekil 4.21.	<i>Tetrangomycin</i> 'in kimyasal yapısı.....	110
Şekil 4.22.	<i>Tetrangomycin</i> 'in MRSA üzerine inhibisyon etkisi.....	112
Şekil 4.23.	Ham ekstraktın konsantrasyonuna bağlı DPPH söndürme aktivitesi....	113
Şekil 4.24.	<i>Tetrangomycin</i> molekülünün konsantrasyonuna bağlı DPPH söndürme aktivitesi.....	113
Şekil 4.25.	<i>Tetrangomycin</i> 'in LNCaP ve A549 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi.....	114
Şekil 4.26.	Pozitif kontrolün (830) CrtM ile etkileşimi.....	115
Şekil 4.27.	<i>Tetrangomycin</i> ve 830'un CrtM ile etkileşimi.....	115
Şekil 4.28.	<i>Salinispora</i> Genomlarında Doğal Ürün Gen Kümelerinin 'antiSMASH' ile taranması.....	117
Şekil 4.29.	<i>Salinispora</i> NRPS ve PKS gen kümelerinin 'antiSMASH' ile taranması.....	118
Şekil 4.30.	<i>Salinispora</i> 'antiSMAH' ve 'NapDOS' analizi.....	119
Şekil 4.31.	GNPS Moleküler Network Analizi.....	122
Şekil 4.32.	<i>Lomaiviticin</i> ve <i>cyanosporaside</i> moleküllerinin network eşleşmesi.....	124
Şekil 4.33.	İzolatlara ait spesifik moleküler iyon sayısı.....	124
Şekil 4.34.	'A' network kümesi.....	125

Şekil 4.35.	366.214 moleküler iyonunun MS/MS spektrumu.....	126
Şekil 4.36.	<i>S. pacifica</i> CNY703 izolatının ‘antiSMASH’ analizi.....	126
Şekil 4.37.	Farklı doğal ürün gen kümelerinin ‘MultiGeneBlast’ analizi.....	127
Şekil 4.38.	İndol ve NRPS-PKS gen kümelerinin ‘MultiGeneBlast’ analizi.....	128
Şekil 4.39.	<i>S. pacifica</i> CNY703 ekstraktının LC/MS analizi.....	129
Şekil 4.40.	683 moleküler iyonunun UV spektrum analizi.....	130
Şekil 4.41.	366.124 moleküler iyonunun UV spektrum analizi.....	130
Şekil 4.42.	683 moleküler iyonun UV kromatogramı.....	130
Şekil 4.43.	Moleküler iyon 683’ün total iyon ve MS/MS kromatogramı.....	131
Şekil 4.44.	683 MS/MS spektrumunda triptofan kütle kayma değeri.....	131
Şekil 4.45.	‘B’ network kümesi.....	132
Şekil 4.46.	Moleküler iyon 1020.34’ün MS/MS spektrumu.....	133
Şekil 4.47.	‘C’ network kümesi.....	134
Şekil 4.48.	430.267 moleküler iyonun MS/MS spektrumu.....	135
Şekil 4.49.	‘D’ network kümesi.....	136

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1.	Türe özgü <i>Salinispora</i> metabolitleri.....	6
Çizelge 1.2.	Doğal ürün tarama yöntemleri ve bulunan bileşikler.....	22
Çizelge 1.3.	Doğal ürün tarama veritabanları.....	25
Çizelge 3.1.	Karasal <i>Streptomyces</i> izolatları ve genbankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) erişim numaraları.....	45
Çizelge 3.2.	Farklı coğrafik bölgelerden izole edilen <i>Salinispora</i> izolatları.....	47
Çizelge 3.3.	Fast Start Taq DNA polymerase Kit (Roche) kullanılarak yapılan PCR reaksiyonun koşulları.....	56
Çizelge 3.4.	Fast Start Taq DNA polymerase Kit (Roche) kullanılarak yapılan PCR reaksiyonun koşulları.....	63
Çizelge 4.1.	Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri.....	80
Çizelge 4.2.	Dejenere primerler ile elde edilen PKS-I KS domainleri ve biyoinformatik incelemeleri.....	104
Çizelge 4.3.	Antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	112
Çizelge 4.4.	Ligandların docking skorları.....	116
Çizelge 4.5.	GNPS Dereplikasyon Analizi.....	121
Çizelge 4.6.	Indol ve NRPS-PKS gen kümelerinin şeker biyosentez genleri.....	127
Çizelge 4.7.	<i>S. arenicola</i> CNY299'un glikolize doğal ürün gen kümeleri.....	135
Çizelge 4.8.	<i>S. arenicola</i> CNY011'in glikolize doğal ürün gen kümeleri.....	136

KISALTMALAR

A	Adenilasyon domaini
Bç	Baz çifti
BFB	Brom Fenol Blue
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
GNPS	Global Natural Product Social
kbç	Kilo baz çifti
KS	Ketosentaz domaini
Litre	L
mbç	Mega baz çifti
Metre	m
MRSA	<i>Methicillin</i> dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Kütle Spektroskopisi
m/z	Kütle/yük
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
NRP	Ribozomal Olmayan Peptid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK	Poliketid
1U	1 ünite

1. GİRİŞ

1.1. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri

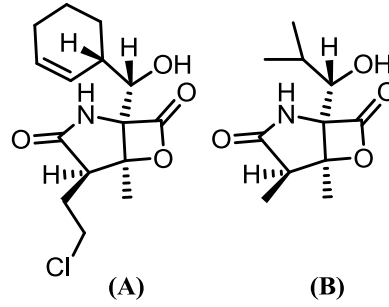
Aktinomisetler Gram (+), aerobik bakteriler olup, morfolojileri, ekoloji ve patojeniteleri, genom uzunluğu, genomunun içerdiği G+C oranı ve doğal ürün biyosentezi potansiyellerinin yüksek olması açısından bakteriler içerisinde oldukça dikkat çekici bir gruba oluşturmaktadır (Hopwood 2007).

Aktinomisetlerin çoğu saprofitlerdir. Bunun yanında üyelerinin bazıları parazitik ve mutualist olarak çeşitli bitki ve hayvanlarla birlikte yaşamaktadır. Doğada toprak, deniz, sıcak su kaynakları, bataklıklar ve mağaralar gibi çeşitli ekolojik ortamlarda yaşamaktadırlar. Habitatlarındaki tuz konsantrasyonu, pH, nem, sıcaklık gibi abiyotik faktörler farklı ekolojik ortamlardaki dağılımlarını etkileyen en önemli etkenlerdendir. Kültüre alınmadan yapılan (metagenomik) araştırmalar mevcut mikroorganizmaların yaklaşık %1'inin standart laboratuvar şartlarında kültüre edilebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte 1 ml deniz suyunun 10^5 , 1 g toprağın ise 10^8 koloni ve yaklaşık 580 farklı aktinobakteri içerdiği bilinmektedir (Wright ve ark. 2010). Karasal ve deniz orjinli aktinomisetler habitatlarındaki mikrobiyal populasyonun önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Her iki habitata özgü adaptasyon sağlamış aktinomisetler, kompleks polimerlerin ayrışması, azot döngüsünde rol almaları, çeşitli patojen bakteri ve funguslara karşı değişken oranlarda inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin üretilmesinden sorumludurlar. Her aktinomiset türü genetiksel olarak 10-20 arasında doğal ürün sentezleme potansiyeline sahip olduğundan (Donadio ve ark. 2002), farklı habitatlardaki lokal izolatlardan yeni doğal ürünlerin keşfedilme ihtimali artmaktadır. Karasal aktinomisetlerden *Streptomyces*, *Nocardia* ve *Amycolopsis*, deniz aktinomisetlerinden ise *Salinispora*, *Micromonospora* ve *Pseudoalteromonas* cinsinin üyeleri hem genetiksel potansiyelleri hem de üretmiş oldukları doğal ürünlerle aktinomisetler içinde en dikkat çekici gruplardır (Davo ve ark. 2008). Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki deniz mikroorganizmaları, sıradışı habitatlara eşsiz fizyolojik ve metabolik adaptasyonlarından dolayı, farklı biyolojik aktivitelere sahip doğal ürünleri yüksek

1. GİRİŞ

kapasitede sentezleyebilme potansiyeline sahiptir. Mikrobiyal doğal ürün araştırmalarına önemli ve yeni bir boyut kazandıran deniz aktinomisetlerinden yakın zamanda yeni biyoaktif doğal ürünlerin keşfedilmesiyle bu bakterilerin benzersiz taksonomik populasyonlar olduğu anlaşılmaktadır (Fenical ve ark. 2006). Karasal akrabaları ile karşılaştırıldığında çalışılması çok daha zor olan deniz aktinomisetlerinden, özellikle kültür ve örnekleme tekniklerinin gelişmesiyle yeni biyoaktif bileşikler izole edilebilmektedir. Deniz aktinomisetlerinin ekolojik rolleri tam olarak bilinmemesine rağmen, karasal akrabalarındaki gibi organik materyallerin ayrışması ile ilgili görevleri olduğu düşünülmektedir (Jensen ve ark. 2006). Çevresel baskılardan kaynaklanan bu farklılık hem türleşme hem de yeni taksonların ortaya çıkmasına neden olması açısından ilgi çekicidir. Bu durum deniz aktinomiset çeşitliliğini, mikroorganizmaların yaşam ortamlarına adaptasyonunu ve doğal ürün biosentezinin mekanizmalarını açıklar niteliktedir. Deniz orjinli doğal ürünler suya salındıklarında hızlıca seyreltik duruma gelmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı biyolojik aktivite potansi oldukça yüksek bileşiklerdir. Örneğin; sadece deniz aktinomisetleri tarafından sentezlenen alkaloid yapısındaki *diazepinomicin* bileşiğı oldukça yüksek bir potense sahip olup, antitümör ajan olarak binlerce kanserli hastanın tedavisinde kullanılmaktadır (McAlpine ve ark. 2008). Deniz aktinomisetlerince sentezlenen biyoaktif doğal ürünlerin kimyasal yapıları karasal kökenli olanlardan farklılık gösterir. Bu sebepten ötürü daha etkili biyolojik aktiviteye sahip antimikrobiyal ve antitümör ajanlar deniz mikroorganizmaları tarafından sentezlenmektedir. Deniz kaynaklı yeni doğal ürünler sınıfına dahil *salinosporamide A* ve *B*, *sporolide A* ve *B*, *Salinispora* cinsi üyeleri tarafından üretilmektedir. Faz II aşamasındaki *salinosporamide A* oldukça potent bir antitümör aktivite göstermektedir. Karasal aktinomisetlerce üretilen *omuralide* gibi 20S proteozom inhibisyonuna neden olan *salinosporamide A* (Şekil 1.1.A) *omuralide*'den (Şekil 1.1.B) 35 kat daha fazla potenttir. Bununla birlikte fermantasyon koşullarının geliştirilmesi *salinosporamide A* üretimini 100 kat (450 mg/l) arttırmaktadır (Pots ve ark. 2010).

Aktinomiset grubuna dahil *Streptomyces* ve *Salinispora* cinsi üyeleri özellikle doğal ürün araştırmalarında model mikroorganizmalardır (Jensen ve ark. 2015).



Şekil 1.1. *Salinosporamide A* (A) ve *Omuralide*' in (B) molekül yapıları

1.1.1. *Streptomyces* Cinsinin Genel Özellikleri

Actinobacteria sınıfı, *Actinomycetales* ordosuna dahil olan *Streptomyces* cinsine dahil türler Gram (+), aerobik, filamentli saprofit bakterilerdir. Doğada çeşitli habitatlarda geniş yayılım gösterirler. Uygun üreme koşullarında mantarlardaki gibi çok hücreli geniş misel yapıları oluştururlar. Koloni morfolojilerinde yoğun olarak vejetatif (substrat) miselleri, hava miselleri ve spor yapısı gösterirler (Weber ve ark. 2003).

Streptomyces cinsi organizmalar deniz suyu, çöl ve toprak gibi çeşitli habitatlarda yaşayabilmektedirler. Özellikle endemik bitkilerin kök çevresinde (rizosfer) ve yüksek yapılı bitkilerde, epifitik ve endofitik olarak kolonize olmuş *Streptomyces* türleri üretmiş oldukları sekonder metabolitlerle bitkileri çeşitli patojen organizmalara karşı korumaktadırlar (Shoda ve ark. 2000, Koch ve ark. 2008). Endofitik olarak bitkilerle birlikte yaşayan organizmalarla bitkiler arasında simbiyotik ilişkiler söz konusudur (Strobel ve ark. 2004).

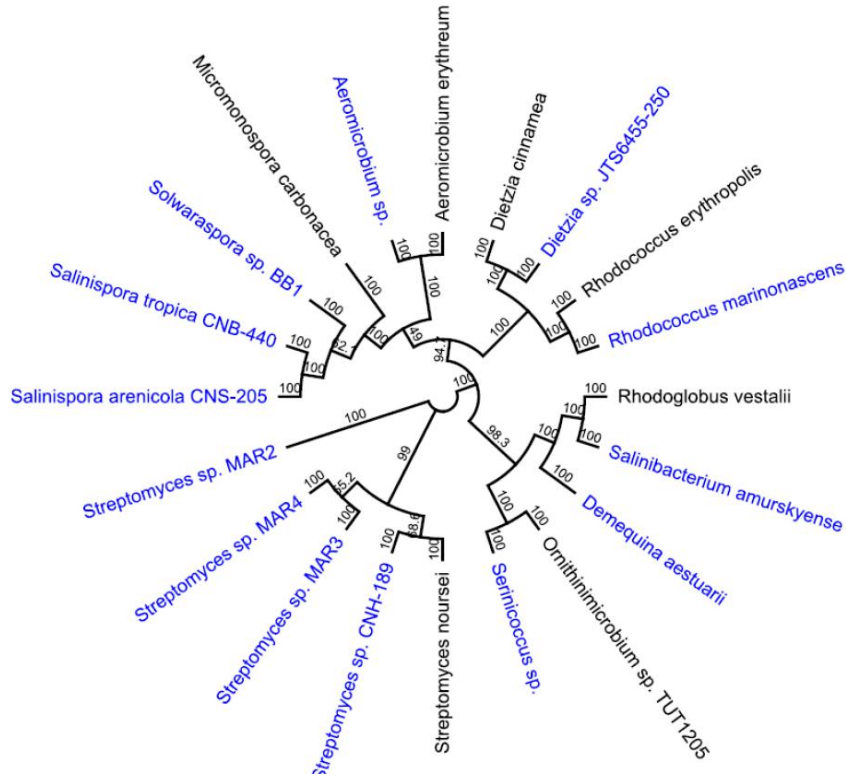
Streptomyces'lar lineer kromozom yapısına sahiptirler. Yaşamsal öneme sahip proteinleri kodlayan genler kromozomun merkezi kısmında, doğal ürün sentezi ile ilgili genler ise kromozomun ucuna yakın bölgelerde bulunmaktadır (Hopwood ve ark. 1999).

2014 yılı gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) verilerine göre bugüne kadar 30'u aşkın *Streptomyces* genom projesi tamamlanmış durumdadır. Bunlardan 18'i son 2 yıl içinde açıklanmıştır (Harrison ve ark. 2014). Bu projeler sonucunda genom büyüklüklerinin genellikle 8-11 mbç arasında değiştiği bilinmektedir. 9 mbç'lik *S. avermitilis* genomunun %70,7'sini guanin ve sitozin baz çiftleri oluşturmaktadır. *S. coelicolor*'da sadece sekonder

metabolit üretiminden sorumlu tahmini olarak 23 gen kümesinin olduğu bunun da tüm genomun %5'ine denk geldiği belirtilmektedir (Weber ve ark. 2003). Biyoinformatik analizler sonucunda 9,7 mbç'lik genoma sahip *S. roseochromonogenes* subsp. *oscitans* DS 12.976'nın 43 farklı gen kümesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Rückert ve ark. 2014). Doğal ürün üretiminden sorumlu bu gen kümelerinin büyüklüğü en küçük genoma sahip (580 kbç) bir bakteri olan *Mycoplasma genitalium*'dan daha büyük olduğu görülmektedir (Fraser ve ark. 2005).

1.1.2. *Salinispora* Cinsinin Genel Özellikleri

Yeryüzünün %70'i denizlerle kaplıdır. Karasal habitatlara oranla biyolojik çeşitliliğin daha fazla olduğu denizler, 36 filumdan oluşan canlılar aleminin 34 filumuna ev sahipliği yapmaktadır (yaklaşık 2,2 milyon tür). Özellikle derin dalış ekipmanlarının geliştirilmesi 2000 m'den daha derin sediment örneklerinden mikroorganizmaların toplanmasına ve deniz adaptasyonuna sahip yeni bakteri cinslerinin tespit edilmesine olanak sağlamıştır. *Salinibacterium*, *Serinicoccus*, *Sciscionella*, *Marinispora* ve *Salinispora* aktinomiset grubuna dahil yeni cinslerdir (Şekil 1.2.). İlk olarak 1991 yılında Bahama sediment örneklerinden, kültürde üretililebilen MAR1 isimli aktinomiset grubu tespit edildi. Sonrasında gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda MAR1 grubunun *Salinispora* olarak adlandırılan yeni bir cins olduğu tespit edilmiştir. *Salinispora*'lar deniz aktinomiset popülasyonunun önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sediment örneklerinden toplanan 6425 aktinomisetten 2772'sinin (%43) *Salinispora* kolonisi olduğu tespit edilmiştir. *Salinispora* cinsi zorunlu deniz aktinomisetleri olup *Salinispora tropica*, *Salinispora arenicola* ve *Salinispora pacifica* olmak üzere 3 farklı türde temsil edilmektedir. Cinsin üyeleri tropikal ve subtropikal okyanus sediment bölgelerinde yayılış göstermektedir. *S. arenicola* türü *S. tropica* ve *S. pacifica* türlerine göre daha geniş bir yayılış alanına sahip iken, *S. tropica* sadece Karayipler bölgesinde oldukça dar bir alanda yayılış göstermektedir (Jensen ve ark. 2006).



Şekil 1.2. Deniz aktinomisetlerinin filogenetik ilişkisi (Jensen ve ark. 2005)

Cinsin en son tespit edilen türü *S. pacifica* ise Karayipler dışında tropik ve subtropik bölgelerde yayılış göstermektedir. Cinsin üyelerinin çoğunlukla sediment örneklerinden izolasyonu rapor edilse de, bunun yanı sıra çeşitli sünger ve algler ile simbiyotik ilişkide olduğu da rapor edilmiştir (Jensen ve ark. 2015). Çeşitli sediment derinliklerden izolasyonları gerçekleştirilen *Salinispora*'ların 2000 m'den daha derin bölgelerden izolasyonuna yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Katı kültürde değişik renklerde koloniler oluştursa da turuncu renkli olanları *Salinispora*'lar için karakteristiktir. Mikroskop görünüşleri incelendiğinde *Streptomyces*'larda olduğu gibi misel ve spor formlarına sahip oldukları görülmektedir.

Genom projesi tamamlanan *S. tropica* CNB-440 ve *S. arenicola* CNS-205 türlerinin doğal ürün biyosentez potansiyellerinin *Streptomyces*'lardaki gibi oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Udwary ve ark. 2007). 2007'de tüm genomu sekanslanan *S. tropica*

1. GİRİŞ

CNB-440 türünün, 5.2 mbç büyüklüğünde halkasal bir genomu vardır. Biyoinformatik analizler; *Salinispora* türlerinin doğal ürün biyosentezinden sorumlu genlerinin, organizmanın tüm genomunun yaklaşık %10'unu kapsadığını, bu oranın, genom projeleri tamamlanan karasal türler olan *Streptomyces coelicolor* ve *Streptomyces avermitilis*'te sırasıyla %4,5 ve %6 olduğunu göstermiştir (Bentley ve ark. 2002, Ikeda ve ark. 2003, Udworthy ve ark. 2007).

Evrimsel ve mikrobiyal ekoloji açısından büyük öneme sahip *Salinispora* üyeleri türe özgü doğal ürün biyosentezi gerçekleştirmektedir (Çizelge 1.1.). Buna en güzel örnek dar bir alanda yayılış gösteren *S. tropica* türlerince sentezi gerçekleştirilen ve şuan faz II aşamasında bulunan antitümör ilaç adayı *salinosporamide A*'dır. Genomik ve kimyasal tarama çalışmalarında *salinosporamide A* biyosentezine *S. arenicola* ve *S. pacifica* türlerinde rastlanmamaktadır. Yine protein kinaz C inhibisyonuna neden olan *staurosporine*'in biyosentez gen kümesi sadece *S. arenicola* ve bazı *S. pacifica* türlerinde tespit edilmiştir. *S. pacifica* türlerine özgü bir metabolit olan *cyanosporaside*'ler nitril grubu içeren önemli doğal ürün sınıflarından biri olmakla beraber, bilinen 150.000 doğal ürünün %0,1'den azının nitril grubuna sahip olduğu bilinmektedir. Bu metabolitler aynı zamanda klor ve heksoz foksiyonel gruplarına sahip olan doğal ürünlerdir.

Çizelge 1.1. Türe özgü *Salinispora* metabolitleri (*St:* *S.tropica*, *Sa:* *S.arenicola*, *Sp:* *S. pacifica*) (Jensen ve ark. 2015)

Tür	Metabolit	Biyosentez Yolu	Keşif	Hedef
<i>S.tropica</i>	<i>Salinosporamide A</i>	NRPS-PKS	Yeni	Proteozom
<i>S.tropica</i>	<i>Sporolide A</i>	PKS I	Yeni	Ters transkriptaz
<i>S.tropica</i>	<i>Salinilactam</i>	PKS I	Yeni	-
<i>S.pacifica</i>	<i>Pacificanone A</i>	PKS I	Yeni	-
<i>S.pacifica</i>	<i>Cyanosporaside A</i>	PKS I	Yeni	-
<i>S.pacifica</i>	<i>Lomaiviticin C</i>	PKS II	Yeni	DNA
<i>S.arenicola</i>	<i>Saliniketal A</i>	PKS I	Yeni	Ornitindekarboksilaz
<i>S.arenicola</i>	<i>Cyclomarizine</i>	NRPS	Yeni	-
<i>S.arenicola</i>	<i>Arenamide A</i>	PKS II	Yeni	NFkB
<i>S.arenicola</i>	<i>Staurosporine</i>	Alkaloid	Bilinen	Protein kinaz C
<i>St,Sa,Sp</i>	<i>Desferioxamine B</i>	NRPS	Bilinen	Demir selasyonu
<i>St,Sa,Sp</i>	<i>Lymphostin</i>	NRPS-PKS	Bilinen	İmmunbaskılayıcı

Denizler; sahip oldukları sıradışı (tuz konsantrasyonu, basınç, sıcaklık, ışık) abiyotik koşullarla karasal ortamlardan farklılık gösterirler. Bu sebepten dolayı denizlerde

yaşayan canlılar bu sıradışı koşullarda canlılıklarını devam ettirebilmeleri için çeşitli adaptasyonlar geliştirirler. Doğal ürünler, mikroorganizmaların bu tür ortam şartlarına en iyi şekilde adaptasyon sağlamasında çok önemli rol oynarlar. Yapılan genetik araştırmalar sonucunda deniz kökenli Gram (+) mikroorganizmaların Gram (-)'lerden farklı iyon taşıyıcı zar proteinlerine sahip olduğu görülmüştür. Bununla ilişkili olarak *Pseudoalteromonas* türlerince sentezlenen *korormicin*'in selektif olarak Gram (-) deniz bakterilerinin sodyum bağımlı NADH kinon reduktaz enzimi inhibisyonuna neden olurken, Gram (+) mikroorganizmalar üzerine böyle bir etkisinin olmadığı bilinmektedir (Wietz ve ark. 2013). *Salinispora* üyelerinde görülen en önemli adaptasyonlardan biri üremeleri için deniz suyuna ihtiyaç duymalarıdır. Büyüme ortamında deniz suyu yerine saf su kullanılması durumunda ise üremenin olmadığı görülmektedir. *Salinispora* türleri %10'a kadar tuz konsantrasyonuna tolerans gösterebilmektedirler. Bir başka önemli deniz adaptasyonu ise doğal ürün biyosentezinde halojenizasyon reaksiyonlarının oldukça sık görülmesidir. Doğal ürün yapısına katılan klor (Cl), Brom (Br) veya diğer halojen grupları biyolojik aktivitenin potensini arttırmaktadır. Örneğin Cl grubuna sahip *salinosporamide A* nın biyolojik aktivitesinin Cl grubuna sahip olmayan türevi ile karşılaştırıldığında halojen grubun kaybına bağlı olarak aktivitenin 500 kat düştüğü görülmektedir (Jensen ve ark. 2005).

1.2. Doğal Ürünler

Biyolojik olarak aktif moleküller için genel anlamda “doğal ürün” terimi kullanılır. Doğal ürünler mikroorganizmalar, mantarlar ve bitkiler tarafından üretilen biyolojik moleküller olup hem kimyasal yapıları hem de biyolojik aktivitelerinden dolayı hücrel makromoleküllerden ayrılırlar (Cannell 1998). Genel tanıma göre doğal ürünler; proteinler, karbonhidratlar, lipitler, nükleik asitler vb makromoleküller gibi canlılık faaliyetleri için birinci dereceden metabolik işlemlerde ve büyümede gerekli olmayan, organizmanın bulunduğu ortama daha iyi adapte olmasını sağlayan sekonder metabolitleri ifade etmektedir. Canlı sistemlerdeki farklılaşma, düzenleme, taşıma, haberleşme, savunma gibi birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde etkin rol oynayan bileşiklerdir (Bernier ve Surette 2013). Bu açıdan biyolojik kontrol ajanlarıdır.

1. GİRİŞ

Doğal ürünlerin molekül ağırlıkları yaklaşık 3000 dalton olup kimyasal yapı olarak oldukça çeşitlilik gösterirler. Primer metabolizma sonucu oluşan ara metabolitlerden sentezlenirler. Bu sebepten dolayı doğal ürünler primer metabolizma kökenli bileşiklerdir (Hwang ve ark. 2014). Çeşitli hücrel stres koşulları doğal ürün sentezinin başlamasında önemli sinyallerdir. Doğal ürün sentezinden sorumlu sekonder metabolizma, kromozomal DNA veya plazmit üzerindeki özel genlerce kontrol edilmektedir (Hopwood 1999).

Doğal ürünler organizmalar arasındaki simbiyotik, sinerjistik ve antagonistik gibi değişik biyolojik etkileşimlerin gerçekleşmesinde de rol oynamaktadır. Bitkiler ve onunla simbiyotik ilişki içinde olan mikroorganizmalar bu etkileşimi doğal ürün üretimi ile gerçekleştirmektedir (Strobel ve ark. 2004). Öte yandan, yine aynı ortamı paylaşan farklı mikroorganizmaların çeşitli stres koşullarında antagonist etkiye neden olan doğal ürünleriyle mikrobiyal popülasyonda daha avantajlı hale gelmektedirler.

Farklı organizma gruplarından yeni doğal ürünlerin keşfi ilaç araştırmaları açısından oldukça önem arz etmektedir. Hem kimyasal yapı çeşitliliği hem de farklı biyolojik aktivitelere sahip olmalarından ötürü şu an klinikte kullanılan birçok ilaç doğal ürünlerden veya onların kimyasal modifikasyonlarından elde edilmektedir.

Doğal ürünler alkaloidler, terpenoidler, flavonoidler, nükleositler, ribozomal olmayan peptidler, poliketidler olmak üzere çeşitli temel gruplara ayrılmaktadır. Bilinen doğal ürünlerin yaklaşık %60'ını terpenoidler oluşturmaktadır. Terpenoidler bitkiler, mantarlar ve mikroorganizmalarca sentezlenen biyoaktif metabolitlerdir. Terpenoidlerin biyosentezi izopentil ünitelerinin substrat olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Klinikte güncel olarak kullanılan antikanser ilaç *Paclitaxol*® (*taxol*) en iyi bilinen terpenoidlerdendir. Bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen alkaloidler ise aminoasit kökenli azot atomu içeren doğal ürünlerdir. Doğal ürün olarak bilinen yaklaşık olarak 20.000'den fazla alkaloid mevcuttur. İyi bilinen alkaloidlerden biri olan morfin, tirozin amino asidinden sentezlenmektedir. Bu grup bileşikler metabolik yollardaki çeşitli enzimlerin inhibisyonu, antitümör aktivite ve reseptör antagonist gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. DNA'nın yapısındaki bazların kimyasal mimikleri olarak sentezlenen doğal ürün sınıfı nükleositler de alkaloid yapısındadır. Günümüzde

klirik öncesi aşamada bulunan önemli antiviral ve antitümör ajanlar nükleosit yapısındaki metabolitlerdir (*Arabinosylcytosine*). Flavonoidler ise özellikle yüksek yapılı bitkilerce sentezlenen aromatik yapıdaki metabolitlerin birlikte sınıflandırıldığı grubun genel ismidir. Biyosentezleri kalkon sentaz (poliketid sentaz III-PKS-III) tarafından gerçekleştirilmektedir. Bitki orjinli doğal ürünlerin en geniş gruplarından olan flavonoidlerin sayıca 10.000'den fazla olduğu düşünülmektedir. Aromatik halkalı metabolitler olmalarından ötürü reaktif oksijen türlerinin indirgenmesinde önemli antioksidant ajanlardır. Aşağıda çok daha ayrıntılı verilecek olan ribozomal olmayan peptid ve poliketidler özellikle bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenen mikrobiyal kaynaklı doğal ürünlerin en geniş ve en önemli gruplarıdır.

1.3. Mikrobiyal Doğal Ürünler

Bitkiler ve mikroorganizmalar önemli biyoaktif doğal ürün üreticileridir. 1928 yılında A. Fleming tarafından *penicillin*'in keşfi, mikroorganizma orjinli doğal ürün araştırmalarının başlangıcı açısından milat sayılır. Mikrobiyal doğal ürünler biyoaktif bileşiklerin en önemli sınıfını oluşturmaktadır. Bunlar arasında antibiyotikler, antifungallar, antitümör ajanlar, toksinler, antihelmantikler, immunbaskılayıcılar ve sideroforları da içeren, işlevsel olarak birbirinden oldukça farklı biyokimyasal sınıflara dahil bileşikler mevcuttur. Mikrobiyal doğal ürünler, potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin kaynaklarından birini teşkil ederler. Mikroorganizmalarca sentezlenen doğal ürünlerin kimyasal yapıları bitki orjinli olanlardan daha karmaşık olup, biyolojik aktivite açısından daha fazla çeşitlilik gösterirler. Mikrobiyal fermantasyonla üretilen bu ürünler veya bunların kimyasal modifikasyonları birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilir olmasından dolayı farmakolojik endüstrinin en önemli araştırma alanını teşkil etmektedir. 1983-1994 yılları arasında keşfedilen 520 ilacın %39'u mikrobiyal kökenlidir (Newman ve ark. 2003). Mikrobiyal doğal ürünler antibiyotik üretiminde en büyük paya sahiptir. Bilinen 25.000 mikrobiyal doğal üründen yaklaşık 20.000'i antibiyotik özelliğine sahiptir (Demain 2009). Tarım, tıp ve veterinerlik gibi alanlarda yeni ilaçların keşfedilmesi amacıyla doğal ürün kökenli bileşiklerin taranması günümüzde de önem arz etmektedir.

1.4. Aktinomisetlerin Doğal Ürünleri

Mikrobiyal kaynaklı doğal ürünlerin en önemli üreticilerinden biri aktinomisetlerdir. 23.000'in üzerinde bilinen mikrobiyal doğal ürünün %42'si aktinomisetler, %42'si funguslar, %16'sı ise diğer bakterilerce üretilmektedir (Oskay ve Tamer 2009). Aktinomisetler içerisinde özellikle *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharopolispora*, *Amycolatopsis* ve *Actinoplantes* cinslerinin üyeleri ticari öneme sahip doğal ürünlerin sentezinden sorumludurlar. Poliketidler (PK), ribozomal olmayan peptidler (NRP), lantibiyotikler, terpenler, steroidler, alkaloidler, bakteriosinler, indoller, aktinomisetlerin önemli doğal ürün gruplarıdır (Kai Blin ve ark. 2013). Bunlardan özellikle NRP ve PK'ler hem kimyasal yapı çeşitliği hem de biyolojik aktivitelerinden ötürü araştırmacıların en fazla dikkatini çeken doğal ürün gruplarıdır.

Günümüzde, klinikte kullanılan ilaçların %50'den fazlası doğal ürünlerin NRP ve PK bileşiklerine aittir. Antibakteriyal, antifungal, antiviral ve sitotoksik etkilerinin yanı sıra çoğu immün baskılayıcı, antihipertansif, antidiyabetik, antimalariyal ve kolesterol-düşürücü ilaçlar da PK ve NRP türevi ilaçlardır. Bu bileşikler aynı zamanda antiparazitik, antiprotozoal, hayvan büyüme promotorları ve doğal insektisitler olarak da gıda ve tarım endüstrilerinde önemli yer tutmaktadırlar (Zucko ve ark. 2010). Bu özelliklerinden dolayı PK ve NRP bileşikleri, yeni ilaç keşfi için önemli bir kaynak olmaya devam etmektedir. İlaç şirketleri ve akademik enstitüler yeni doğal ürünlerin keşfi için farklı habitatlardan izole ettikleri mikroorganizmaları taramaya devam etmektedirler. Farmakolojik ve biyolojik açıdan önemli onbinlerce PK ve NRP keşfedilmiş olmasına rağmen, yalnızca 350 antimikrobiyal molekül bu pazarda yerini bulmuştur (Demain 2009). Son kırk yıl içerisinde, mikroorganizmalardan markete ulaşabilen ürünlerin sayısı hatırı sayılır bir biçimde azalmıştır. Bundan dolayı yeni doğal ürünlerin keşfi ve alternatif stratejilerle bu doğal ürünlerin kimyasal potansiyelini arttırmak önem arz etmektedir.

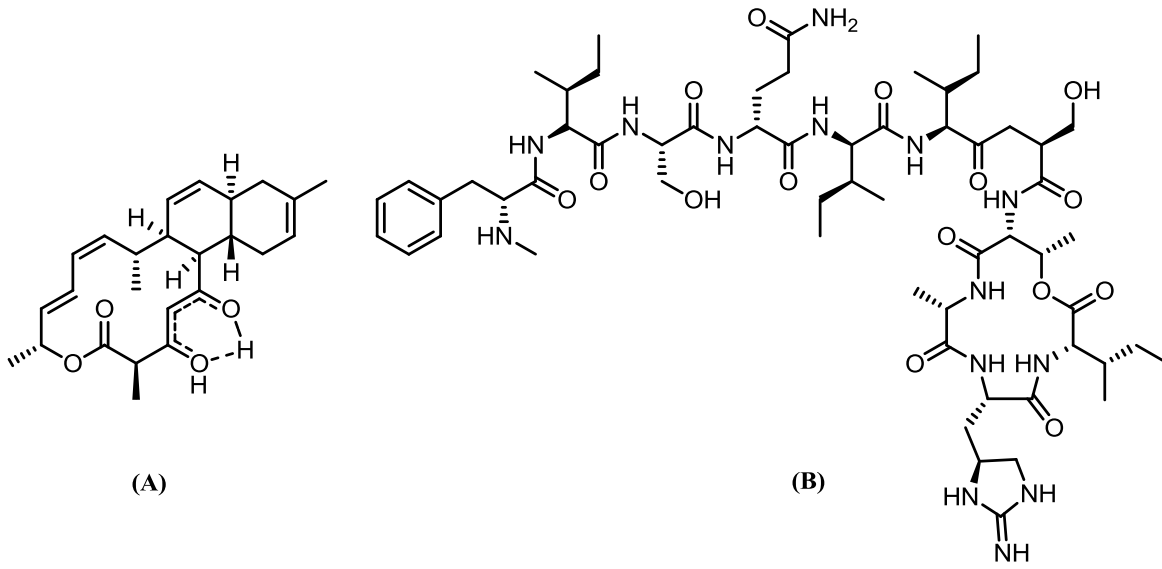
1.4.1. Ribozomal Olmayan Peptidler (NRP)

NRP'ler biyolojik olarak aktif bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır ve geniş klinik uygulamalara sahiptir. Örneğin, antibiyotik olarak (*teixobactin*) (Şekil 1.3. B),

antitümör olarak (*bleomycin*), antifungal ilaç ya da immün baskılayıcı olarak (*cyclosporin*) kullanılmaktadırlar. Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olan bu moleküllerin doğal olarak nasıl sentezlendiği iyi bilinmektedir. NRP'ler funguslardan ve bakterilerden sekonder metabolizma sonucu sentezlenmektedir. NRP'ler ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) adı verilen çok büyük multimodüler enzim sistemleri tarafından bir dizi amino asidin biraraya getirilmesiyle oluşturulmaktadır (Finking ve Marahiel 2004, Walsh ve ark. 2008). Enzim sistemi tarafından sentezlenen NRP moleküllerinin yapısı bilinen 20 aminoasit ile sınırlı değildir. Yapılarında modifiye aminoasitler, yağ asitleri ve α -hidroksi asitleri içeren yaklaşık 500 farklı monomer tanımlanmıştır (Caboche ve ark. 2008). Modifiye aminoasitler, hem NRP'lerin yapısal olarak çeşitlilik oluşturmaya hem de peptidlerin çok yönlü biyolojik aktivite göstermesine katkıda bulunmaktadır.

1.4.2. Poliketid Bileşikler (PK)

PK'ler bitkiler, funguslar ve bakteriler tarafından sentezlenen biyolojik olarak aktif moleküllerdir. PK'ler doğal ürünler içerisinde yüksek oranda yapısal çeşitliliğe (makrolidler, polietilerler, aromatik bileşikler) sahip olup, önemli farmakolojik aktivite gösteren geniş bir grubu temsil etmektedir (Komaki ve ark. 2009). PK'ler antibakteriyel (*anthracimycin*) (Şekil 1.3. A), antifungal (*amphotericin B*), kolesterol düşürücü (*lovastin*), immün baskılayıcı (*rapamycin*) ve antitümör (*doxorubicin*) özellik gösteren önemli doğal ürünlerdir. Açıl CoA öncüllerinin kullanılmasıyla poliketid sentazlar (PKS) tarafından sentezlenirler.



Şekil 1.3. *Anthracimycin* (A) ve *Teixobactin*' nin (B) moleküler yapısı

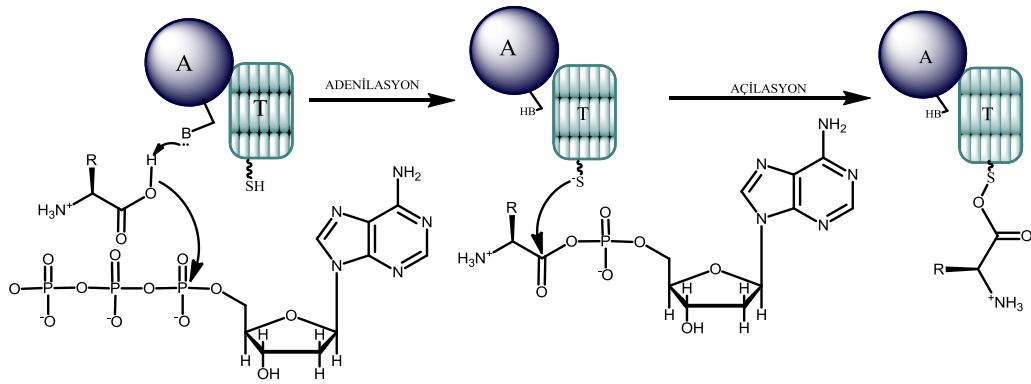
1.5. Doğal Ürün Biyosentez Mekanizmaları

1.5.1. Ribozomal Olmayan Peptid Sentetazlar (NRPS)

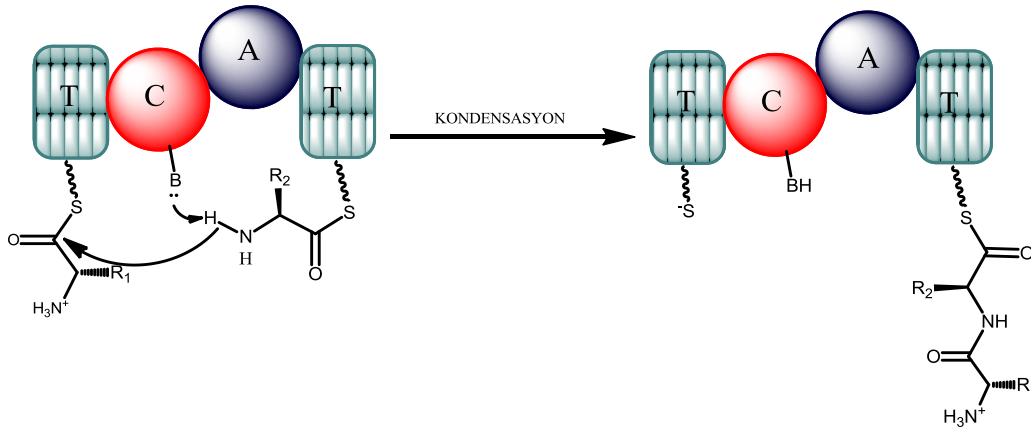
Doğada peptid sentezi iki farklı temel strateji ile gerçekleşebilmektedir. Bunlardan ilki, mRNA'daki kalıtsal bilginin ribozomlarda translasyonu ile gerçekleşmektedir. Diğeri ise ribozom ve kalıtsal bilgi olmaksızın multimodüler ribozomal olmayan peptid sentetazlarca (NRPS) gerçekleştirilen kondensasyon reaksiyonu ile modifiye peptitlerin sentezlenmesidir. NRPS mekanizması ilk olarak 1971 yılında, yağ asidi sentez mekanizmasını da aydınlatan Fritz Lipmann tarafından ortaya atılmış ve "tiyotemplet mekanizması" olarak adlandırılmıştır (Lipmann ve ark. 1971). NRPS sistemi tekrarlanan modüllerden meydana gelmiştir (Stein ve ark. 1996). Her bir modül farklı katalitik aktiviteye sahip domainler içermektedir (Mootz ve ark. 1999, Stachelhaus ve ark. 1999). NRPS genleri ise domainleri içeren çoklu modüllerden oluşmuştur. Tipik bir NRPS modülünün dört temel ve çok sayıda yardımcı (değişken) katalitik domaini vardır. Bir NRPS modülü genel olarak, adenilasyon (A) domaini, peptidil taşıyıcı protein (PCP) domaini ve bir kondensasyon (C) domaini içerir (Şekil 1.4. ve 1.5.). NRP sentezinde gerekli final modülü bir tyoesteraz (TE) domaini ile sonlanır. Bu, zincir uzamasının bitişini katalizler. Bahsedilen 4 domainin çoğu NRPS genlerinde mevcut bulunmasına rağmen,

substratın işlenmesinde önemli etkileri olabilen diğer domainler olan, epimerizasyon, N-metilasyon, siklizasyon ve oksidasyon domainleri gibi yardımcı domainlere de gereksinim vardır.

Tipik bir modül yaklaşık 1000 aminoasitten oluşmaktadır (Stein ve ark. 1996). Bir modül peptid sentezi sırasında substrat seçiminden peptid bağı oluşumuna kadar gerçekleşen reaksiyonlardan sorumludur. Bu reaksiyonlar, seçilen substratın tanınması, substratın aktivasyonu, aktive olmuş substratın tiyoester oluşturması ve sonrasında peptid bağının oluşmasıdır. Gerçekleşen reaksiyonlar, özelleşmiş domainlerin uyumlu koordinasyonu sonucu meydana gelmektedir (Weber ve Marahiel 2001). A domaini peptidin yapısına girecek olan amino asidin seçilmesi ve aktivasyonunda rol oynamaktadır. PCP ise A domainindeki aktive olmuş amino asidi kondensasyon domainine taşımaktadır (Şekil 1.4). Kondensasyon domaini ise peptid bağının sentezlendiği bölgedir (Şekil 1.5). Temel domainlerin sonucusu olan tiyoesteraz ise sentezlenen peptidin enzim sisteminden salıverilmesinde rol oynamaktadır.



Şekil 1.4. NRP sentezinin adenilasyon ve açilasyon aşamaları. A: A domaini, T: PCP (Fischbach ve ark. 2006, Acer 2011).



Şekil 1.5. NRP sentezinin kondensasyon basamağı. A: A domaini, C: C domaini, T: PCP (Fischbach ve ark. 2006, Acer 2011).

NRP sentezinde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin bir araya gelerek oluşturmuş oldukları topluluk gen kümesi olarak adlandırılmaktadır. Bu gen kümelerinin büyüklüğü 30 ile 120 kb arasında olabilmektedir. Gen kümeleri içinde, NRP sentezinde rol oynayan enzimleri kodlayan genlerin dışında farklı proteinleri kodlayan genlerde bulunmaktadır. Bunun dışında tipik bir gen kümesinde gen regülasyonu ve dirençlilikte rol oynayan proteinlerin yanı sıra taşıyıcı proteinleri kodlayan genler bulunmaktadır.

Hibrid yapıdaki bileşiklerin sentezinden sorumlu gen kümeleri incelendiğinde NRPS genlerinin PKS genleri ile bir arada bulunabildiği tespit edilmiştir.

1.5.2. Poliketid Sentazlar (PKS)

PKS'ler birçok bileşiğin biyosentezinden sorumlu, çok fonksiyonlu enzim grubudur (Staunton 2001). Bu bileşiklerin çoğu bakteri ve funguslar tarafından sentezlenmekte olup antibakteriyel veya antifungal özelliğe sahiptirler. Biyolojik aktiviteye sahip poliketid moleküller farmakolojik araştırmalarda önemli yer tutmaktadır.

PKS'ler asetil-CoA ve malonil-CoA gibi öncü molekülleri substrat olarak kullanarak β -keto karbon birimlerinin kondensasyon katalizlerini gerçekleştirir (Şekil 1.6.). PKS'ler, PKS-I, PKS-II ve PKS-III olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Moss ve ark. 2004). PKS-I çok fonksiyonlu polipeptit yapıdadır. β -keto karbon zincirlerinin uzaması ya

modüler (bakterilerde) ya da tekrarlı (mantarlarda) yapılarla olmaktadır. NRPS genlerine analog olan PKS-I genleri de ‘temel’ ve ‘yardımcı’ katalitik domainleri içeren modüllerden oluşmuşlardır. PKS modüllerinin temel organizasyonu domain sırasına göre, ketosentaz (KS) domaini, açıl transferaz (AT) domaini ve açıl taşıyıcı protein (ACP) domaininden oluşmaktadır (Şekil 1.6 ve 1.7.). NRPS’lerde olduğu gibi, final PKS modülünde ürün sentezi bir tiiyosteraz (TE) domaini ile sonlanır. Bilinen yardımcı PKS domainleri, ketoredüktaz, dehidrataz, metiltransferaz ve enoilredüktaz domainleridir. Bütün bu domainler yeni bir poliketid zincirinin programlanmış sentezinde gereklidirler. Uzayan her bir karbon ünitesinin substrat özgünlüğü AT domaini tarafından tanımlanır ki burada açıl transferazların iki temel grubu olan, malonil-CoA transferaz ve metil-malonil-transferazlar, DNA dizilimi düzeyinde açıkça ayırt edilebilirler (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005).

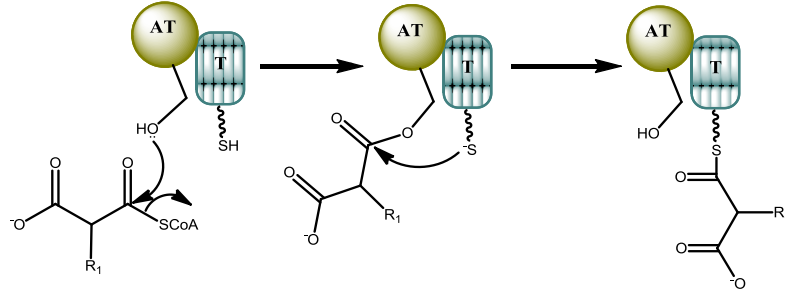
PKS-I’lerde her katalitik domain yalnızca bir biyosentez işleminden sorumludur. Buna karşın tekrarlı tip PKS-I’ler ise monomodüler yapıdadır. Ayrıca karbon zincirlerinin uzaması ve sonraki aşamalarda görev alan katalitik domainler birçok kez tekrarlanmaktadır (Jenke-Kodama ve ark. 2005). PKS-I, ketoaçilsentaz (KS), açıl transferaz (AT) ve fosfopantetein grubu içeren açıl taşıyıcı protein (ACP) olmak üzere üç temel domain içermektedir (Fischbach ve ark. 2006). Bu domainlere ek olarak oluşacak ürünün modifikasyonlarına bağlı olarak ketoredüktaz (KR), dehidrataz (DH), enolredüktaz (ER) ve tiiyosteraz (TE) domainlerini içerir.

PKS-II’ler aromatik yapıdaki poliketid bileşiklerin sentezinden sorumlu modüler enzim sistemleridir. Bu enzim sistemleri de PKS-I’ de olduğu gibi poliketid sentezinden sorumlu temel ve yardımcı katalitik domainleri içermektedir. Bunlardan ketoaçilsentaz (KS_{α} ve KS_{β}), açıl taşıyıcı protein (ACP) temel domainler olarak bulunmaktadır. PKS-II enzim sistemleri sentezlenecek olan poliketid bileşikteki kimyasal modifikasyonların gerçekleştirilmesinde görev alan ketoredüktaz (KR), metilaz, oksidaz, glikozil transferaz gibi yardımcı domainleri de içerebilmektedir.

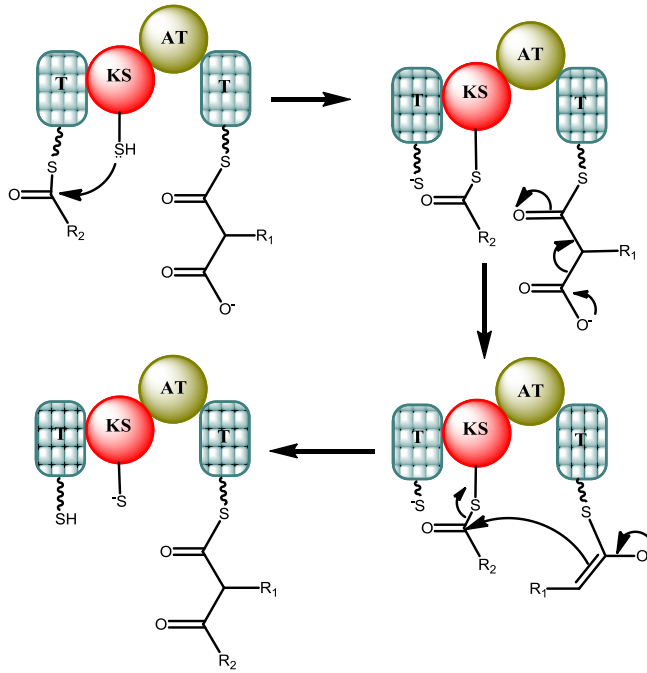
PKS’ler, NRPS’ler gibi gen kümesi şeklinde organize olmuşlardır. Büyük ve çok fonksiyonlu proteinleri şifreleyen geniş bir ORF (open reading frame/açık okuma çerçevesi) içermeleri bu genlerin tipik özellikleridir (Cortes ve ark. 1990). PKS gen

1. GİRİŞ

kümelerinin büyüklüğü ortalama 40 kb civarındadır. Bu gen kümelerinde, poliketidin sentezinden sorumlu enzimleri, gen regülasyonunu, taşıyıcıları ve dirençlilikte rol oynayan diğer proteinleri kodlayan genler bulunmaktadır. PKS gen kümeleri içinde KS domainleri yüksek oranda korunmuştur.



Şekil 1.6. PK sentezinin başlama aşaması. AT: AT domaini, T: ACP (Fischbach ve ark., 2006, Acer 2011).



Şekil 1.7. PK sentezinin uzama aşaması. AT: AT domaini, KS: KS domaini, T: ACP (Fischbach ve ark. 2006, Acer 2011).

1.6. Doğal Ürün Tarama Stratejileri

Yeni biyoaktif bileşiklerin taranmasında üç temel etken vardır. Bunlardan ilki organizmanın seçimi, ikincisi kültür metotları, sonuncusu ise bileşiklerin farklı tarama yöntemleriyle tespit edilmesidir. Genel olarak doğal ürün tarama stratejileri geleneksel ve yeni yöntemler olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Geleneksel yöntemler biyolojik aktivite temelli olup, organik ekstraktlardan analitik yöntemlerle biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve karakterizasyonu prensibine dayanır. Mikrobiyal ekstraktlarda bilinen metabolitlerin yeniden izolasyonu dereplikasyon olarak adlandırılmaktadır. Dereplikasyon biyolojik aktivite temelli doğal ürün araştırmalarında karşılaşılan önemli sorunlardan biridir. Özellikle 1990'lı yıllardan günümüze kadar yeni metabolit keşif oranlarının düşmesinin temel nedeni dereplikasyon sorunudur. Doğal ürün araştırmalarında yeni yöntemlerin geliştirilmesinin temel amaçlarından biri dereplikasyon sorunun üstesinden gelmektir. Özellikle bilinen metabolitlerin saflaştırma aşamasına geçmeden daha ekstrakt aşamasında tespiti için çeşitli veritabanları ve informatik programlar geliştirilmektedir. Bu sayede dereplikasyon sorunu aşılmaya çalışılmaktadır.

Yeni yöntemler ise, mikrobiyal genom dizilerinde yeni doğal ürün sentezinden sorumlu gen ve gen kümelerinin incelenmesi temeline dayanır. Yüksek Çıktılı Tarama (High Throughput Screening-HTS), genom taramaları, metagenomik yaklaşımlar, yeni kültür metodları ve kombinatoriyal sentez gibi gelişmiş teknolojilere dayalı yeni yöntemlerin kullanılması, bakteriyel kaynaklardan elde edilen biyoaktif doğal ürünlerin sayısını her geçen gün arttırmaktadır (Shen ve ark. 2006). Genom analizleri tamamlanan aktinomiset ve diğer mikroorganizmaların, klasik kültür ortamlarında tespit edilemeyen bazı doğal ürünlerin biyosentezinden sorumlu genlere sahip olduğu görülmüştür. Klasik kültür koşullarında ifade edilemeyen bu genler kriptik olarak adlandırılırlar. Özellikle aktinomisetlerin genomları incelendiğinde, kompleks yapılı çok sayıda doğal ürün biyosentezinden sorumlu kriptik gen kümelerinin varlığı ortaya çıkarılmıştır (Bently ve ark. 2002, Ikeda ve ark. 2003, Hosaka ve ark. 2013). Bu gen kümeleri uygun fiziksel veya kimyasal uyarıcılar olmadığı takdirde uyku halinde olup ifade edilmezler. Aktinomisetlerle yapılan yeni bileşik keşfi çalışmalarında genom tarama stratejisinin önemi bu açıdan

1. GİRİŞ

büyüktür. Genomda izi sürülen kriptik genlerin, uygun ortam koşullarında ifadesi sağlanmaktadır.

Genom projeleri doğal ürün taramalarında kullanılan önemli verilerden biridir. Özellikle son yıllarda DNA dizilimi maliyetlerinin ucuzlamasından ötürü tüm genom projesi tamamlanan mikroorganizma sayısı artmaktadır. Buna bağlı olarak ilgili genomlarda yeni doğal ürün biyosentez gen kümeleri tespit edilmektedir. Örneğin *S. viridochromonogenes* Tu57 genom projesinin tamamlanmasıyla, bakterinin oligosakkarit yapısındaki *avilamycin* antibiyotiğini sentezlediği bildirilmiştir (Grüning ve ark. 2013).

Mikroorganizmaların genomlarında, dejenere PCR primerleri ile NRPS ve PKS gen dizilerinin aranarak genetik potansiyellerin ortaya çıkarılması biyoaktif metabolitlerin tespiti için hızlı bir yaklaşımdır (Gonzales ve ark. 2005). Son moleküler yaklaşımlar, oldukça fazla sayıda kriptik NRPS ve PKS genlerinin varlığını göstermiştir. Organizmalarda yeni NRPS ve PKS genlerinin bulunması yeni poliketid ve peptidlerin üretimi için iyi ipuçları verebileceğinden bu genlerin sekanslanması yeni peptid ve poliketidlerin keşfi için bir tarama metodu olarak kullanılabilir (Zazopoulos ve ark. 2003, Ayuso ve ark. 2005, Komaki ve ark. 2009).

Genom tarama (genome mining) çalışmaları doğal ürün araştırmalarında son dönemde en yaygın kullanılan yöntemlerdendir (Zerikly ve ark. 2009). Genom veri tabanlarında depolanmış DNA dizilimlerinin istatistik ve algoritmik programlarca analiz edilmesi prensibine dayalı bu yöntemle birçok yeni doğal ürün gen kümesi keşfedilmiştir.

Sıradışı habitatlara adaptasyon sağlamış mikroorganizmaların standart laboratuvar koşullarında kültüre edilmeleri oldukça zordur. Bu amaçla yeni kültür metotları geliştirilmesine rağmen mikroorganizmaların ancak %1'i standart koşullarda kültüre edilebilmektedir. Metagenomik yöntemle dayalı doğal ürün tarama stratejisi, çevresel örneklerden doğrudan izolasyonu yapılan DNA örneklerinde biyosentez gen kümelerinin tespit edilmesidir. Bu yöntem ile 2015'in hemen başında dirençli patojen bakterilerin büyümesini inhibe eden *teixobactin* adlı yeni bir peptid antibiyotik tespit edilmiştir (Ling ve ark. 2015).

1.6.1. Kimyasal Tarama Yöntemi

Kimyasal tarama yöntemi, bir ekstrakttaki bileşiklerin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrılması sonucu ortaya çıkan spot bölgelerinin değişik renklendirici ajanların uygulanması sonucunda vermiş oldukları spesifik renk değişimlerine bağlı olarak kimyasal yapıları hakkında bilgi edinilmesi temeline dayanır (Maier ve ark. 1999). Bu renk değişimleri doğrultusunda olası fonksiyonel grupları tespit edilen metabolitler çeşitli analitik yöntemler (kolon kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-HPLC) ile saflaştırıldıktan sonra spektroskopik yöntemlerle (nükleer magnetik rezonans-NMR, kütle spektroskopisi-MS) yapı analizleri gerçekleştirilir. Bu tarama yöntemi, ucuz ve basit olmasından dolayı çok sık kullanılan bir metottur.

1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Temelli Tarama Yöntemi

Sekonder metabolizma ile bağlantılı genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Mikroorganizmaların genomlarında, özellikle dejenere PCR primerleri ile NRPS ve PKS gen dizilerinin aranarak genetik potansiyellerin ortaya çıkarılması biyoaktif metabolitlerin moleküler düzeyde tespiti için hızlı bir yaklaşımdır. Bu tarama stratejisi özellikle tüm genom dizilimi mevcut olmayan izolatların doğal ürün biyosentez potansiyellerinin belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir. PKS-I ve NRPS gen kümeleri birçok bakteriyal genomda analiz edilmiştir (Özellikle karasal aktinomisetlerde). 4 mbç'den daha küçük olan genomlarda yalnızca birkaç tane gen kümesi bulunmasına karşın, genom büyüklüğünün artışıyla beraber bu gen kümelerinin sayısının yüksek oranda arttığı gösterilmiştir (Donadio ve ark. 2007). Çoğu aktinomiset (örneğin *Streptomyces* türleri) 8 mbç civarında büyük genomlara sahiptir. Bu türlerin, genomlarında sekonder metabolit sentezi için 20 ile 40 arasında gen kümesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Örneğin *Streptomyces avermitilis*, antiparazitik *avermectin*, antibiyotikler *oligomycin* ve *filipin* gibi çok iyi bilinen üç poliketid bileşiğinin gen kümesini içermektedir. Buna ek olarak, biyosentetik ürünü bilinmeyen sekizer adet PKS ve NRPS ile bir adet PKS III aynı genomda tespit edilmiştir (Nett ve ark. 2009). Genom projesi tamamlanmış diğer bir tür olan *Streptomyces roseochromogenes* subsp. *oscitans* DS 12.976'nın, fonksiyonu

bilinmeyen fazla sayıda NRPS ve PKS genlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Rückert ve ark. 2014). Bu çalışmaların yanısıra, bu yöntem ile elde edilen amplikonların prob olarak kullanılmasıyla çok sayıda biyosentetik gen kümesine ulaşılmıştır. Buna en güzel örnek *leinamycin* ve *pekistomycin* gen kümelerinin tespit edilmesidir (Yi Qiang ve ark. 2002, Thaker ve ark. 2013). Ayrıca yine bu yöntem ile *Streptomyces* türlerinin kültür ortamında ürettiklerinden çok daha fazla miktarda NRPS ve PKS genlerine sahip olduğu saptanmıştır (Ehrenreich ve ark. 2005). DNA dizi analizi yapılan genomlarda gün yüzüne çıkarılmamış oldukça önemli kimyasal bir çeşitliliğin olduğu açıktır. Farklı *Streptomyces* türlerinin şimdiye kadar tanımlanmamış poliketid ve peptid bileşiklerini üretebilme olasılığı büyüktür.

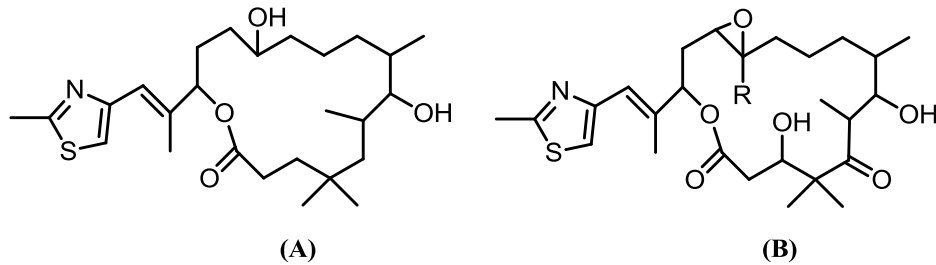
1.6.3. Genom Tarama (Genome Mining) Yöntemi

Son zamanlarda büyük ilaç şirketleri, çoğu aktinomiset orjinli yeni doğal ürün tarama çalışmalarından bazı nedenlerden dolayı vazgeçmiştir. Bu nedenlerden en önemlisi, tarama programlarının oldukça yüksek maliyetli olması ve bulunan yeni ilaç aday sayısının az olmasıdır. Ayrıca, kimyasal tarama stratejileri ile gerçekleştirilen geçmiş araştırmalarda, mevcutta bulunmuş olan bileşiklerin yeniden izole edilerek tanımlanması da (dereplikasyon) hem zaman hem de ekonomik açıdan kayıplara sebep olmuştur. Genom projelerinin sayısının zamanla artması ve genetik tarama stratejilerinde bu tür dezavantajların olmamasından ötürü, son yıllarda ilaç şirketleri aktinomiset kaynaklı yeni ilaç keşfi çalışmalarına yeniden hız kazandırmıştır.

DNA dizi analizi teknolojilerinde hızlı ve pahalı olmayan yeni gelişmeler sayesinde toplamda 43.362 mikrobiyal genom projesinden 26.779'u (%61) tamamlanmıştır (www.gold.jgi.doe.gov). Mikrobiyal genom projesi oranlarının filogenetik olarak gruplardaki dağılımına bakıldığında ise, %34 oranı ile en fazla Proteobacteria, en az ise %12 ile Actinobacteria olduğu görülmektedir. Genom projelerinin biyolojik örneklerin izolasyonlarının gerçekleştirildiği ekosistemlere göre dağılımı incelendiğinde %25 ile sucul ortamların karasal ortamlara üstünlük sağlandığı ve bu sucul örneklerin %17 ile deniz orjinli olduğu görülmektedir (www.genomesonline.org).

Genom tarama yönteminin en temel bileşenleri biyoinformatik programlardır. Son dönemde geliştirilen ‘antiSMASH ve ‘NapDOS’ biyoinformatik programlar substrat tahmini yapabildiklerinden, ötürü doğal ürün iskelet yapısı hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Özellikle NRPS’lerde A, PKS-I’lerde ise AT domainleri substrat seçimini yaptıklarından ötürü, biyoinformatik programlar bu domainlerin DNA dizi analizlerinden doğal ürünlerin iskelet yapısı ile ilgili tahminler yapmaktadır. Bu domainlere ek olarak ana iskelet yapının modifikasyondan sorumlu glikozil transferaz, aminotransferaz, metil transferaz, dehidrataz ve halogenaz genlerinin dizi analizleri doğrultusunda, kimyasal yapıdaki olası fonksiyonel grupları da tahmin edilebilmektedir. Buna en güzel örnek şekil 1.8. A ve B’de görüldüğü üzere *epothilone*’un ana iskelet yapısı, biyoinformatik programlarca ana iskelet yapıya yüksek benzerlikte tahmin edilmiştir (Li ve ark. 2009).



Şekil 1.8. *Epothilone* (Tahmini) (A) ve *Epothilone* (Gerçek) (B) moleküllerin kimyasal yapıları

1.6.3.1. Kütle Spektroskopisi Temelli (MS) Genom Taraması

Genomik araştırmaları ile değişik varyetede birçok organizmadan elde edilen büyük miktarda DNA sekans verisi ulusal veri tabanlarında depolanmaktadır. Araştırmacıların erişimine açık olan DNA sekans verileri doğal ürün keşfi için yeni biyoinformatik araçlardan faydalanılmasının yolunu açmaktadır. Bu çaba, doğal ürün biyosentez mekanizmalarının hem genetik hem de enzimatik olarak araştırılmasını mümkün kılmaktadır. Sekanslanan genomlarda, doğal ürün biyosentez metabolik yolunu kodlayan gen kümelerinin analizi ve tanımlanması biyoinformatik programlarla gitgide kolaylaşmaktadır. Bu gen kümelerinin büyük bölümü, ürünü kültür ortamlarında tespit

1. GİRİŞ

edilemeyen kriptomik gen kümelerinden oluşmaktadır. Bu durum son 50 yılda antibiyotik üretiminin eşsiz lideri aktinomisetler üzerinde yoğun şekilde çalışılmasının temel nedenidir.

Çeşitli veri tabanlarında analiz edilmeyi bekleyen binlerce genom dizilimi bulunmaktadır. Bu dizilimlerin analizlerinin kimyasal verilerle desteklenmesi doğal ürün araştırmalarındaki en yeni stratejidir (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Doğal ürün tarama yöntemleri ve bulunan bileşikler

Yöntem	Bileşik	Organizma
Kimyasal Tarama	<i>Cineromycine, musacins</i>	<i>S. griseoviridis</i> (Burkhardt ve ark. 1996)
PCR Dayalı Genom Taraması	<i>Rubradirin</i>	<i>S. achromogenes</i> (Sohng ve ark. 1997)
Genom Taraması	<i>Salinilactam</i>	<i>S. tropica</i> (Udwary ve ark. 2007)
MS Temelli Genom Taraması	<i>Stenothricins</i>	<i>S. roseosporus</i> (Kersten ve ark. 2014)

Bir organizma tarafından sentezlenen metabolitlerin tamamı metabolom olarak adlandırılmaktadır. Metabolomiks, ise metabolom analizlerinin yapıldığı araştırma alanına verilen genel isimdir. Mevcut veritabanlarıdaki DNA dizi analizleri verileriyle gerçekleştirilen genom taramalarında olduğu gibi, analitik yöntemlerle elde edilen kimyasal veriler doğrultusunda metabolom taramaları (metabolome mining) da yapılmaktadır. Kütle spektroskopisi (MS), metabolom taramalarında kullanılan en önemli analitik yöntemdir. Belli bir ekstrakt içinde çok düşük konsantrasyonlardaki metabolitlerin tespitinde, hem oldukça hassas olması hem de kimyasal yapısı hakkında bilgi vermesinden dolayı, doğal ürün araştırmalarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca yüksek performanslı sıvı kromatografisi (LC/MS-LC/MS/MS), gaz kromatografisi (GC/MS), nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (LC/NMR/MS) gibi diğer analitik yöntemlerle kombine kullanılabilirliği bu yöntemin en temel özelliklerinden biridir.

MS'in temel prensibi iyonize bileşiklerin kütle/yük (m/z) oranının tespit edilmesidir. Tipik bir MS cihazı, iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. İyon kaynağına göre elektropray iyonizasyon (ESI) ve matriks ilişkili lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) gibi gruplara ayrılmaktadır. Bu kısım cihazın ilk kısmında yer almakla birlikte bileşiklerin iyonizasyonunun gerçekleştiği bölümdür. Analizör ise farklı özellikteki iyonların birbirinden ayrıldığı kısımdır. Time of

Flight (TOF) ve quadrupol (Q) gibi analizör tipine göre farklı MS cihazları mevcuttur. Ayrıca iki farklı analizörün birlikte bulunduğu hibrit MS sistemleri MS/MS analizinde kullanılmaktadır. Son aşamada ise iyonlar dedektör aracılığıyla sayılarak ilgili tüm veri bilgisayar ortamına aktarılmaktadır.

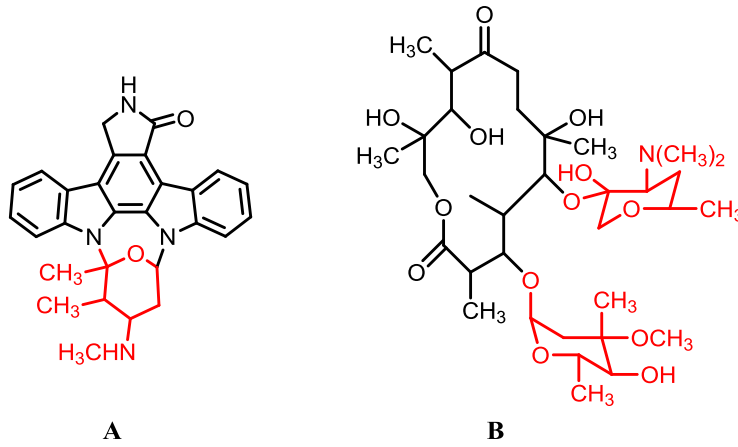
MS/MS analizleri analiz edilen iyonların fragmentasyonuna neden olduğundan bileşiklerin kimyasal yapısı hakkında oldukça önemli bilgi vermektedir. Bu sebepten dolayı doğal ürün araştırmalarında MS/MS analizleri önemli bir kullanım alanına sahiptir. Hibrit MS sistemindeki ilk analizör tarafından tespit edilen iyona ait fragment iyonlar ikinci analizör tarafından tespit edilerek sıralı MS (tandem MS) veya MS/MS verisi olarak çeşitli veri tabanlarında ve programlarda analiz edilmek üzere kullanılmaktadır. Doğal ürünlerin toplu moleküler ağı (Global Natural Products Social Molekuler Network ‘GNPS’) dereplikasyon analizi için en yaygın kullanılan veritabanlarından biridir (www.gnps.ucsd.edu).

Son yıllarda doğal ürün araştırmalarında genomik bilginin kimyasal verilerle kombine edilmesi prensibe dayalı farklı stratejiler geliştirilmiştir. Özellikle MS/MS analizi sonucundaki metabolit fragmentasyon verisinin, biyoinformatik temelli genom taramaları sonuçlarıyla birleştirilmesiyle ‘peptidogenomik’ ve ‘glikogenomik’ tarama stratejileri geliştirilmiştir (Kersten ve ark. 2013). Her iki stratejinin temelinde, MS verisiyle genomik bilginin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

MS/MS fragmentasyonu sonucunda peptidler (ribozomal ve ribozomal olmayan) daha küçük peptidlere parçalanmaktadır. Bu parçalanma sonucunda peptid yapısından kopan her aminoasit spesifik kütle kayma değerine sahip olmaktadır. Bu değere bağlı olarak peptidin yapısındaki aminoasitler belirlenebilmektedir. Fragmentasyon temelli aminoasit bilgisi, biyoinformatik programlarca peptid sentezinde olası substrat olarak kullanılan aminoasit sonuçlarıyla karşılaştırılıp doğal ürün biyosentezinden sorumlu gen kümesine ulaşılmaktadır (Kersten ve ark. 2013). Peptidogenomik olarak adlandırılan bu yöntem ile *stenotheicins* örneğinde olduğu gibi yeni doğal ürünler keşfedilmektedir (Kersten ve ark. 2011).

1. GİRİŞ

Glikozilasyon, doğal ürün biyosentezinde en yaygın görülen modifikasyon reaksiyonlarından biridir. Glikozilasyon reaksiyonlarının metabolitlerin hücreler arası haberleşme, moleküler tanıma ve biyolojik aktivite açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir. *Lomaiviticin* ve *landomycine* gibi glikolize doğal ürünlerin biyolojik aktivite potansiyelinin şeker üniteleriyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Zhu ve ark. 2005, Woo ve ark. 2012). Ribozomal (*nocathiacin*), ribozomal olmayan (*vancomycin*), alkaloid (*staurosporine* şekil 1.9. A) poliketid (*erythromycin*, şekil 1.9. B), ve terpen (*phenalinolactone A*) gibi birbirinden oldukça farklı yapılarda glikolize doğal ürünler mikroorganizmalarca sentezlenmektedir. Mikrobiyal glikolize doğal ürünlerin yapısında yüzü aşkın farklı şeker ünitesi mevcuttur.



Şekil 1.9. Glikolize *Staurosporine* ve *Erythromycin*'in molekül yapısı

Glikolize doğal ürünler yapılarında bulunan şeker ünitesine göre MS/MS analizinde spesifik fragmentasyon sinyali verirler. Bu sinyaller doğrultusunda doğal ürün yapısındaki şeker ünitesi tespit edilebilmektedir. Glikozil transferaz, 2,3 dehidrataz, metil transferaz, aminotransferaz ve nükleotid transferaz glikolize doğal ürün biyosentez gen kümelerinde bulunan spesifik genlerdir. Doğal ürün biyosentezinden sorumlu mikroorganizmanın genomunda biyoinformatik programlarla bu spesifik genlerin taranması sonucunda olası biyosentez yolları tespit edilmektedir. MS/MS verisinden glikolize doğal ürün biyosentez gen kümesine ulaşılması 'glikogenomik' olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak

peptidogenomik ve glikogenomik MS orjinli genom tarama yöntemleri olarak sınıflandırılmaktadır.

1.6.4. Moleküler Network (Ağ) Analizi

İnformatik 21. yüzyılın en önemli araştırma alanlarından biri olup birbirinden farklı birçok araştırma alanında kullanılmaktadır. Biyolojide DNA dizi analizlerinin yorumlanmasında kullanılan biyoinformatik son zamanlarda kimyasal verilerin değerlendirilmesinde de oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. İformatiğin hem kimya hem de biyolojiye entegrasyonu bu araştırma alanlarında oldukça yeni veriye ulaşılmasına neden olmuştur. Biyolojik fermentasyon sonucu elde edilen ekstraktlarda bilinen metabolitlerin hızlı bir şekilde tespiti, yeni doğal ürünlerin keşfi açısından oldukça önemlidir. Bunun dışında olası bir dereplikasyon sonucunda harcanan zaman, emek ve maliyetin minimize edilmesinde de rol oynamaktadır. Bu amaç doğrultusunda son yıllarda çeşitli metabolomik temelli veritabanları ve algoritmik programlar geliştirilmiştir (Çizelge 1.3.). Çeşitli analitik yöntemlerle elde edilen kimyasal verilerin bu veritabanları ve programlarda analizi ile bilinen metabolitler basit ve hızlı bir şekilde tespit edilmektedir.

Çizelge 1.3. Doğal ürün tarama veritabanları

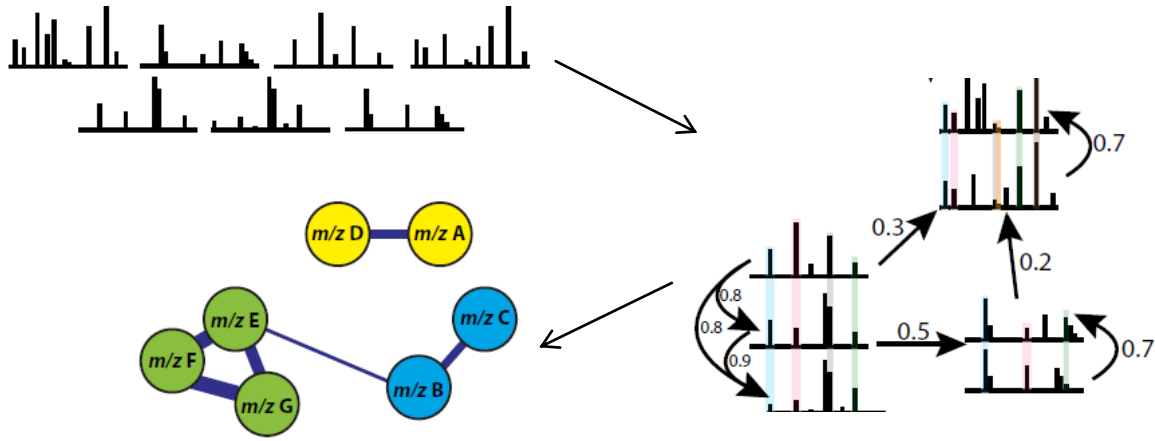
Veritabanı	Web Adresi
GNPS	www.gnps.ucsd.edu (Watrous ve ark. 2012)
Norine	www.bioinfo.lifl.fr
Scifinder	www.cas.org
Metlin	www.scripps.edu (Smith ve ark. 2005)
Massbank	www.massbank.jp
AntiBase	www.user.gwdg.de
Marinlit	www.chem.canterbury.ac.nz (Blunt ve ark. 2007)
Drugbank	www.drugbank.ca (Law ve ark. 2013)
HMDB	www.hmdb.ca (Wishart ve ark. 2012)

Primer ve sekonder metabolizma sonucunda mikroorganizmalarca üretilen binlerce metabolit ekstrasellüler olarak hücre dışına salgılanmaktadır. Bu metabolitlerle ilgili çok sayıda veri analizi yine bu programlar ve veritabanlarıncı kısa sürede gerçekleşmektedir. Bu analizler sonucunda hem primer ve sekonder metabolizma ürünlerinin ayrımı hem de bilinen ve yeni olmaya aday metabolitlerin tespiti yapılabilmektedir.

1. GİRİŞ

Moleküler network (ağ) analizi geçtiğimiz birkaç yıl içinde geliştirilmiş yeni bir dereplikasyon ve metabolomiks yöntemidir. Bu yöntem herhangi bir ekstrakt ve biyolojik örnek içinde bulunan metabolitlerin MS/MS verilerinin analizine dayanmaktadır.

MS/MS analizi sonucunda benzer fragmentasyona sahip iyonlar kimyasal yapı olarak birbirine benzerlik gösterir. Şekil 1.10.'da da görüldüğü gibi moleküler network analiziyle benzer fragmentasyona sahip iyonlar network içinde birlikte gruplandırılmaktadır. Bu gruplandırma benzer fragment iyon sayısı ve MS/MS pik yoğunluğuna göre program tarafından vektörel büyüklük (cosine değeri) olarak hesaplanır.



Şekil 1.10. Moleküler Network (Ağ) Analizi (Watrous ve ark. 2012).

Networkta yüksek cosine değerine sahip iyonlar kimyasal açıdan yakın benzerlik gösterirken, tersi durumda ise iyonlar arasında herhangi bir etkileşim görülmemektedir.

Özellikle deniz aktinomisetleri ve siyanobakteri ekstraktlarının moleküler network analizleri sonucunda bilinen doğal ürünlerin farklı türevleri keşfedilmektedir (Yang ve ark. 2013). Bu analizlerle çeşitli biyolojik örneklerde bulunan metabolitlerin kimyasal çeşitliliği de hızlıca tespit edilmektedir.

1.7. Antibiyotik Dirençliliği

Antimikrobik tedavilerin amaçlı olarak aşırı miktarda ve gelişigüzel kullanımı birçok bakteri türünün mevcut ilaçlara karşı dirençlilik geliştirmesine yol açmaktadır. Son yıllarda hızlı bir şekilde antibiyotiklere dirençli türlerin ortaya çıkmasından dolayı, bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Özellikle hastane enfeksiyonlarında, *Enterococcus faecalis*'den *Staphylococcus aureus*'a kadar birçok patojenik bakterinin güncel olarak kullanılan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir (Mehdi ve ark. 2006). 1980 yılından önce *methicillin* dirençli *S. aureus* oranı %3'ten az iken bu oran son zamanlarda %40'ın üzerine çıkmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde hastalardan izole edilen *Streptococcus pneumoniae*'dan %34'ünün *penicilline*, *Hemophilus influenzae*'dan %32'sinin *ampicilline*, *Moraxella catarrhais*'lerin ise %92'sinin *penicilline* ve *erythromycine* dirençli olduğu bulunmuştur (İkeda ve ark. 2003). Bunlardan başka; *Mycobacterium tuberculosis*, *rifampicin*, *isoniazid* ve *ethambutol* gibi ilaçlara karşı dirençlilik kazanmış olup (Morlock ve ark. 2003), Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 verilerine göre 9.200.000 hastadan 1.700.000'ü tüberkülozdan ölmektedir. 2011 yılında Almanya'da *E. coli* ile enfekte olmuş sebzelerden etkilenen 5000 kişinin 50'sinden fazlası bu enfeksiyonlardan dolayı hayatını kaybetmiştir (Bush ve ark. 2011). Amerika Birleşik Devletleri'nde karbapenemaz üreticisi *Klebsiella pneumoniae*'nin yaygın hastane enfeksiyonlarına neden olduğu rapor edilmiştir (Bartlett ve ark. 2013). Yine Birleşik Devletler'de her yıl yaklaşık 19.000 ölümün *methicillin* dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (Klevens ve ark. 2007). Yeni Delhi'de metalo- β -laktamaz dirençli mikroorganizmalar 2010 yılında rapor edildikten sonra, hastane enfeksiyonu nedeniyle ölen hastaların sayısında artış gözlenmiştir (Mulvey ve ark. 2011). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2011 yılında yaptığı açıklama doğrultusunda, Avrupa genelinde her yıl 25.000 kişinin dirençli mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonlar sonucu öldüğü rapor edilmiştir. WHO'nun yayınlamış olduğu enfeksiyon hastalıkları raporunda, 2013 yılında 9 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle öldüğü bildirilmiştir. Bakteri enfeksiyonlarına ek olarak fungal enfeksiyonların ölüme sebebiyet veren en büyük faktör olduğu saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde kan kültürlerinden üçüncü olarak en fazla izole edilen türler *Candida* türleridir (Pfaller ve ark.

1. GİRİŞ

2007, National Strategy for Combating Antibiotic Resistant Bacteria Report 2014). Ayrıca immünbaskılayıcı ilaçlar ve kemoterapi alan ve aynı zamanda doku transferi yapılmış hastalarda; *Candida*, *Aspergillus* ve *Fusarium* enfeksiyonlarından ölüm oranları oldukça yüksektir. Antifungal ajanlar insan ve hayvan hastalıklarının yanı sıra, bitki ve ekinlerin korunmasında, gıda endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

Özellikle 1990'lerden bu yana *vancomycin* dirençli enterokokların ortaya çıkışı, buna ek olarak bağışıklık sisteminin çökmesine neden olan virüsler örneğin HIV gibi yeni patojenlerin ortaya çıkması, doğal ürünlerin önemini tüm dünyada artırmaktadır. Patojenlerin mevcut ilaçlara dirençlilik kazanmasından ve toksisitesi daha az ilaçların geliştirilmesi ihtiyacından ötürü yeni ilaçlara veya ilaç öncü maddelerine gereksinim vardır. Bu açıdan geniş spektrumda biyolojik aktiviteye sahip mikrobiyal kökenli doğal ürünler, yeni ilaç öncü maddelerinin en önemli kaynağı durumundadır. Bir matematiksel modellemeye göre aktinomisetler tarafından sentezlenen tüm biyoaktif bileşiklerin şimdiye kadar yalnızca %3'ü rapor edilmiştir (Watve ve ark. 2001). Bu da yeni teknolojiler kullanılarak keşfedilecek çok büyük miktarda yeni ilaç adaylarının olduğunu düşündürmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Doğal ürün biyosentezi ile ilişkili genlerin PCR ile taranması aktinomisetlerin biyosentetik potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Bu genler, NRPS, PKS-I ve PKS-II, hidrosimetilglutaril koenzimA redüktazlar ve aminoglikozit dirençlilik genleridir. Özellikle NRPS ve PKS genleri şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen biyoaktif metabolitlerin çoğunluğunun yapısını oluşturmaktadırlar (Barrios-Llerena ve ark. 2007). NRPS ve PKS'lerin, antibiyotikler, toksinler, sideroforlar ve immünbaskılayıcılar gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur (Ehrenreich ve ark. 2005). PKS'ler, farmasötik ve endüstriyel öneme sahip biyoaktif bileşikler içeren poliketid bileşiklerin biyosenteziyle ilişkili olan multienzim kompleksleridir (Moffitt ve Neilan 2002). Global ölçekte büyük sıklıkta kullanılan antibiyotiklerin çoğu (örneğin *erythromycin A*) PKS'ler tarafından üretilmektedir (Ehrenreich ve ark. 2005). Dejenere PCR primerleri ile NRPS ve PKS-I gen dizilerinin hedef alınması bu metabolitlerin tespiti için hızlı bir yaklaşımdır (Gonzales ve ark. 2005).

Streptomyces caelestis türünde *nidamycin* sentezinden sorumlu PKS genlerinin teşhis edilmesi için yapılan bir çalışmada, KS ve AT domainlerinin korunmuş dizimleri baz alınarak oluşturulan dejenere primerler kullanılmıştır. Elde edilen yaklaşık 900 bç büyüklüğündeki fragmentler klonlanmış ve rastgele seçilen 7 klonun sekans analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda daha önce rapor edilen *nidamycin* antibiyotiğinin sentezinden sorumlu PKS gen kümesi modülündeki KS ve AT domainleri ile aynı olduğu gösterilmiştir (Stephan ve ark. 1997).

Stigmatella aurantiaca ile yapılan çalışmada PKS-I gen kümesinin KS domainini hedef alan primerler kullanılarak amplifiye edilen fragmentler klonlanmış olup sekans analizleri sonucunda şimdiye kadar bulunmuş olan PKS gen kümeleri ile düşük oranda benzerlik gösterenlerden dördünün yeni NRPS/PKS hibrit gen kümesi olduğunu belirtilmiştir (Silakowski ve ark. 2001).

Streptomyces atroolivaceus'da tiyazol grubuna sahip antitümör aktiviteli bir bileşik olan *leinamycin*'in biyosentez gen kümesi tanımlanmıştır. Bunun için kosmid kütüphaneler,

2. KAYNAK ÖZETLERİ

siklizasyon ve oksidasyon domainlerinden elde edilen problemlerle taranmıştır (Yi-Qiang ve ark. 2002).

Zazopoulos ve arkadaşları (2003) PKS ailesinden sentezlenen enedim antitümör bileşiğinin biyosentez genlerini, ellerindeki aktinomisetler içerisinde PCR ile taramış ve standart fermentasyon koşullarında eneydin elde edilemeyen aktinomisetlerin bu bileşiğin biyosentez genlerini taşıdığını tespit etmişlerdir. Kültür koşullarında eneydinlerin üretimini indükleyerek bunları saflaştırmayı başarmışlardır.

2004 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar aktinomisetlerde NRPS ve PKS-I genlerini amplifiye etmek için onlara özgü primerler tasarlamışlar ve PCR'a dayalı tarama yöntemi ile taradıkları türlerin %79,9'unda NRPS ve %56,7'sinde PKS-I genlerinden ürün elde edilmiştir. Bu genlerin tarandığı türler arasında *Streptomyces* türleri en iyi potansiyeli göstermiştir. Elde edilen domainlerin bilinen adenilasyon domainleri ile %61-99 değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini saptamışlardır (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005).

Gonzalez ve arkadaşlarının (2005) likenlerden izole ettikleri aktinomisetlerin doğal ürün biyosentez genlerini inceledikleri çalışmada NRPS, PKS-I ve PKS-II genleri dejenere PCR primerleriyle amplifiye edilmeye çalışılmıştır. Bunun sonucunda izolatların; %62,6'sında PKS-I, %64,7'sinde PKS-II ve %58,5'inde NRPS biyosentetik genlerini amplifiye etmişlerdir. Ayrıca, klasik kültür koşullarında tüm izolatların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri %27 olarak tespit edilmiştir. Bununla; klasik kültür koşullarında üretimi başarısızlıkla sonuçlanmış olan doğal ürünlerin, genom analizleri ile ortaya çıkarılması ve yeni biyoaktif doğal bileşiklerin tespiti, ekspresyonu ve saflaştırılmasının mümkün olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Ayuso ve arkadaşları (2005) türlerin doğal ürün sentez genlerini hedef alarak metabolik potansiyele dayalı bir tür karakterizasyon sistemi ortaya koymuşlardır. Amplifiye edilen PKS-I, PKS-II ve NRPS dizilerini restriksiyon analizlerine tabii tutarak bir parmak izi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin toprak örneklerinden izole edilen aktinomisetlerde NRPS ve PKS biyosentetik sistemlerinin taranmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. İzolatlar arasında en fazla olarak *Streptomyces* cinsinde çok aktif türlere

rastlamışlardır. Özellikle bu cinste biyosentetik genlerin varlığı ve antimikrobiyal aktivite üretimi arasında sıkı bir paralelliğe rastlanmıştır.

Ehrenreich ve arkadaşları (2005) 24 farklı sucül siyanobakteri örneklerinde dejenere PCR primerleri kullanarak, organizmaların %54'ünde NRPS ve %92'sinde PKS amplifikasyonu elde etmişlerdir. Amplifiye edilen genlerin siyanobakteri genom araştırmaları ile karşılaştırıldığında çoğunun diğer siyanobakterilerde tanımlanmadığı ve bunların yeni doğal ürünler olabileceği ihtimalini vurgulamışlardır. Ayrıca amplifiye edilen gen fragmentleri siyanobakterilerdeki doğal ürünlerin keşfi ile ilgili çalışmalarda prob olarak kullanılmıştır. Sonrasında elde edilen amplikonların sekans analizleri BLAST programında incelendikten sonra daha önce rapor edilmeyen A ve KS domainleri tespit edilmiştir.

Ostash ve arkadaşları (2005) PCR stratejisini temel alarak aktinomisetlerin genomunda PKS-I genlerini taramışlardır. *Streptomyces globisporus* 1912 türünde amplifiye ettikleri PKS-I amplikonlarını klonlayarak, sonrasında yapılan sekans analizinde BLASTX homolojilerinden yola çıkarak bu fragmentlerin *pimaricin* ve *nystatin* gibi antifungal polien bileşiklerin sentezinde rol oynayan PKS-I genleri ile homoloji gösterdiğini belirlemişlerdir.

Deniz aktinomiset çeşitliliğinin ve biyosentetik metabolik yollarını tarandığı bir çalışmada, incelenen 38 aktinomisetin; %70'inde NRPS ve %13'ünde PKS-I genleri, *Micromonospora* cinsine dahil bir izolatta ise PKS-II geni tespit edilmiştir. Araştırmacılar, çok az çalışılmış sıradışı habitatların sekonder metabolit sentezleme yeteneği olan türler açısından zengin kaynaklar olabileceğini bildirmişlerdir (Pathom-aree ve ark. 2006).

PKS-I genlerini hedef almak için dizayn edilen dejenere primerler yardımıyla aktinomisetlerde tespit edilen iki yeni PKS-I geninin, immünbaskılayıcı benzeri bir metabolitin biyosentezinde görevli olduğunu tespit edilmiştir. Üretilen bileşiklerin TLC (Thin Layer Chromatography/İnce Tabaka Kromatografisi) ile incelenmesi sonucu, bu bileşiklerin, ticari olarak kullanılan immünbaskılayıcılar; *FK506* ve *rapamycin* ile kıyaslandığında farklı özellikte bileşikler olduğunu belirtmişlerdir (Savic ve ark. 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Vivian Miao ve ark. (2006) tarafından *Streptomyces fradie* ile yapılan bir çalışmada A domaininden elde edilen problemlerle kosmid kütüphanelerin taranması sonucunda Gram (+) patojenlere etkili lipopeptid A54145'in NRPS gen kümesi tanımlanmıştır. Bu gen kümesinin 127 kb büyüklüğünde olduğu ve 4 tane NRPS geni içerdiği tespit edilmiştir.

Xihou Yin ve arkadaşları (2006), tarafından yapılan bir çalışmada 84 kb'lık ve 25 ORF içeren 17 aminoasit'lik *enduracidin* gen kümesini tanımlanmıştır. Kosmid kütüphaneler, hem A domaini hem de prefanat dehidrogenaz geninden elde edilen amplikonlarla taranmıştır.

Lei Li ve arkadaşları (2007), *Streptomyces lavendulae* ile yaptıkları çalışmada, bu organizmanın genomunu A domaini problemleri ile tarayarak, antitümör aktiviteye sahip 62 kb büyüklüğünde, 30 açık okuma çerçevesi (ORF) tetrapeptid *saframycin* gen kümesini tespit etmişlerdir.

Barrios-Llerena ve arkadaşları (2007) 21 siyanobakteri türünde doğal ürün sentezinden sorumlu NRPS ve PKS-I genlerinin sırasıyla A ve KS domainlerini hedef alan dejenere PCR primerlerini kullanarak bu genleri moleküler tarama yöntemiyle tespit etmeye çalışmışlardır. Taranan izolatların 19'unda PKS-I ve 18'inde NRPS genlerini tespit etmişlerdir. A domaini fragmenti taşıyan, 33 klonun BLASTX analizlerinde siyanobakterilere ait bilinen NRPS sekanslarıyla %43-97 arasında benzerlik gösterdiğini, tespit etmişlerdir. Aynı zamanda KS domaini fragmenti taşıyan 29 klonun BLASTX analizinde siyanobakterilere ait bilinen PKS sekanslarıyla % 49-95 arasında benzerlik gösterdiğini, tespit etmişlerdir.

Jiang ve arkadaşları (2007) izole ettikleri 24 aktinomiset grubuna dahil deniz izolatının doğal ürün senteziyle ilişkili olan NRPS, PKS-I ve PKS-II genlerini taramışlardır. Bunun sonucunda izolatların %92'sinde NRPS, %54'ünde PKS-I ve %71'inde PKS-II amplifikasyonu eldesi rapor edilmiştir.

Sediment örneğinden izole edilen iki bakteri türünden amplifiye edilen NRPS ve PKS-I gen fragmentleri uygun vektörlere klonlanmıştır. Klonların BLASTX analizi sonucunda PKS-I için %80'in, NRPS için %60'ın altında sekans homolojileri olduğunu

görülmüştür. Ayrıca aminoasit sekanslarının filogenetik analizinde iki türde %70'in altında benzerlik gösteren toplam 5 farklı grup ve hibrid NRPS-PKS enzim kompleksleri tespit etmişlerdir. %70'in altında homoloji göstermesinin, bu genlerin daha önce tespit edilmemiş yeni genler olabilme ihtimalini arttırmakta olduğunu belirtmişlerdir (Zhao ve ark. 2008).

2008 yılında yapılan bir çalışmada mikrobakteri genomunda PCR yöntemi ile PKS-I gen kümesi araştırılmış ve bu gen kümesinin KS ve AT domainlerini hedef alan primerler kullanılmıştır. Elde edilen ampikonların DNA dizimleri BLAST programında araştırıldıktan sonra araştırmacılar elde ettikleri verileri iki grupta toplamışlardır. Buna göre aminoasit homolojisi %70 ve altında olan domainlerin yeni PKS-I genleri olmaya aday olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (Komaki ve ark. 2008).

Deniz suyu örneklerinden izole edilen *Streptomyces* cinsine dahil 7 izolatın KS domainini PCR ile amplifiye edip klonlanmış, sonrasında yapılan sekans analizi sonucunda izolatlarda, farklı organizmalarla farklı oranlarda benzerlik gösteren toplam 13 farklı PKS-I geni rapor edilmiştir (Hakvag ve ark. 2008).

Jiang ve arkadaşları (2008) deniz suyundan izole ettikleri 30 aktinomiset NRPS, PKS-I, PKS-II genlerini hedef alan primerler kullanarak doğal ürün senteziyle ilişkili bu genler açısından izolatların potansiyellerini araştırmışlardır. İzolatların %87'sinde NRPS, %80'inde PKS-I, %73'ünde PKS-II, amplifikasyonu olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı mikroorganizmalar deniz süngerleriyle simbiyotik ilişkide bulunurlar. Bu bilgi doğrultusunda araştırmacılar süngerlerden izole ettikleri 109 izolatta PCR yoluyla NRPS gen kümesinin A domainini taramışlardır. İzolatların 15'inde NRPS geni tespit edilmiş olup, tespit edilen NRPS geninin korunmuş A domaini aminoasit sekansı analizinde; 11'nin, daha önce rapor edilmiş olan dizimler ile %70'in altında benzerlik gösterdiğini ve bu sebepten bu genlerin yeni olabileceğini belirtmişlerdir (Zhang ve ark. 2009).

Tropikal bitkilerden izole edilen 213 aktinomiset türünde kimyasal tarama yoluyla bu organizmaların sentezlediği doğal ürünler tespit edilmeye çalışılmıştır. Kültür ortamında doğal ürün tespit edilemeyen 29 türde PCR yöntemi ile PKS-I, PKS-II ve NRPS, genleri

2. KAYNAK ÖZETLERİ

taranmıştır. Yapılan taramalar sonucunda %66'sında PKS-I, %79'unda PKS-II ve tümünde NRPS amplifikasyonu gözlemlenmiştir (Janso ve ark. 2010).

Gontang ve arkadaşları (2010) deniz suyundan izole ettikleri 60 aktinomiset izolatının doğal ürün biyosentez genlerinin A ve KS domainlerini PCR yoluyla taramışlardır. Bu tarama sonucunda izolatların 26'sında KS domaini ve 38'inde A domain amplifiye edilmiştir. KS ampikonları ile kurulan kütüphanelerden rastgele seçilen klonların DNA dizi analizlerinin BLAST analizi sonucunda toplamda 90 KS domaini tespit edilmiş olup, bunlardan 14'ünün ise aminoasit sekansının, DNA dizilimi bilinen KS domainleri ile %85'in üstünde homoloji gösterdiği belirlenmiştir.

Araştırmacılar *Streptomyces sioyaensis* Lv81 türünde NRPS gen kümesi A domaini amplifikasyonunu ve klonlamasını gerçekleştirmişlerdir. Dizi analizi sonucunda 9 farklı A domaini tespit ettiklerini belirtmişlerdir (Myronovskyy ve ark. 2010).

Streptomyces pyridomyceticus NRRL B-2517 izolatının genomundan elde edilen kosmid kütüphanelerin taranması sonucunda antibakteriyel etkiye sahip *pyridomycin* biyosentetik gen kümesi tanımlanıp karakterize etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda gen kümesinin 42,5 kb büyüklüğünde olduğu 26 ORF bölgesine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Tingting Huang ve ark. 2011).

Bir toprak izolatu olan *Streptomyces viridochromogenes*'ten antibakteriyel etkiye sahip *laspartomycin*'in biyosentezinden sorumlu gen kümesi ortaya çıkarılmıştır. 11 amino asitlik siklik lipopeptidin sentezinden sorumlu gen kümesinin 60 kb büyüklüğünde ve 21 ORF bölgesi içerdiği tespit edilmiştir (Yang Wang ve ark. 2011).

Deniz süngerinden izole edilen 46 izolatın PKS genleri PCR ile taranmıştır. Bunun sonucunda izolatların %70'inde PKS-I ve %85'inde PKS-II geni tespit edilmiştir. Bu izolatlardan 36'sı biyolojik aktivite testleri için seçildikten sonra %88'inin en az bir test organizmasına karşı inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Xin ve ark. 2011).

Streptomyces sp. SCSIO1666 izolatının genomunda, potent RNA Polimeraz inhibitörü olan *tirandamycinin* varlığı tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda bu

antibiyotiğin sentezinden sorumlu gen kümesinin üç PKS ve bir NRPS'den oluştuğu saptanmıştır (Mo ve ark. 2011).

Farklı bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından izole edilen *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Promicromonaspora* ve *Rhodococcus* cinslerine ait 60 endofitik türün genomunda NRPS, PKS-I ve PKS-II genleri taranmıştır. Yapılan taramalar sonucunda izolatların %53'ünde PKS-I, %82'sinde PKS-II ve %53'ünde NRPS genlerinin varlığı tespit edilmiştir (Zhao ve ark. 2011).

Bahamalar bölgesinde 30-50 m arasında değişkenlik gösteren mağara sediment örneklerinden aktinomiset izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda populasyon üyelerinin büyük çoğunluğunun *Streptomyces* cinsine dahil olduğu rapor edilmiştir. Sonrasında ise izolatların NRPS ve PKS genleri farklı primer çiftleri ile amlifiye edilmiştir. Amplikonların BLAST analizleri sonucunda bu genlerin NCBI'nin veritabanında bilinen NRPS ve PKS genleri ile %93- 99 arasında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Aktinomiset grubuna dahil olmayan izolatlarda ise benzerlik oranının % 45-73 arasında değiştiği bildirilmiştir. Mağara izolatlarının bu genlerinin biyoinformatik analizlerinde %54 oranında β -lactam, %59 ile *cyclohexandepsipeptide*, %69 ile siderefor ve %86 ile angucycline antibiyotiklerle homoloji tespit edilmiştir (Hodges ve ark. 2012).

Antibiyotik araştırmalarında yeni glikopeptitlerin keşfi diğer doğal ürünler ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Yapılan hesaplamalar sonucunda yeni glikopeptit keşfi oranının yaklaşık olarak $1/10^7$ olduğu düşünülmektedir. Yeni glikopeptit antibiyotik araştırmalarının yapıldığı 1000 aktinomisetten sadece 38 tanesinin *vancomycin* dirençli olduğu ve bu dirençli izolatların genomlarının PCR temelli taranması sonucunda yeni glikopeptit antibiyotik olan *pekistomycin* gen kümesi tespit edilmiştir (Thaker ve ark. 2013).

Florida bölgesinde deniz suyundan izole edilen 44 bakterinin PKS ve NRPS genleri PCR'a dayalı strateji ile taranmıştır. Yapılan taramalar sonucunda izolatların %20,5'inde PKS-I, %65,9'unda PKS-II ve %36,4' ünde ise NRPS genlerine rastlanmıştır. Ayrıca yapılan taramalar sonucunda tiyazol peptit yapısında yeni *kocurin* bileşiği tanımlanmıştır (Palomo ve ark. 2013).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kızıldenizde süngerle simbiyotik ilişki içinde bulunan aktinomiset izolatlarının NRPS ve PKS genlerinin PCR'a dayalı yöntem ile tarandığı bir çalışmada, 25 izolatın 19'unda NRPS, 12'sinde PKS-I ve 8'inde PKS-II genleri tespit edilmiştir (Abdelmohsen ve ark. 2014).

Streptomyces, *Saccharomonospora*, *Micromonospora*, *Kocuria* ve *Nocardiopsis* cinslerine dahil 613 deniz aktinomisetinin genomunda spesifik primerler ile NRPS ve PKS genleri taranmıştır. Bunun sonucunda yapılan taramalar sonucunda izolatlarının %28'nin 3'ten fazla doğal ürün biyosentez genine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm izolatlar içinde 154'nün biyolojik aktivitesinin olduğu ve bunlardan birinin diketopiperazine yapısındaki yeni *iso naseazine B* metabolitini sentezlediği tespit edilmiştir (Xiong ve ark. 2015).

Bitki kök bölgesinden izole edilen 341 aktinomisetin biyolojik aktivite testleri yapılmıştır. Bunun sonucunda izolatların % 54'nün bir veya daha fazla test organizmasının büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Biyolojik olarak aktif izolatların genomunda ise dejenere primerler yardımıyla NRPS ve PKS doğal ürün biyosentez gen kümeleri PCR ile taranmıştır. Bunun sonucunda ise izolatların %4,69'unda PKS-I, %15,25 'inde PKS-II ve % 13,48'inde ise NRPS geni tanımlanmıştır (Adegboye ve ark. 2015).

Çin denizinde 50-100 m derinliklerinden izole edilen aktinomiset grubuna dahil 5 farklı cinsten 613 izolatının doğal ürün sentezleyebilme potansiyellerinin araştırıldığı çalışmada, tüm izolatların 154'ünün en az bir antibiyotik dirençli bakteriye karşı inhibisyon etkisine neden olduğu bildirilmiştir. Güçlü inhibisyon etkisine sahip 45 izolatında genomunda halogenaz, PKS, NRPS, 3-hidroksil 3-metilglutaril koenzim A redüktaz genleri spesifik primelerin kullanılmasıyla PCR ile taranmıştır. Bunun sonucunda tüm izolatların %29'nun en az bir doğal ürün sentez gen kümesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca 23 izolatın isoprenoid, 25 izolatın PKS, 16 izolatın NRPS ve 15 izolatın halogenaz genlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Xiong ve ark. 2015).

Deniz ekosistemlerinde yaşamaya adapte olmuş *Salinispora* cinsine dahil mikroorganizmalar yeni doğal ürün keşfi araştırmalarında son zamanlarda üzerinde yoğunca çalışılan en önemli biyolojik kaynaklardan biridir. Bu cinse dahil *S. arenicola* ile

yapılan bir çalışma sonucunda elde edilen bisiklik poliketid *saliniketal A ve B*'nin kanser gelişiminde rol oynayan ornitin dekarboksilazı inhibe ettiği ve IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 1.95 ±0.37 ve 7.83 ±1.2 µg/ml olduğu görülmüştür (Williams ve ark. 2007).

Bilinen 150.000 doğal ürünün %0,1'den daha azının nitril grubuna sahip olduğu bilinmektedir. *Cyanosporaside*'ler de nitril grubu içeren önemli doğal ürün sınıflarından biridir. Klor ve heksoz foksiyonel grubuna sahip olan bu doğal ürünlerin *S. pacifica* CNS-143 tarafından üretildiği tespit edilmiştir (Lane ve ark. 2013).

Son yıllarda mikrobiyal kaynaklı özellikle de deniz aktinobakterilerinden, kimyasal yapısı farklı ve geniş spektrumlu biyolojik aktiviteye sahip birçok yeni doğal ürün keşfedilmiştir. *Anthracyclin, urdamycinone, merochlorins A-D, napyradiomycin* gibi yeni antimikrobiyal etkili bileşikler deniz orjinli *Streptomyces* türlerinden izole edilmiştir. Bu bileşiklerin, *Bacillus anthracis*, MRSA, *Plasmodium palcifarum* K1 strain, *M. tuberculosis*, *vancomycin* dirençli *Enterococcus faecium* (VREF) gibi patojen mikroorganizmalara karşı oldukça güçlü antibakteriyel ve antiparazitik etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Kaysser ve ark. 2012, Jang ve ark. 2013, Supong ve ark. 2013, Cheng ve ark. 2013).

Kanser vakalarında kanserli hücrelere karşı daha etkili, toksisitesi daha az yeni antitümör ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan yeni kanser ilaçlarının keşfi için denizler önemli ekosistemlerdir. Çeşitli insan kanseri hücrelerinin büyümesini oldukça güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilen *feigrisolides, dinactin, chlorizidine A, marmycins A ve B*, çeşitli angucycline antibiyotik ve terpenoid dihidrokinon bileşiklerinin, deniz aktinomisetlerinden *Salinispora* ve *Streptomyces* cinslerinin üyeleri tarafından sentezlendiği tespit edilmiştir (Sobolevskaya ve ark. 2004, Mercado ve ark. 2005, Martin ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2012, Mico ve ark. 2013).

Genom analizleri doğal ürün araştırmalarında çok önemli bir yere sahiptir. Son zamanlarda; farklı stratejilerle aktinomiset genomlarında yapılan taramalar yeni birçok biyoaktif doğal ürünün varlığını ortaya koymuştur. Bu stratejiyi esas alan bir dizi çalışma sonucunda; *coelichelin, methylenomycin furan, saframycin, salinosporamide K* gibi farklı biyolojik etkiye sahip birçok doğal ürün tespit edilmiştir. Ayrıca genomizotopik ve heterolog gen ekspresyonu yöntemlerinin kullanılmasıyla iki farklı kriptik gen kümesinden

2. KAYNAK ÖZETLERİ

sentezlenen *orfamide* ve *germicidin* bileşikleri keşfedilmiştir (Song ve ark. 2006, Shen ve ark. 2006, Gross ve ark. 2007, Challis 2008).

Sorangium cellulosum'un genomunda mevcut NRPS-PKS gen kümelerinin çeşitli biyoinformatik programlarda incelendiği bir çalışmada 'antiSMASH' programı 5 PKS, 2 NRPS, 4 PKS-NRPS, 'NapDOS' programı 50 KS domaini, 30 C domaini, 'NP. searcher' programı ile ise 2 PKS, 1 NRPS ve 2 NRPS-PKS gen kümesi tahmini yapmaktadır. Daha sonrasında yapılan klonlama çalışmaları sonucunda ise mikroorganizmanın 3 PKS, 2 NRPS ve 4 PKS-NRPS gen kümesine sahip olduğu görülmüştür (Boddy 2014).

Araştırmacılar tarafından Filipinler de topraktan izole edilen *Streptomyces* sp. PCS3-D2' in genom projesi sonucunda 7,4 mbç'lik bir genoma sahip olduğu tespit edilmiştir. İzolatın pütatif doğal ürün gen kümelerinin belirlenmesinde 'antiSMASH' programının kullanılmasıyla PKS, NRPS, siderefor, lantibiyotik ve terpen gibi 29 farklı biyosentez yolağı ile ilişkili genlere sahip olduğu bildirilmiştir (Custodio ve ark. 2014).

Farklı mikroorganizmalara ait, toplamda 79 farklı NRPS ve PKS gen kümesine ait DNA diziliminin 'NP.searcher' biyoinformatik programında analiz edilmesi sonucunda yaklaşık olarak PKS'lerin %60' ı NRPS'leri ise %80 başarılı şekilde tahmin edilebildiği görülmüştür (Li ve ark. 2009)

'antiSMASH' programında incelenen 484 gen kümesi DNA dizimlerinin analiz edilmesi sonucunda 473' in (%97,7) doğru şekilde, 468'nin (%96,7) ise birebir doğrulukta tahmin edildiği rapor edilmiştir. Özellikle NRPS, PKS ve hibrid gen kümelerinin (NRPS/PKS) tahmin oranının %100'e yakın olduğu bildirilmiştir (Medema ve ark. 2011).

Salinispora cinsinin üyeleri türe özgü metabolit sentezi yapmaktadır. Örneğin şuan antitümör ajan olarak faz II aşamasında bulunan *salinosporamide A* 'nın sadece *S. tropica* türü tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Farklı *Salinispora* genomlarının 'NapDOS' analizleri sonucunda %89–94 oranında *salinosporamide A* sentezi ile ilişkili 2 farklı KS domaini *S. pacifica* CNT-133 genomunda tespit edilmiştir. Bu veri hem *S. pacifica*

türlerinde *salinosporamide A* biyosentezinin olması hem de olası yeni bir *salinosporamide* türünün keşfi açısından oldukça önemlidir (Ziemert ve ark. 2012).

NRPS ve PKS gen kümelerinin bakteri, arke ve ökaryotlardaki dağılımının incelendiği çalışmada biyoinformatik analizler sonucunda bu 3 alemde toplam 3,339 NRPS-PKS yolağının bulunduğu tespit edilmiştir. %89,1 lik oran ile bakteriler, %1,6 ile ökaryotlar ve son olarak % 0,1 ile arkelerin bu yolaqlara sahip olduğu rapor edilmiştir (Wang Hao 2014).

Genom dizilimi bilinen ve farklı jeografik orjinli (Fiji, Hawaii, Guam, Bahama) 75 *Salinisipora* izolatının ‘NapDOS’ analizleri sonucunda toplamda 2,079 KS, 1,693 C domaini tespit edilmiştir. Bu domainlerin 75’inin yağ asidi biyosentezi, 80’inin ise N-asetiltransferaz olarak yanlış eşleşme olduğu rapor edilmiştir. Geriye kalan 1,924 (%92,5) domainin de sekonder metabolizma ilişkili KS ve C domain olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *S. pacifica* türünün biyosentez yolak çeşitliliğinin *S. tropica* ve *S. arenicola*’ ya göre daha fazla olduğu ‘NapDOS’ analizleriyle ortaya konmuştur. Tüm izolatlara ait 124 farklı yolağın PKS çeşitliliği incelendiğinde *salinosporamide*, *salinilactam*, *cyclomarin*, *cyanosporasides*, *sporolides*, *arenimycin*, *rifamycin*, *lymphostin*, *lomaiviticin*, *enterocin* ve *arenicolide* dışındakilerin ürünlerinin bilinmediği görülmüştür (Ziemert ve ark. 2014).

Yeni doğal ürün tarama araştırmalarında kullanılan yeni yöntemlerden biri MS orjinli glikogenomiktir. Deniz aktinomisetleri *Streptomyces* sp. SPB74 ve *S. arenicola* CNB-527 genomlarında glikolize doğal ürün biyosentez gen kümeleri ve bu gen kümelerine dahil spesifik şeker biyosentez genleri glikogenomik yöntemle taranmıştır.Yapılan taramalar sonucunda *Streptomyces* sp. SPB74 in antitümör etkili *cinerubin B*, diğer izolatın ise yeni bir antibiyotik olan *arenimycin B*’yi sentezledikleri tespit edilmiştir (Kersten ve ark. 2013).

Peptid yapısındaki doğal ürünler biyolojik aktivitelerinden ötürü önemli ilaç öncüsü bileşiklerdir. Peptidogenomik peptid yapısındaki lantibiyotik ve NRP keşfi için kullanılan yeni yöntemlerden biridir. Farklı *Streptomyces* izolatlarının organik ekstraktlarının MALDI-TOF MS analizleriyle spesifik kütle fragmentasyon değerleri doğrultusunda peptidlerin yapısındaki olası amino asitler tespit edilmiştir. Daha sonra ilgili amino asit

2. KAYNAK ÖZETLERİ

sekans verisi mikroorganizmaların genomlarında ‘antiSMASH’ ve ‘NP.searcher’ biyoinformatik programlar ile taranmıştır. Bu yöntem ile genom dizilimi bilinen 7 *Streptomyces* izolatından 9 yeni lantibiyotik, *S. hygroscopicus* ATCC 53653’den ise *stendomycin* gen kümesi rapor edilmiştir (Kersten ve ark. 2011).

Genom dizilimi bilinen *daptomycin* üreticisi *S. roseoporus* ile yapılan çalışmada, katı kültürde *S. aureus*, *S. epidermis* patojenlerinin inhibisyon zon bölgesinde, *daptomycin* ile ilişkisi olmayan bir dizi 863, 877, 891 iyonları MALDI TOF analizleri tespit edilmiştir. İlgili üç sinyalin peptid fragmentasyonu sonucuna göre glisin ve alanin aminoasitlerinin inhibisyona neden olan bileşiğin yapısında olduğu ortaya konulmuştur. ‘NP. Searcher’ ve ‘NRPS predictor2’ programları ile yapılan genom taramaları sonucunda *arylomycin A2* peptidinin gen kümesine ulaşılmıştır (Liu ve ark. 2011).

Genom dizilimi bilinen *Myxococcus xanthus* DK1622’nin LC/MS verilerinin biyoinformatik analizler ile değerlendirilmesi sonucunda myxoprincomide metabolitin keşfi gerçekleştirilmiştir (Cortina ve ark. 2012).

MS’de farklı iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi doğal ürün araştırmalarında uygulanan yöntemlere yeni bir boyut kazandırmıştır. Nano spray desorption electrospray ionization (NanoDESI) bu iyonizasyon tekniklerinden biridir. Bu yöntemle direk olarak *B. subtilis* 3610 katı kültüründeki kolonilerin örnek alınarak NanoDESI’de MS/MS analizleri incelenmiştir. Bu verilerin network analizleri sonucunda *surfactin*, *plipastatin*, *subtilosin* metabolitlerinin 60 saat süresince zaman bağlı olarak konsantrasyonları tespit edilmiştir. Sonuç olarak 3 siklik peptidin konsantrasyonun arttığı, ayrıca *surfactin*’in ilk 6, *plipastatin*’in 12, *subtilosin* ise 24 saatlik zaman dilimlerinde sentezlenmeye başladığı görülmüştür. Buna ek olarak glikopeptid *sublancin*’nin ise 24-36 saatlik zaman periyodunda üretildiği ortaya konulmuştur. *B. subtilis* PY79 NRPS ve PKS yolları fonsiyonel olmayan *B. subtilis* 3610 mutanı olup, *S. coelicolor* A3 ile mikrobiyal etkileşimleri aynı petri kabında incelenmiştir. Bu etkileşime bağlı mikroorganizmaların üretmiş oldukları sekonder metabolizma kökenli metabolitler tespit edilmeye çalışılmıştır. MS analizleri sonucunda *S. coelicolor* A3’ün *B. subtilis* PY79 etkileşimine bağlı olarak *prodiginine*, *CDA*, *actinorhodin*, *coelichelin*, benzer durumda *B. subtilis* PY79’un ise

kannibalistik faktörlerden SKF (sporulation killing factor) ve SDF (sporulation delay factor) sentezlediği tespit edilmiştir. Son olarak peptidogenomik yaklaşımla *Pseudomonas* sp. SH-C52’da yeni bir peptid *thanamycin* keşfedilmiştir (Watrous ve ark. 2012).

Birbirinden farklı filogenetik kökenli patojen, saprofit ve fotosentetik 40 mikroorganizmanın kültür ortamının, görüntülü MALDI TOF MS ile analizi sonucunda mikrobiyal orjinli ortalama 11,3 iyon tespit edilmiştir. Ayrıca her bir aktinomiset tarafından salgılanan ortalama 7,5 metabolitin 1,5’nin mikroorganizmaların biribiri ile etkileşiminde rol oynayan koloni ilişkili metabolitler olduğu görülmüştür. Kütle/yük (m/z) oranı incelenen 15 *Streptomyces* izolatından 11’nin m/z değeri 1800’nin üzerinde çok sayıda sinyal tespit edilmiştir. Bu sinyal aralığının post translasyonel ribozomal peptidlerle ilişkili olduğu görülmüştür. Örneğin, bunlardan birinin *S. coelicolor* A3’te hava miseli ve sporolasyon oluşumunda etkisi olduğu bilinen tyoeter lantibiyotik SapB (2027 [M+H]) olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak *Staphylococcus aureus* ve *Beauveria bassiana* patojenlerinden *beauvericin* (807 [M+Na]), *bassianalide* (932 [M+Na]) ve δ -toksin (3005 [M+H]) metabolitleri tespit edilmiştir (Gonzalez ve ark. 2012).

S. tropica CNB-440 organik ekstraktının biyolojik aktivitesinin test edildiği çalışmada, araştırmacılar ekstraktın DNA bağlanma affinitesinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun üzerine bu etkiye neden olan metabolitin tespit edilmesi için yapılan biyoinformatik temelli genom taramaları sonucunda izolatın glikolize PKS-II gen kümesine sahip olduğu görülmüştür. Bileşiğin izolasyon ve yapı aydınlatma çalışmaları sonucunda *lomaiviticin* olduğu rapor edilmiştir (Kersten ve ark. 2013).

Firmicutes, actinobacteria, proteobacteria, cyanobacteria gibi farklı filogenetik gruplara dahil, deniz ve karasal mikroorganizma ekstraktlarının GNPS moleküler network analizleri sonucunda 58 adet bilinen ve bunların farklı kimyasal modifikasyonu olan yeni metabolitler keşfedilmiştir. *Carmabin A*, *tumonoic acid I*, *barbamide*, *carmaphycin B* ile birlikte 2 yeni *carmaphycin* analogu siyanobakteri network analizinde belirlenmiştir. Ayrıca *Lyngbya* sp. ve *Schizothrix* sp. ekstraktlarından elde edilen *tumonoic acid I* kümesinde 5 *tumonoic acid* analogunun varlığı bildirilmiştir. Fenazin, kinon, lipopeptid vb farklı doğal ürün sınıflarına dahil metabolitler ise bakteriyel network analizleriyle tespit

2. KAYNAK ÖZETLERİ

edilmiştir. Poliketid sınıfının yeni antibiyotik üyesi *abyssomicin*'in B, C, D, H ve L analoglarının *Verrucosipora* sp. MS100128'de, *OH-fenazin*, *N-metil fenazin*, *metoksifenazin*, *pyocyanin* bileşiklerinin ise *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretildiği network analizleri sonucunda belirlenmiştir (Yang ve ark. 2013).

MS ve genomik orjinli verinin yeni doğal ürünlerin keşfi için analiz edildiği biyoinformatik programların sayısı son bir kaç yıl içinde artış göstermektedir. Bu amaçla geliştirilen 'NRPquest' mikroorganizmaların genom dizilimi ve organik ekstraktlarından elde edilen MS/MS network verisinin birlikte analiz edilmesiyle siklik peptidlerin hızlı bir şekilde tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Tüm genom dizilimi bilinen *S. roseosporous* ve *B. subtilis*'in 'NRPquest' analizleri sonucunda *daptomycin*, *arylomycin*, *plipastin*, *surfactin* gibi siklik peptidleri tespit edilmiştir (Mohimani ve ark. 2014)

Peptidogenomik yaklaşımla *S. roseoporus* ekstraktlarının GNPS analizleri sonucunda siklik bir peptid olan *stenothricin* gen kümesi karakterize edilmiştir (Liu ve ark. 2014).

Süngerler ile simbiyotik etkileşimde bulunan *Vibrio harveyi* bakterisi ekstraktlarının GNPS analizlerinin yapıldığı çalışmada araştırmacılar oldukça ilginç sonuçlara ulaşmıştır. *Vibrio harveyi*' den elde edilen ekstraktlarda daha önce süngerler tarafından sentezlendiği bilinen ve antiinflamator etkiye sahip *spogosine* nükleositlerinin *deoksispongosine*, *8-okso-2'-deoksiguanosine*, *metoksi adenine* gibi yeni türevleri GNPS analizleriyle tespit edilmiştir (Bertin ve ark. 2015).

Salinispora türleri doğal ürün araştırmalarında kullanılan model deniz aktinomisetlerindedir. Bu sebepten ötürü 35 farklı *Salinispora* izolatu ekstraktlarında GNPS dereplikasyon analizleriyle *rifamycin*, *cyclomarin*, *staurosporine*, *saliniketal*, *cyanosporaside* ve *desferrioxamine* gibi metabolitler tespit edilmiştir. Ayrıca GNPS verilerinin biyoinformatik analizleri ile karşılaştırılması sonucunda molekül ağırlığı 1185,44 olan peptid yapıdaki *retimycin A* metabolitinin biyosentez gen kümesine ulaşılmıştır (Duncan ve ark. 2015).

Hastalıkların tedavisinde, doğal ürün keşfinin yanı sıra yeni hücresele ilaç hedeflerinin keşfi ve moleküler düzeyde hedef ligand etkileşimlerinin belirlenmesi de oldukça önemlidir. Özellikle dirençli mikroorganizma gelişimini inhibe etmek için yeni ilaç hedeflerine gereksinim duyulmaktadır. MRSA dirençliliğinde rol oynayan karetenoid yapısındaki *staphyloxanthin* bileşiğinin sentezindeki dehidrosqualen sentaz (CrtM) enzimi, *M. tuberculosis*'te biotin sentezinden sorumlu amino transferaz ve son olarak *E. coli* O157' de açilhidrazin bağlanma protein son dönemde tespit edilen yeni ilaç hedefleridir (Park ve ark. 2015).

Araştırmacılarca 18 fosfonoasetoamid bileşik türevinin CrtM inhibisyonu etkilerinin incelendiği çalışmada, 4-6 nolu *diphenyl ether phosphoacetamide* yapısındaki bileşiklerin 30-70 nM Ki değerleriyle potent enzim inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 5 nolu türevin 8 nM IC₅₀ potent etkisiyle CrtM inhibisyonuna sebep olarak *staphyloxanthin* sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir. Yapılan yapı aktivite çalışmaları sonucunda (Structure Activity Relationship-SAR) CH₂ grubunun kısılması ve difenil eter grubunun bifenil olarak değiştirilmesiyle aktivite azalma görülmüştür. Ayrıca fosfat grubunun sülfat veya karboksilik asit gruplarıyla ile değiştirilmesi sonucunda enzim inhibisyonunda önceki modifikasyonlarda olduğu gibi azalma rapor edilmiştir. Bununda enzimin aktif merkezindeki Arg⁴⁵, Gln¹⁶⁵ ve Asn¹⁶⁸ amino asitler ile ligand arasındaki hidrojen bağı etkileşiminin azalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. (Song ve ark. 2009).

Lapaquistat ve *squalestatin* squalene sentaz inhibisyonuna sebep olan bilinen kolesterol düşürücü ajanlardır. Her iki metabolitin farklı türevlerinin CrtM inhibisyon etkisi bilgisayar hesaplamalı kimya yöntemi moleküler docking analizi ile araştırılmıştır. Bunun sonucunda His¹⁸, Arg⁴⁵, Asp⁴⁸, Asp⁵², Tyr¹²⁹, Gln¹⁶⁵, Asn¹⁶⁸ ve Asp¹⁷² amino asitlerinin inhibitör etkisine sahip ligantlar ile hidrojen bağı açısından önemli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tüm ligantların docking sonuçlarının 215-150 kcal/mol arasında değiştiği rapor edilmiştir (Sharma ve ark. 2010).

2012 yılında yapılan bir çalışmada 5 farklı *tetrangomycin* türevi doğal ürünün *staphyloxanthin* biyosentez inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda en iyi

2. KAYNAK ÖZETLERİ

etkinin 6-4,4 IC₅₀ (µg/ml) değerleriyle sırasıyla *6-deoksi-8-O-metilrabelomycin* ve *tetrangomycin* ile elde edildiği ettiği gözlenmiştir (Sakai ve ark. 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Biyolojik Materyal

3.1.1.1. *Streptomyces* İzolatları

Ayaş-Beypazarı (Ankara) civarında *Aethionema dumanii*, *Salvia aytachii* ve *Achillea ketenoglui* endemik bitkilerinin, kök çevresi topraklarından izole edilen ve moleküler teşhisleri yapılmış olan 65 karasal aktinomiset izolat kullanıldı (Çizelge 3.1.) (Yılmaz ve ark. 2008).

Çizelge 3.1. Karasal *Streptomyces* izolatları ve genbankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) erişim numaraları

İzolat	Genbankası No	İzolat	Genbankası No
<i>S. sp.</i> AA50	EF491614.1	<i>S. sp.</i> AR17	EF491604.1
<i>S. sp.</i> AA53	EF491616.1	<i>S. sp.</i> AR24	EF491605.1
<i>S. sp.</i> AA58	EF491617.1	<i>S. sp.</i> AS25	EF491606.1
<i>S. sp.</i> AA59	EF491618.1	<i>S. sp.</i> AS28	Henüz sunulmadı
<i>S. sp.</i> AAH61	EF491619.1	<i>S. sp.</i> AS29	EF491607.1
<i>S. sp.</i> AAH63	EF491620.1	<i>S. sp.</i> AS31	EF491608.1
<i>S. sp.</i> AAH66	EF491621.1	<i>S. sp.</i> AS34	EF491609.1
<i>S. sp.</i> AAH67	EF491622.1	<i>S. sp.</i> AS36	Henüz sunulmadı
<i>S. sp.</i> AAH68	EF491623.1	<i>S. sp.</i> AS37	EF491610.1
<i>S. sp.</i> AR2	EF491601.1	<i>S. sp.</i> AS40	EF491611.1
<i>S. sp.</i> AR3	EF491602.1	<i>S. sp.</i> AS41	EF491612.1
<i>S. sp.</i> AR4	Henüz sunulmadı	<i>S. sp.</i> ASH47	EF491615.1
<i>S. sp.</i> AR6	Henüz sunulmadı	<i>S. sp.</i> BA1	EF494202.1
<i>S. sp.</i> AR9	Henüz sunulmadı	<i>S. sp.</i> BA2	EF494203.1
<i>S. sp.</i> AR12	EF491603.1	<i>S. sp.</i> BA3	EF494204.1

3. MATERYAL VE METOT

Çizelge 3.1. Karasal *Streptomyces* izolatları ve genbankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) erişim numaraları (devamı)

<u>İzolat</u>	<u>Genbankası No</u>	<u>İzolat</u>	<u>Genbankası No</u>
S. sp.BA5	EF494205.1	S. sp.CA12	Henüz sunulmadı
S. sp.BA11	EF494206.1	S. sp.CA13	EF494220.1
S. sp.BA12	Henüz sunulmadı	S. sp.CA14	EF494221.1
S. sp.BA14	Henüz sunulmadı	S. sp.CA16	EF494222.1
S. sp.BAH20	EF494208.1	S. sp.CA17	EF494223.1
S. sp.BAH26	EF494209.1	S. sp.CA18	EF494224.1
S. sp.BAH28	EF494210.1	S. sp.CA19	EF494225.1
S. sp.BAH46	Henüz sunulmadı	S. sp.CA21	EF494226.1
S. sp.BR57	EF494217.1	S. sp.CA24	EF494227.1
S. sp.BS29	Henüz sunulmadı	S. sp.CA28	EF494228.1
S. sp.BS32	Henüz sunulmadı	S. sp.CAH29	EF494229.1
S. sp.BS33	EF494211.1	S. sp.CAH33	EF494230.1
S. sp.BS39	EF494212.1	S. sp.CS38	EF494232.1
S. sp.BS40	EF494213.1	S. sp.CS41	EF494233.1
S. sp.BS44	EF494214.1	S. sp.CS42	Henüz sunulmadı
S. sp.BSH50	EF494216.1	S. sp.CS43	EF494234.1
S. sp.CA3	EF494218.1	S. sp.CS44	EF494235.1
S. sp.CA11	EF494219.1		

3.1.1.2. *Salinispora* İzolatları

Çizelge 3.2’de görüldüğü üzere farklı tropik ve subtropik okyanus sediment örneklerinden (10-1000 m) izole edilen ve genom dizilimleri bilinen otuz adet deniz aktinomiset izolatı genom tarama çalışmalarında kullanıldı (Jensen ve ark. 2005).

Çizelge 3.2. Farklı coğrafik bölgelerden izole edilen *Salinispora* izolatları

İzolat	Genom Erişim Numarası (www.img.jgi.doe.gov)	Genom Boyutu/bç	Lokasyon
<i>S. pacifica</i> CNS801	2561511036	4969155	Fiji
<i>S. pacifica</i> CNY703	2563366517	5393461	Madeira
<i>S. pacifica</i> CNS860	2518285563	5357469	Fiji
<i>S. pacifica</i> CNR909	2561511038	5455852	Palau
<i>S. pacifica</i> CNY666	2563366532	5726457	Madeira
<i>S. pacifica</i> CNY239	2524614561	5368602	Fiji
<i>S. pacifica</i> CNT796	2515154182	5073739	Hawaii
<i>S. pacifica</i> CNT603	2515154185	5395536	Fiji
<i>S. pacifica</i> CNT124	2517572159	5164130	Fiji
<i>S. pacifica</i> CNQ768	2517572155	5480836	Guam
<i>S. pacifica</i> CNT851	2517572162	5263032	Hawaii
<i>S. arenicola</i> CNR107	2519103194	5767406	Guam
<i>S. arenicola</i> CNY011	2517572153	5722126	Bahama
<i>S. arenicola</i> CNY230	2561511115	6066259	Fiji
<i>S. arenicola</i> CNR425	2528311033	5705881	Guam
<i>S. arenicola</i> CNY256	2518285559	5781119	Fiji
<i>S. arenicola</i> CNS820	2565956528	5606043	Fiji
<i>S. arenicola</i> CNS299	2524614529	5746562	Palu
<i>S. arenicola</i> CNT800	2515154088	5526283	Hawaii
<i>S. arenicola</i> CNS673	2519103185	5875699	Fiji
<i>S. arenicola</i> CNH877	2519103192	5795920	Bahama
<i>S. arenicola</i> CNH963	2524023246	5440051	Cortez Denizi
<i>S. pacifica</i> CNQ768	2517572155	5480836	Guam

3. MATERYAL VE METOT

Çizelge 3.2. Farklı coğrafik bölgelerden izole edilen *Salinispora* izolatları (devamı)

İzolat	Genom Erişim Numarası (www.img.jgi.doe.gov)	Genom Boyutu/bç	Lokasyon
<i>S. arenicola</i> CNY679	2561511113	5760922	Yucatan
<i>S. arenicola</i> CNS325	2571042009	5577349	Palau
<i>S. arenicola</i> CNT798	2515154186	5657349	Hawaii
<i>S. arenicola</i> CNH643	2561511037	5610201	Bahama
<i>S. arenicola</i> CNT850	2515154135	5621922	Hawaii
<i>S. arenicola</i> CNH962	2519103193	5434989	Cortez Denizi
<i>S. arenicola</i> CNT799	2526164509	5621489	Hawaii
<i>S. tropica</i> CNT250	2540341193	5170212	Bahama

3.1.1.3. Antimikrobiyal Aktivite Test Organizmaları

Disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinin araştırılmasında *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) test organizmaları kullanıldı. Ayrıca hastane izolatları MRS, *vancomycin* dirençli *Enterococcus* (VRE) ve *Candida albicans* patojenleri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi’den temin edildi.

Mikroorganizmaların antibiyotik dirençliliğini ortaya koymak için kullanılan antibiyotik diskleri *imipenem* (10 µg/disk), *ofloxacin* (5 µg/disk), *netilmicin* (30 µg/disk), *amoxicillin/clavulanic acid* (30 µg/disk) kullanıldı (Oxoid). Transformasyon çalışmalarında alıcı hücre olarak *E. coli* DH5α kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. Tris-HCl Sükroz EDTA (TSE)

Total hacim 50 ml olacak şekilde 100 mM Tris-HCl'den 12,5 ml, 100 mM EDTA'dan 12,5 ml ve 3 M sükrozdan 7,5 ml alınıp karıştırıldı ve final hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı (Merck).

3.1.2.2. Tris-baz Asetik Asit EDTA (TAE, 50x)

Final hacmi 1 L saf su içerisinde çözülmüş 242 g tris-baz ile yine saf su ile hazırlanmış 0,4 M EDTA pH 8'e ayarlanarak karıştırıldı. Oluşan karışıma 57,1 ml Asetik asit ilave edildi ve hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı (Merck).

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Tryptik Soya Besiyeri

30 g Triptik Soya Broth (TSB, Oxoid) tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanarak steril edildi.

Maya Özütü-Malt Özütü Besiyeri (YEME)

3 g maya özütü, 3 g malt özütü, 5 g pepton (Bacto, Oxoid), 10 g glukoz, 340 g sükroz (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Sterilizasyon sonrası 1 L YEME besiyerine filtre (Sartorius 0,2 µm) ile steril edilmiş 2,5 M MgCl₂ · 6 H₂O'dan 2 ml ve % 20'lik glisinden (Sigma) 25 ml eklendi.

M2 Agar

10 g malt özütü (Merck), 4 g maya özütü (Oxoid), 3 g glukoz (Merck), 15 g agar (Fluka) tartılarak çeşme suyu ile 1 L'ye tamamlanıp (pH 7,8) steril edildi.

Luria Broth (LB) Besiyeri

10 g tripton (Difco), 5 g maya özütü (Oxoid), 5 g NaCl (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi.

3. MATERYAL VE METOT

Bennett's Glukoz Besiyeri

1 g maya özütü (Oxoid), 1 g et özütü (Merck), 2 g kazeinin (Difco) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi.

Ayrı olarak steril edilen glukoz (Merck), final konsantrasyonu 10 g/L olacak şekilde besiyerine eklendi.

Nutrient Broth Agar (NA) Besiyeri

8 g nutrient broth (Merck), 15 g agar (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi.

Sabourand Dextrose Agar (SDA)

65 g Sabouraud %4 Dextrose Agar (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi.

Sabourand Dextrose Broth (SDB)

30 g Sabouraud %2 Dextrose Broth (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi.

Ampicillinli Luria Broth (LB) Besiyeri

10 g tripton (Difco), 5 g maya özütü (Oxoid), 5 g NaCl (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi. Sterilizasyon sonrasında besiyerine final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde stereril *ampicillin* eklendi.

AI Besiyeri

10 g nişasta (Affymetrix) 4 g maya özütü (Affymetrix), 2 g pepton (Fisher) ve 22 g okyanus tuz özütü (Fisher) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlandı (pH 6,5).

AI Katı Besiyeri

10 g nişasta (Affymetrix) 4 g maya özütü (Affymetrix) 2 g pepton (Fisher), 22 g okyanus tuz özütü (Fisher) ve 15 g/L agar (Affymetrix) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlandı (pH 6,5).

AIM1 Besiyeri

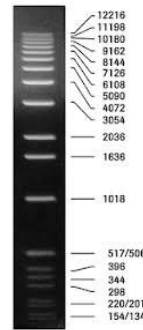
5 g nişasta (Affymetrix) 2 g maya özütü (Affymetrix) 2 g pepton (Fisher) ve 22 g okyanus tuz özütü (Fisher) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlandı (pH 6,5).

3.1.4. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Maltoz (Sigma), sükröz (Merck), Tris-HCl (Merck), sodyum asetat (Merck), sodyum dodesil sülfat (SDS, Merck) ve EDTA (AppliChem) kimyasalları kullanıldı. Fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) Sigma-Aldrich'den, izoamilalkol, kloroform Sial'den, etil alkol Riedel de Haën'den temin edildi.

3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris-asetik asit-EDTA tamponu (stok, TAE 50X), Agaroz jel için agaroz AppliChem'den, etidyum bromür Sigma'dan, brom fenol blue (BFB) Fermentase'dan, moleküler ağırlık markörü Roche (DNA Molecular Weight Marker X 0,07-12,2 kbç)'dan temin edildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Çalışmalarda kullanılan DNA markörü.

3.1.6. Kullanılan Enzimler

Taq polimeraz (Fermentase ve Roche), RNaz (Fermentase) ve Lizozim (Fluka) enzimleri kullanıldı.

3.1.7. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Gerekli Kimyasallar

NRPS geninin A domaininin ve PKS-I geninin KS domaininin amplifikasyonu için İontek firmasından temin edilen, ileri A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') geri A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'); ileri K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'), geri M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3') primerler çiftleri kullanıldı (S=G/C, Y=C/T, V=G/A/C, B=G/T/C) (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2005).

Primerler dışında reaksiyon için gerekli olan Taq polimeraz, PCR tamponu deoksिनucleotittrifosfatlar, MgCl₂ ve GC tamponu içeren Fast Start Taq DNA polimeraz Kit (Roche) ve Fermentase PCR Kit kullanıldı.

3.1.8. Jelden DNA'nın Geri Kazanılması İçin Kullanılan Malzemeler

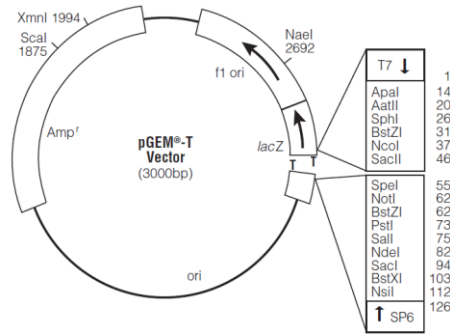
PCR ürünlerinin jelden geri kazanılması için ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kitleri kullanıldı (GeneMark ve Qiagen).

3.1.9. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması İçin Kullanılan Malzemeler

10 mM ile 75 mM'lık kalsiyum klorür çözeltileri ve %50'lik gliserol hazırlanıp +4°C'de saklandı.

3.1.10. Ligasyon İçin Kullanılan Malzemeler

Ligasyon için, içerisinde ligasyon tamponu, pGEM-T vektör, DNA ligaz bulunan pGEM-T klonlama kiti (Promega) kullanıldı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. pGEM-T vektör haritası

3.1.11. Transformasyon ve Rekombinant Seçimi İçin Kullanılan Kimyasallar

100 mg X-Gal (Roche) (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside*)/2 ml N-N-Dimetilformamid (Merck) olacak şekilde hazırlanıp -20°C’de saklandı.

Stok çözelti 100 mM olacak şekilde 23.83 mg IPTG (Roche) (*Isopropyl-B-D-thiogalactoside*) 1 ml suda çözülerek filtre (Sartorius 0.2 µm) yoluyla steril edilip -20°C’de saklandı.

Ampicillin (Roche); 100 mg/ml olacak şekilde saf suyla hazırlanıp filtre (Sartorius 0,2 µm) ile steril edildi.

3.1.12. Plazmid İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar

Ticari olarak temin edilen plazmid izolasyon kitleri kullanıldı (GeneMark, Invitrogen, Roche).

3.1.13. Restriksiyon enzimleri

EcoRI (10U/µl), PstI (10U/µl) ve MvaI (10U/µl) enzimleri Roche firmasından temin edildi.

3.1.14. Doğal Ürün Safılaştırmada Kullanılan Malzemeler

Metanol, diklorometan, etilasetat, kloroform, hekzan, etanol çözücüleri ve Na₂SO₄ Sigma Aldrich firmasından temin edildi. TLC deneylerinde 20x20 cm (Merck) tabakaları kullanıldı. Kolon dolgu maddesi olarak silika jel 60 (0,015-0,040 mm) (Merck) kullanıldı.

3.1.15. DPPH Radikali Söndürme Aktivitesinde Kullanılan Kimyasallar

1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) (Sigma), etanol (Sigma aldrich).

3.1.16. LC/MS Analizlerinde Kullanılan Kimyasallar

Metanol, asetonitril, su (Merck HPLC grade), etilasetat, asetik asit (Merck), 0,45 µm filtre (Sartorius), Na₂SO₄ (Merck).

3. MATERYAL VE METOT

Ayrıca tüm LC/MS analizlerinde Agilent Extend-C18 RP UPLC (2.1×100 mm, 1.8 µm) kinetik kolon kullanıldı.

3.1.17. Sitotoksisite Testinde Kullanılan Kimyasallar

WST-1 (4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzendisülfat (Sigma), dimetilsülfooksit (DMSO) (Merck), LNCaP and A549 tümörlü hücre kültürleri kullanıldı.

3.1.18. Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Hirayama), Jel Görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör), UV Lambası (Camag), Evaporatör (Heidolph), Liyolifizatör (Christ Alpha), PCR Cihazı (Ependorf), Elektroforez (Scie-Plas), Hassas Tartı (GEC Avery), pH Metre (Mettler MP220), Etüv (Heraeus), Sterilizatör (Heraeus), Derin Dondurucu (Ugur), HPTLC Cihazı (Camag Linomat, Camag Scanner III), Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad), Laminar Kabin (Telstar AV 100), Orbital Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B), Mini Santrifüj (E.S-6), Magnetik Karıştırıcı (Stuart), Spektrofotometre (Varian), Vorteks (VWR), Güç kaynağı (Bio-Rad), +4 °C mini buzdolabı (Sanyo), 28 °C etüv (Velp Scientifica FTC 90 I), Su banyosu (Grant LTD 66), Isıtıcı (Heidolph), pH Metre (Mettler MP220), Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS ve NMR 400 MHz ve 500 MHz (Bruker).

3.2. METOT

3.2.1. Organizmaların Üretilmesi

Daha önce grubumuz tarafından izolasyonları ve teşhisleri yapılmış olan karasal aktinomisetler gliserollü stoklarından alınarak M2 Agar'da 28°C'de 5 gün süreyle etüvde üretildi. Böylelikle taze kültürü hazırlanan bakteriler kromozomal DNA izolasyonları için TSB ve TSB-YEME sıvı besiyerlerinde üremeye bırakıldı.

Deniz aktinomisetleri de benzer şekilde gliserollü stoklarından alınarak A1 Agar'da 28°C'de 7-14 gün süreyle üremeye bırakıldı.

3.2.2. Kromozomal DNA İzolasyonu

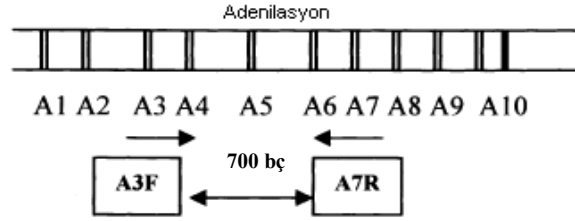
Streptomyces izolatları %0,5 maltoz eklenmiş TSB besiyerinde orbital çalkalamalı inkübatörde (230 rpm) 28 °C’de 48 saat üretildi. TSB’li besiyerinde üreyen kültürün 2 ml’si 2:3 oranında TSB-YEME içeren 50 ml sıvı besiyerine aktarılıp orbital çalkalamalı inkübatörde 28 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1,5 ml’lik ependorf tüplere kültür örneği alınıp, mikrofüjde 2 dakika maksimum rpm’de santrifüjlendi. Pelet kısmı izolasyon için kullanıldı. Pelet iki kez %10,3 sükröz çözeltisi ile yıkandıktan sonra 6 mg/ml lizozim ve 75 µg/ml RNaz içeren 500 µl TSE tamponunda çözüldü. 37 °C’de 45 dakika inkübasyondan sonra, 300 µl %2 SDS eklenerek 20 saniye vortekslendi. İlk olarak fenol:kloroform:izoamiloalkol (25:24:1) ve sonrasında da kloroform:izoamiloalkol (24:1) ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası 10 dakika maksimum rpm’de santrifüjleme ile supernatant kısmı alındı. Üst faz temizleninceye kadar ekstraksiyona devam edildi. Sonuç olarak temiz üst faz alınarak 3M sodyum asetat (pH 5,2), ve mutlak etanol eklenmesiyle DNA’nın çökmesi için -20 °C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda maksimum rpm’de 15 dk. santrifüjlendi. Süpernatant dikkatli bir şekilde alındıktan sonra peletin üzerine %70 etil alkol ilave edildi. Pelet çözüldükten sonra 10 dk. maksimum rpm’de santrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice döküldükten sonra pelet etüvde 37 °C’de kurutuldu. Kromozomal DNA’nın tamamen çözülmesi için pelete uygun miktarda saf su eklenerek 37 °C’de bir gece inkübe edildi.

Genomik DNA izolasyonu için aynı zamanda Roche’un genomik DNA izolasyon kiti kullanıldı.

3.2.3. *Streptomyces* İzolatlarının NRPS Geninin A Domainin Amplifikasyonu

A3F ve A7R primerleri yardımıyla NRPS genlerinin adenilasyon domaini çoğaltıldı. Primerlerin seçildiği bölgeye göre beklenen ampikonun uzunluğu yaklaşık 700 baz çifti (bç) uzunluğundadır (Şekil 3.3.). Standart PCR koşulları aşağıda sunulmuştur (Çizelge 3.2.). Ürün eldesi için yapılan optimizasyonlar sonuçlar bölümünde fotoğraflarla beraber verilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT



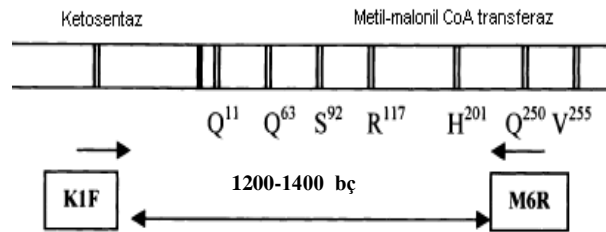
Şekil 3.3. NRPS genlerine ait A domaininde primerlerin lokalizasyonu (Ayuso-Sacido 2005)

Çizelge 3.3. Fast Start Taq DNA polimerase Kit (Roche) kullanılarak yapılan PCR reaksiyonun koşulları

<ul style="list-style-type: none">• Kromozomal DNA 100 ng• Her bir primer 0.4 µM• Nükleotid mix 0.2 µM• Taq polimeraz 1 U Taq• Tampon % 10• GC tamponu % 10• MgCl₂ (Gerekli olduğunda, stok 25 mM)• Final hacim 50 µL	<ul style="list-style-type: none">• 95°C 5 dk–Başlangıç denatürasyonu, 1 döngü.• 95°C 30 sn• 59°C 2 dk• 72°C 4 dk <p>35 döngü uygulandı.</p> <ul style="list-style-type: none">• 72°C 10 dk –Final polimerizasyon, 1 döngü.
---	--

3.2.4. *Streptomyces* İzolatlarının PKS-I Geninin KS Domainin Amplifikasyonu

K1F ve M6R primerlerinin yardımıyla PKS-I genlerinin ketosentaz domaini çoğaltıldı. Primerlerin seçildiği bölgeye göre beklenen ampikonun uzunluğu yaklaşık 1200-1400 bç uzunluğundadır (Şekil 3.4.). Standart PCR koşulları aşağıda sunulmuştur (Çizelge 3.3.). Ürün eldesi için yapılan optimizasyonlar sonuçlar bölümünde fotoğraflarla beraber verilmiştir.



Şekil 3.4. PKS-I genlerine ait KS domainlerde primerlerin lokalizasyonu (Ayuso-Sacido 2005).

Çizelge 3.4. Fast Start Taq DNA polymerase Kit (Roche) kullanılarak yapılan PCR reaksiyonun koşulları

<ul style="list-style-type: none"> • Kromozomal DNA 100 ng • Her bir primer 0.4 µM • Nükleotid mix 0.2 µM • Taq polimeraz 1 U Taq • Tampon %10 • GC tamponu %10 • MgCl₂ (Gerekli olduğunda, stok 25 mM) • Final hacim 50 µL 	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C 5 dk–Başlangıç denatürasyonu, 1 döngü. • 95°C 30 sn • 55°C 2 dk • 72°C 4 dk <p style="text-align: right;">} 35 döngü uygulandı.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 10 dk –Final polimerizasyon, 1 döngü.
--	--

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Kromozomal DNA tespiti için %0,8'lik, PCR ürünlerinin ve rekombinant plazmitlerin görüntülenmesi amacıyla ise %1'lik agaroz jel hazırlandı. 1X TAE tamponu içerisinde çözünen agaroz jele final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür çözeltisinden eklendi. DNA'lar fenol mavisi ile kuyucuklara yüklendi. Daha sonra güç kaynağından 90 voltluk akım verilerek 45 dk yürümeye bırakıldı.

3.2.6. Jelden PCR Ürünlerinin Geri Kazanılması

Yukarıda bahsedilen ampikon uzunlukları göz önünde bulundurularak, elde edilen pütatif PCR ürünleri jelden kesilerek ekstrakte edildi.

3.2.7. *E. coli* DH5-*a* Kompetent Hücrelerin Hazırlanışı

LB agar'dan alınan *E. coli* DH5-*a* hücrelerinin 10 ml LB içeren sıvı besiyerine ekimi yapıp orbital çalkalamalı inkübatörde bir gece 37 °C sıcaklıkta 250 rpm'de üretildi. LB besiyerinde üreyen kültürün 1 ml'si 50 ml'lik LB sıvı besiyerine aktarılıp optik dansite (OD) 0,45 oluncaya kadar orbital çalkalamalı inkübatörde 37 °C sıcaklıkta 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda sıvı kültür, 20 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 10 dakika buzda bekletildi. Bu süre sonunda 4 °C'de santrifüjde 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Pelete 5 ml 10 mM'lık CaCl₂ eklenerek homojen olacak şekilde çözünmesi sağlandı. Daha sonra 4°C sıcaklıktaki santrifüjde 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellete 2 ml 75 mM'lık CaCl₂ eklenerek homojen olacak şekilde çözünmesi sağlandı. Bu

işlem sonunda 192 µl çözünen bakteri örneği, 108 µl %50'lik gliserol ile karıştırılarak -20 °C'de saklandı. Bütün bu işlemler buzda gerçekleştirildi.

3.2.8. PCR Ürünlerinin Ligasyonu

Ligasyon için kullanılan pGEM-T klonlama kiti için üreticinin önerdiği standart koşullarda ligasyon yapıldı. Daha fazla ürün eldesi için ligasyon reaksiyonu 16°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.2.9. Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu ve Rekombinant Kolonilerin Seçimi

-20 °C'de tutulan kompetent hücreler buza alındı. 300 µl *E. coli* DH5-α kompetent hücrelerine 10 µl ligasyon ürünleri eklenerek yarım saat buz içerisinde bekletildi. Daha sonra 70 saniye 42 °C sıcaklıktaki su banyosunda bekletildi. Sonraki süreçte hücreler hızlı bir şekilde buza alınıp buzda 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda her bir tüpe 1 ml LB eklenip 37 °C sıcaklıkta 150 rpm'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. *Ampicillin* (100 µg/ml) içeren LB katı besiyerine 30 µl X-Gal, 100 µl IPTG eklenerek besiyerinin her tarafına homojen bir şekilde yayıldı. İnkübasyon süresi sonunda her besiyerine yaklaşık 300 µl gelecek şekilde hücrelerin yayılması sağlanarak etüvde 37 °C'de bir gece boyunca bekletildi.

3.2.10. Plazmid İzolasyonu

Ampisiline dirençli beyaz renkli pütatif rekombinant koloniler 100 µg/ml ampisilin içeren LB'ye aktararak orbital çalkalamalı inkübatörde 37°C 230 rpm'de bir gece boyunca üretildi. Hücre kültürü maksimum rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Plazmit izolasyon kitleri kullanılarak izolasyon yapıldı.

3.2.11. Plazmidlerin Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek DNA Dizi Analizi Öncesinde Gruplandırılması

PKS-I genlerine ait KS domainleri 1200 bp veya daha üzerinde olduğu için en az iki dizileme reaksiyonu ile tüm dizilim ortaya çıkarılabilmektedir. Dizileme maliyetini

düşürmek ve aynı klonların mükerrer sekanslarını önlemek amacıyla, mini kütüphanelerden seçilen klonlar restriksiyon enzimleri ile kesilerek gruplandırma yapıldı. Fragment profili aynı olan klonlardan temsili klonlar seçilerek DNA dizi analizi yaptırıldı. Kullanılan enzimlerin ve enzim kesim profillerinin, klonları sekansa tabi tutmadan gruplandırma yapmak için ayırt edici olduğu görüldü. Gruplandırmada MvaI, PstI ve EcoRI enzimleri kullanıldı. Reaksiyon için 100 ng plazmit 1 U enzim ile 2 saat 37 °C’ de inkübasyona bırakıldı.

3.2.12. DNA Dizi Analizi

İzole edilen rekombinant plazmitler içerdikleri ilgili gen fragmentine göre Sanger dideoksi yöntemi ile gen dizi analizine tabi tutuldu. Dizi analizleri İontek (İstanbul/Turkey) ve MacroGen Europe (Netherlands)’da yaptırıldı.

3.2.13. Biyoinformatik İncelemeler

NRPS ve PKS-I gen kümelerinin amplifiye edilen ilgili domainlerinin dizilimleri NCBI web sayfasında (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), BLASTN ve BLASTX programlarında incelenerek benzer klonlar aynı gruplarda toplandı. Bu klonların GenBank’ta bulunan sekanslar ile benzerlikleri tespit edildi. DNA dizilimlerinin montajı (assembling) için ‘DNA Dragon’ programı kullanıldı. Filogenetik ağaç çiziminde ‘ClustalW’ programı kullanılırken, NRPS A domainlerinin substrat olarak tanıyıp katalizlediği amino asitler ‘NRSPredictor2’ programı kullanılarak analiz edildi (Rausch ve ark. 2005, Röttig ve ark. 2011).

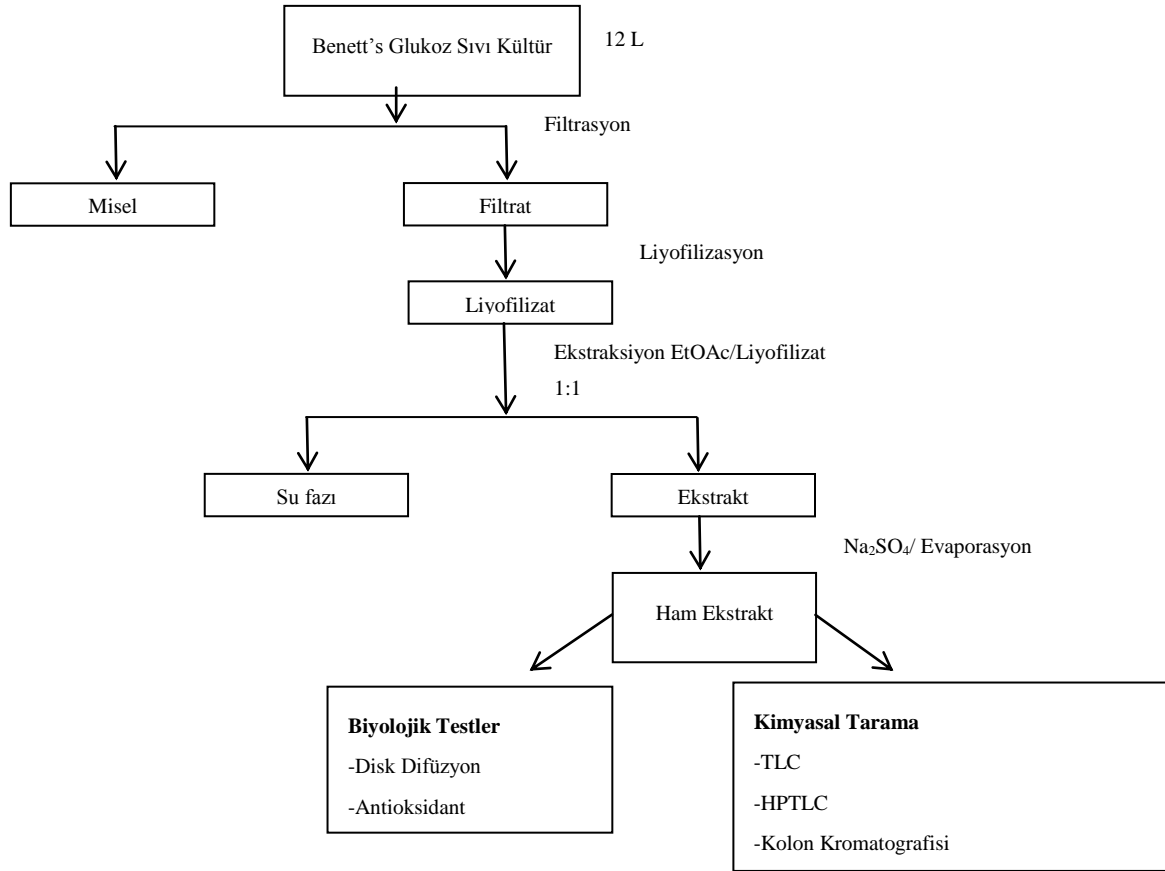
3.2.14. *Streptomyces* sp. CAH29’un Üretilmesi ve Doğal Ürünlerinin Ekstraksiyonu

Streptomyces sp. CAH29 kültür ortamına salgıladığı biyoaktif bileşiklerin taranması amacıyla; Bennett’s Glukoz besiyerinde üretildi. M2 katı besiyerinden alınan koloniler içerisinde 50 ml sıvı besiyeri bulunan 250 ml’lik erlenlere ön inkübasyon için aktarıldı. 28 °C’de 230 rpm’de 72 saat üretimden sonra 150 ml besiyeri içeren 500 ml’lik erlenlere 1,5 ml inokülasyon yapıldı ve 72 saat inkübasyona bırakıldı.

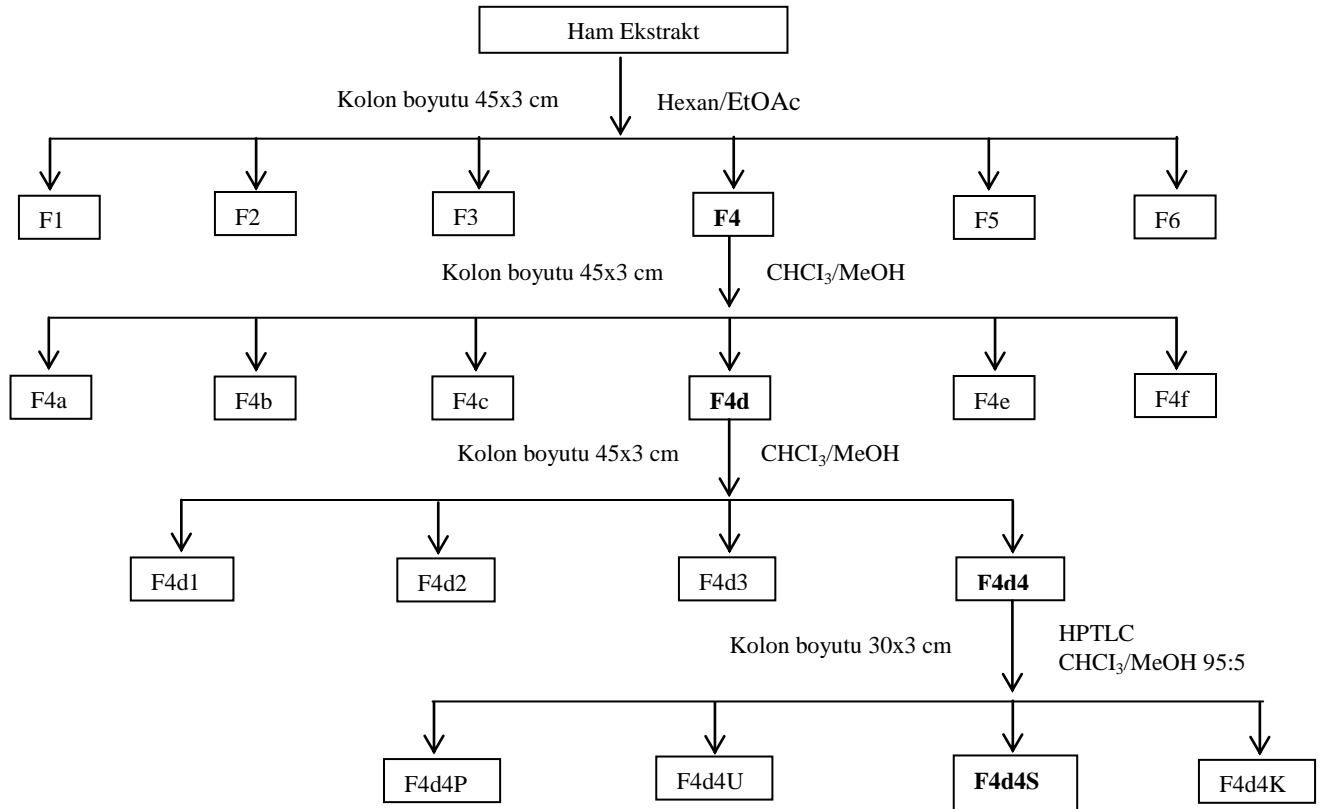
İnkübasyondan sonar, miseller ve süpernatantı ayırmak için kültür filtre edildi. Filtrasyon sonrasında süpernatant sıvı azotla ile dondurularak liyofilize edildi. Liyofilizat etil asetat ile 1:1 oranında ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstrakt Na_2SO_4 ile kurutulmuş ve tam anlamıyla kuru ham ekstrakt elde edilene kadar evaporatörde işlem yapılmıştır. İşlemlerin akış şeması Şekil 3.5.'te gösterilmiştir.

3.2.15. Kolon Kromatografisi ile Biyoaktif Bileşimin Saflaştırılması

Geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip spotta bulunan bileşiklerin saflaştırılması için silika dolgu maddeli kolon kromatografisi çalışmaları yapıldı. Şekil 3.5.'te görüldüğü üzere ham ekstrakt, yapılan ilk kolon kromatografisinde Hexan/EtOAc çözücü sisteminin kullanılması ile 6 farklı fraksiyonda toplandı. İlgilenilen biyoaktif bileşik veya bileşikler içeren F4 fraksiyonu ikinci bir kolona uygulandı.



Şekil 3.5. *Tetrangomycin* bileşiminin ekstraksiyon şeması

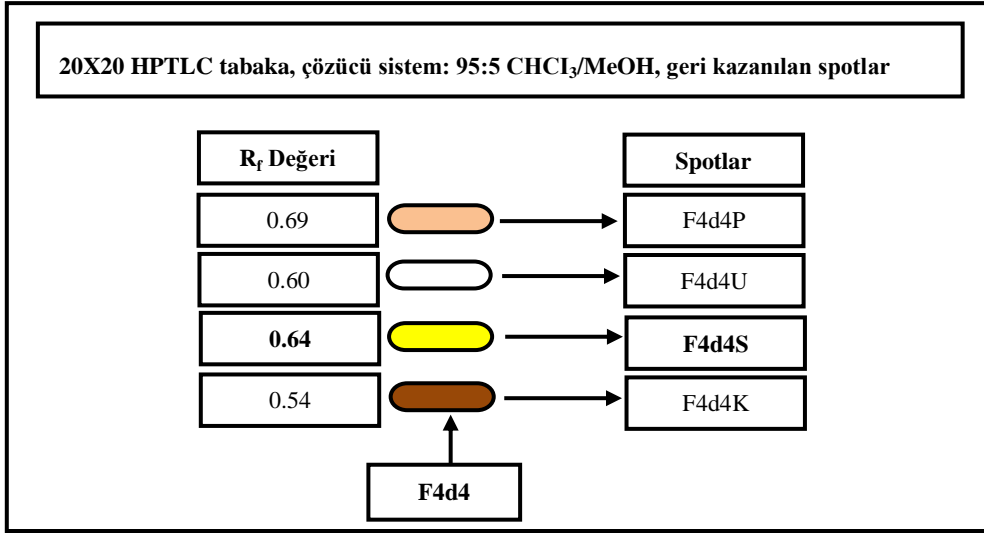


Şekil 3.6. *Tetrangomycin* bileşiğinin kolon kromatografisi ile saflaştırma şeması

TLC profillerine göre yapılan fraksiyonlandırma işlemi sonucunda biyootografi yöntemi (Özakın 2010) ile biyolojik aktivitesini belirlemiş olduğumuz biyoaktif bileşiğin, F4d fraksiyonunda tespit edilmesiyle son kolon sistemine geçildi. Bu kolon sisteminde kloroform/metanol gradiyentli çözücü sisteminin kullanılması ile biyoaktiviteye sahip F4d4 fraksiyonu elde edildi.

3.2.16. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)

Son aşamadaki kolon sisteminden (30x3 cm) elde edilen aktif fraksiyon F4d4'deki bileşikler geri kazanmak için HPTLC yöntemi uygulandı. Ekstraktlar HPTLC cihazıyla 20x20 cm tabakalara 30 µl hacminde düz bir bant şeklinde spot edildi. Kloroform-metanol (95:5) çözücü sistemi ile yapılan yürütme işlemi sonrası tabaka üzerindeki spotların R_f değerleri, UV taraması sonucu bileşiklerin maksimum absorbanstaki dalga boyları belirlendi (Şekil 3.6.).



Şekil 3.7. F4d4 fraksiyonunun HPTLC tabakası üzerinde ayrılması

3.2.17. Yapı Aydınlatma Çalışmaları

Saf olarak elde edilen bileşiğin kimyasal yapı analizi Villanova Üniversitesi (PA, ABD) Kimya bölümünde gerçekleştirildi. Kütle (Agilent, 6210 TOF) ve NMR (Bruker, 500 MHz) spektroskopilerinden elde edilen spektrumlar doğrultusunda yapı aydınlatılması yapıldı.

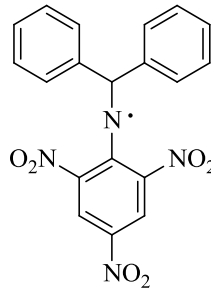
3.2.18. Disk Difüzyon Yöntemi İle Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini

Antimikrobiyal aktivite, “National Committee for Clinical Laboratory standards (NCCLS)” tarafından önerilen disk difüzyon yöntemine göre yapıldı. Disk difüzyon testinde bakteriler için Nutrient Agar (NA, Oxoid), mantarlar için ise Sabouraud Dextrose Agar (SDA) kullanıldı. Taze bakteri kolonileri 25 ml Nutrient Broth (NB,)’a inoküle edildi. Çalkalamalı su banyosunda bulanıklık 0,5 McFarland standartına (1×10^8 CFU/ml) ulaşmaya kadar 4-6 saat 37 °C’de inkübe edildi. Final inokulum 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlandı. *C. albicans* kolonileri ise 25 ml Sabouraud Dextrose Broth (SDB, Oxoid)’da aynı koşullarda, 0,5 McFarland standartına ulaşmaya kadar yaklaşık 8-10 saat inkübe edildi. Hazırlanan final inokulumlardan 100 µl alınarak herbir katı besiyerine steril pamuk çubuklar yardımıyla yayma yapıldı. Besiyerleri +4 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra üzerine diskler uygulandı. 6 mm çapındaki steril boş kağıt disklerle (Oxoid),

hazırlanan organik etilasetat ekstraktı ve metanolde çözülmüş *tetrangomycin* 20 µL emdirilerek, diskler agar üzerine yerleştirildi. Agar besiyerleri 37 °C’de 24 saat organizmalar bekletilerek süre sonunda inhibisyon zonları ölçüldü.

3.2.19. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Saflaştırılan ve yapısı aydınlatılarak *tetrangomycin* olduğu tespit edilen saf bileşik ve *Streptomyces sp.* CAH29 etanol ekstraktının, DPPH radikalini (Şekil 3.7.) söndürme aktivitesi DPPH metodu kullanılarak belirlendi (Shimada ve ark. 1992). Bu yöntemde BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontroller, *tetrangomycin* ve ham ekstraktın, 1 mg/ml’lik konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı. *Streptomyces sp.* CAH29 ekstraktı stok çözeltilisinden 10, 25, 50, 150, 250, 350, 500 µg/ml’lik, *tetrangomycin* stok çözeltilisinden ise 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µg/ml’lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. 0,1 mM DPPH çözeltisi etanolde hazırlandı. Her iki örneğin ve pozitif kontrollerin seyreltilmiş çözeltilerinden konsantrasyonlarına göre 3 ml alındı ve üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Tüplerde oluşan karışım iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda UV’de 517 nm’de absorpsiyon ölçüldü. Bu metotta negatif kontrol olarak 3 ml etanol ve 1 ml 0,1 mM DPPH karışımı kullanılırken kör olarak da 4 ml etanol kullanıldı.



Şekil 3.8. DPPH Radikalinin molekül yapısı

Sonuç olarak artan madde konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

% I = DPPH radikalini söndürme aktivite yüzdesi (% inhibisyon)

3.2.20. Sitotoksitite Testi

Bu testler Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi. Androjen duyarlı, insan prostat adenokarsinom hücreleri (LNCaP) Avrupa hücre kültürleri koleksiyonundan (ECC, UK) insan alveolar adenokarsinom hücre dizisi (A549) ise Amerikan tipi hücre koleksiyonundan (ATCC, USA) temin edildi. A549 hücre dizisi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), LNCaP hücreleri ise RPMI (Roswell Park Memorial Institute) protokolüne göre kültüre edildi. Sonrasında her iki kültüre 37 °C'de, %5 CO₂ ile %95 hava olan nemli bir atmosferde %1 *penicillin/streptomycin* karışımı ve %10 FBS (Fetal sığır serumu) ilave edildi.

Hücreler, 1x10³ hücre/ml kültür ortamında, 96 kuyucuklu tabaklarda inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, final konsantrasyonu %0,1'i aşmayacak şekilde dimetilsülfoksitte (DMSO) çözünen *tetragomycinin* değişik konsantrasyonlarıyla (0-25 µM) muamele edildi. *Tetragomycin* muamele edilen ve edilmeyen hücreler (kontrol), 37 °C'de, %5 CO₂'li nemli bir ortamda, 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda hücre çoğalması, WST-1 (4-(3-(4-*ioyofenil*)-2-(4-*nitrofenil*)-2H-5-*tetrazolio*)-1,3-benzen disülfonat) boyasındaki renk değişime bağlı değerlendirildi. Bu amaçla 10 µl WST-1 numunelere eklenip 1 saat inkübasyona bırakıldı ve sonra hücre çoğalması, 450 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapılarak değerlendirildi. Deneysel koşullar üçlü tekrar halinde çalışıldı. Deney sonucunda hücrelerdeki canlılık, kontrol yüzdesi olarak değerlendirildi.

3.2.21. Docking Analizleri

Hedef proteinimiz, dehidrosqualen sentaz enziminin (CrtM) X ray kristal yapısı (2ZY1. pdb) protein databank (PDB) veritabanından indirildi (Song ve ark. 2009). Ligand olarak *tetragomycinin* yanısıra, CrtM inhibitörü olduğu bilinen 830 bileşiği (dipotasyum (2-oxo-2-{{[3-(3-fenoksifenil) propil] amino}etil fosfonat) ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ligandların dizaynında 'GaussView 3.09', optimizasyonunda ise 'Gaussian 03' (Frisch ve ark. 2004) temelli AM1 metodu kullanıldı (Dewar ve ark. 1985).

3.2.22. *Salinisora* İzolatlarının Doğal Ürün Biyosentez Gen Kümelerinin Biyoinformatik Programlarda İncelenmesi

Salinispora izolatların genom dizilimleri FASTA ve Genbank gibi iki farklı dosya formatında Joint Genome Institute's Integrated Microbial Genomes (IMG) veritabanından indirildi (www.img.jgi.doe.gov). Sonrasında izolatların genom dizilimleri doğal ürün gen kümelerinin tespiti için 'antiSMASH' (Blin ve ark. 2013) ve 'NapDOS' (Ziemert ve ark. 2012) programlarında incelendi. 'antiSMASH' genomda doğal ürün biyosentez gen kümelerini tararken, 'NapDOS' ise C ve KS domain tahmin yapmaktadır.

Spesifik bazı biyosentez yollarının filogenetik açıdan incelenmesi amacıyla 'MultiGeneBLAST' (Medema ve ark. 2013) ve glikolize yolların tespit edilmesi için 'DoBISCUIT' (Ichikawa ve ark. 2013) programları kullanıldı.

3.2.23. *Salinisora* İzolatlarının Üretilmesi ve Doğal Ürünlerinin Ekstraksiyonu

Tüm *Salinispora* izolatları 25 ml A1M1 sıvı besiyeri bulunan 100 ml'lik erlenlerde 25 °C 160 rpm' de 14-20 gün arasında önikübasyonda üremeye bırakıldı. Sonrasında ise önikübasyon kültürlerinden 2 ml'lik sıvı kültür her bir izolat için üçlü replikalı olarak hazırlanmış 100 ml'lik A1M1 sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. Ekim sonrasında izolatlar 25 °C 160 rpm' de 14-20 gün boyunca büyüme bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda izolatlardan elde edilen sıvı kültürler etil asetat ile 1:1 oranında ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraktlar Na₂SO₄ ile kurutulup, çözücü fazı evapore edildikten sonra ham ekstraktlar elde edildi.

Ekstraktlar final konstrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde metanolde çözüldükten sonra LC ve LC/MS/MS analizleri öncesinde filtre edildi.

3.2.24. *Salinisora* İzolatlarının Doğal Ürünlerinin LC/MS/MS Analizleri

Bu analizler için Agilent Extend-C18 RP UPLC kolonun (2.1×100 mm, 1.8 µm) bağlı olduğu Agilent 1260 LC ve Agilent 6530 Q-TOF LC/MS sistemleri kullanıldı. Her bir ekstraktan sisteme 20 µl enjekte edildi. *Salinispora* izolatlarının ekstraktlarının analizi için

3. MATERYAL VE METOT

%10 asetonitril (ACN) (%0.1 su, 0–3 dk), %10–100 ACN (%0.1 su)/%0.1 su (3–23 dk), %100 ACN (%0.1 su, 23–25 dk), %10 ACN (%0.1 su, 25–30 dk) LC gradiyenti kullanıldı.

Bunun akabinde MS/MS analizi için pozitif modda, 100-1600 m/z aralığındaki metabolitler tarandı. Buna ek olarak VCap değeri 3000, çarpışma enerjisi 20 eV, gaz sıcaklığı ise 300 °C olacak şekilde ayarlandı.

Analizleri sonunda ham verilerin UV analizleri için ChemStation (Agilent) MS analizleri içinse ‘MassHunter’ (Agilent) programları kullanıldı.

3.2.25 GNPS Dereplikasyon ve Network Analizleri

LC/MS/MS analizleri sonucunda elde edilen ham MS/MS verisi dosyaları networking analizleri öncesinde ‘Trans Proteomic Pipeline’ programı ile mzXML dosya formatına dönüştürüldü.

Network ve dereplikasyon analizleri için GNPS programı kullanıldı (www.gnps.ucsd.edu). Tüm network analizlerinde verilerin spektral benzerliklerinin vektörel ölçüsü olan cosine değeri 0,7 olarak ayarlandı. Spektral analiz sonuçlarının görüntülenmesinde ‘Cytoscape 3.1.0’ (www.cytoscape.org) programı kullanıldı.

Dereplikasyon analizleri GNPS dışında için with ‘Metlin’, ‘AntiMarin’, ‘Marinlit’ ve ‘Norine’ veri tabanları kullanıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Genomik DNA İzolasyonu

Moleküler teşhisleri tamamlanmış 65 farklı karasal *Streptomyces* izolatından genomik DNA izolasyonları yapıldı. İzolasyonu yapılan tüm izolatlara ait DNA'lar %0,8'lik agaroz jelde incelendi.

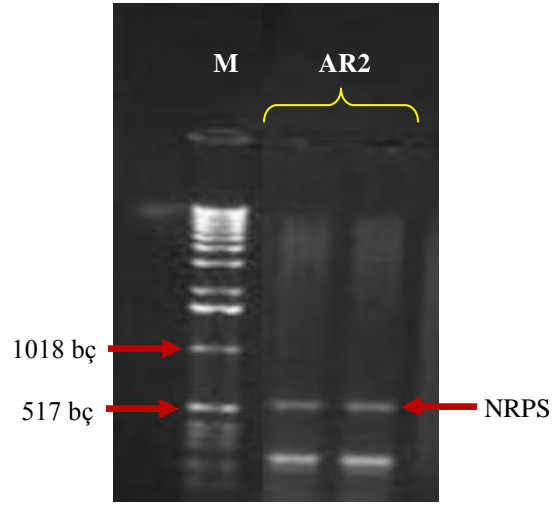
4.1.2. NRPS ve PKS-I Genlerinin *Streptomyces* Genomlarında PCR İle Taranması

4.1.2.1. NRPS Geni A Domaini PCR Optimizasyonları

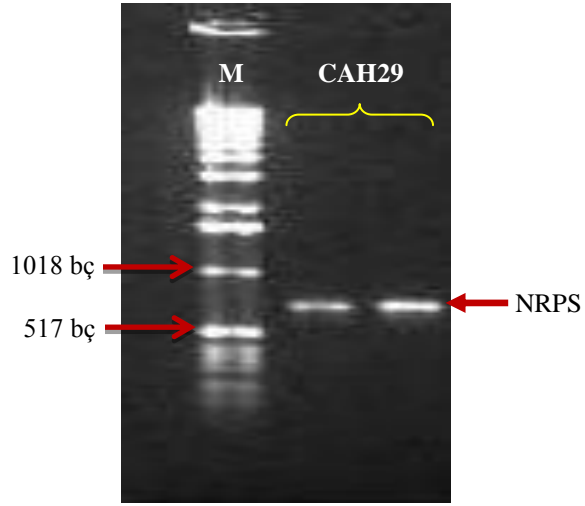
İzolasyonu yapılan genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak PCR ile NRPS geni A domainleri amplifiye edildi. İlgili domain grubumuzun diğer çalışanları tarafından 48 izolattan, 17'si ise bu çalışmada olmak üzere 65 izolatın tümünde ortalama 700 bp uzunluğunda ürün elde edildi (Acer 2011, Bali 2011, Porsuk 2011, Ozakin ve ark. 2014). Tez kapsamında 17 izolata ilişkin resimler yer almaktadır. PCR amplifikasyonları için materyal metotta verilen standart koşullardan başlanarak; MgCl₂ ve primer bağlanma sıcaklığı gibi optimizasyonlar yapıldı. Her izolat için tespit edilen optimizasyon koşulları şekil açıklamalarında verilmektedir.

Streptomyces sp. AR2 ve *Streptomyces* sp. CAH29 izolatlarında standart koşullarda beklenen ürün elde edildi (Şekil 4.1 ve 4.2).

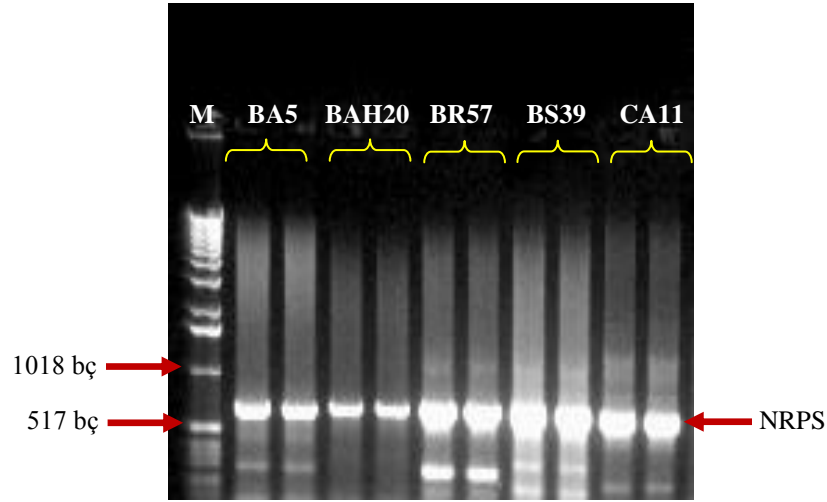
Standart koşullarda istenilen ürün elde edilemeyen *Streptomyces* sp. BA5, *Streptomyces* sp. BAH20, *Streptomyces* sp. BR57, *Streptomyces* sp. BS39 ve *Streptomyces* sp. CA11 izolatlarında final MgCl₂ konsantrasyonunun 2,5 mM'a çıkarılmasıyla ürünler elde edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (1,5 mM MgCl₂, 59 °C primer bağlanma sıcaklığı)



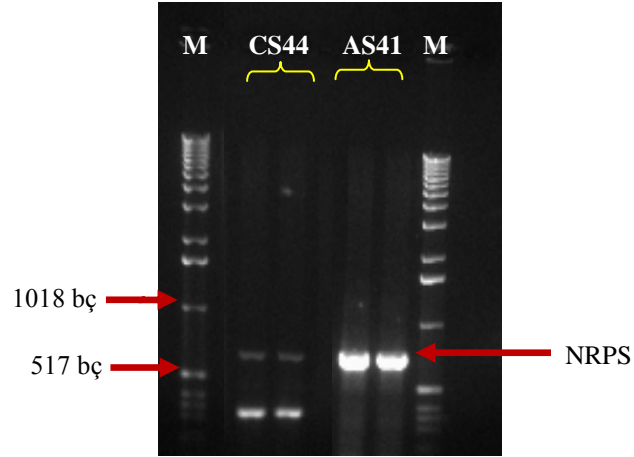
Şekil 4.2. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (1,5 mM MgCl₂, 59 °C primer bağlanma sıcaklığı)



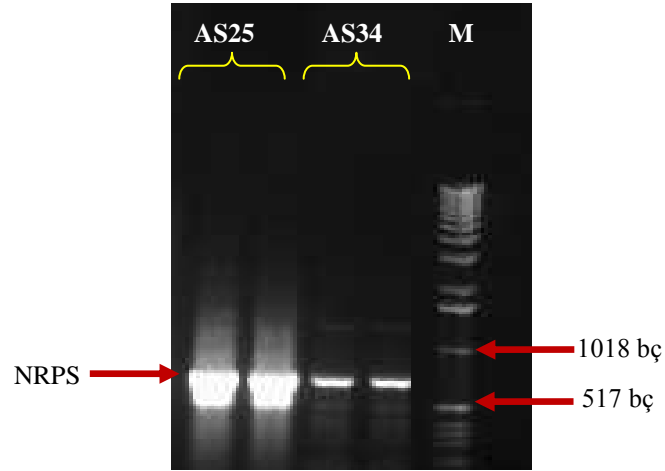
Şekil 4.3. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (2,5 mM MgCl₂, 59 °C primer bağlanma sıcaklığı)

Bağlanma sıcaklığında herhangi bir değişiklik yapılmaksızın MgCl₂ konsantrasyonunun 3,5 mM olacak şekilde artırılmasıyla *Streptomyces* sp. AS34, *Streptomyces* sp. AS41 ve *Streptomyces* sp. CS44 izolatlarında ürün eldesi sağlandı (Şekil 4.4). Sonrasında MgCl₂ konsantrasyonunun değiştirilmeden bağlanma sıcaklığının 57 °C'ye düşürülmesiyle *Streptomyces* sp. AS25 izolatında ürün elde edildi (Şekil 4.5).

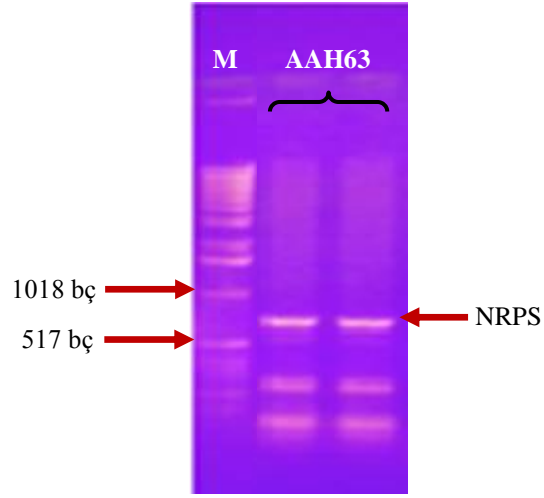
Yukarıdaki koşullarda ürün elde edilemeyen izolatlar için, MgCl₂ konsantrasyonunun 3,5 mM'a primer bağlanma sıcaklığının ise 55 °C'ye ayarlanmasıyla *Streptomyces* sp. AA53, *Streptomyces* sp. AAH63, *Streptomyces* sp. AR9 ve *Streptomyces* sp. CA16 ürün elde edildi (Şekil 4.6-4.8).



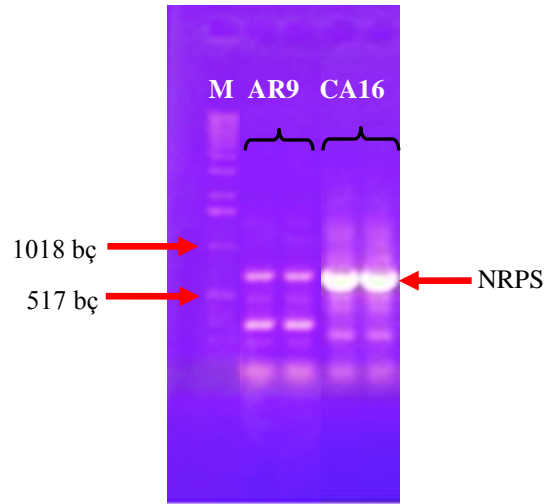
Şekil 4.4. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (3,5 mM MgCl₂, 59 °C primer bağlanma sıcaklığı)



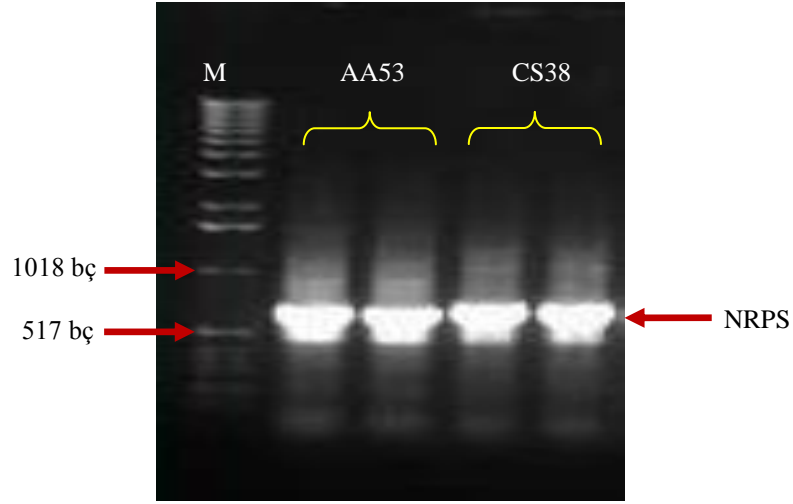
Şekil 4.5. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (3,5 mM MgCl₂, 57 °C - AS25, 59 °C – AS34 primer bağlanma sıcaklığı).



Şekil 4.6. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (3,5 mM MgCl₂, 55 °C primer bağlanma sıcaklığı)

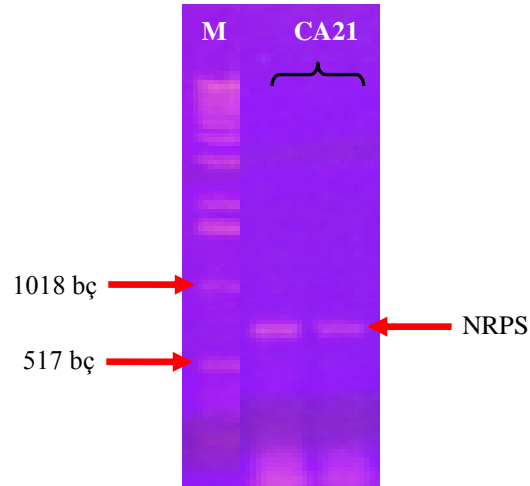


Şekil 4.7. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (3,5 mM MgCl₂, 55 °C primer bağlanma sıcaklığı).



Şekil 4.8. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (3,5 mM MgCl₂, 55 °C primer bağlanma sıcaklığı).

Şekil 4.8’de görüldüğü üzere 2 mM MgCl₂ varlığında ve 50 °C bağlanma sıcaklığında *Streptomyces* sp.CS38 izolatında ürün elde edildi. Son olarak *Streptomyces* sp.CA21 izolatından ise 3,5 mM MgCl₂ varlığında ve 50 °C bağlanma sıcaklığında ürün elde edildi (Şekil 4.9).

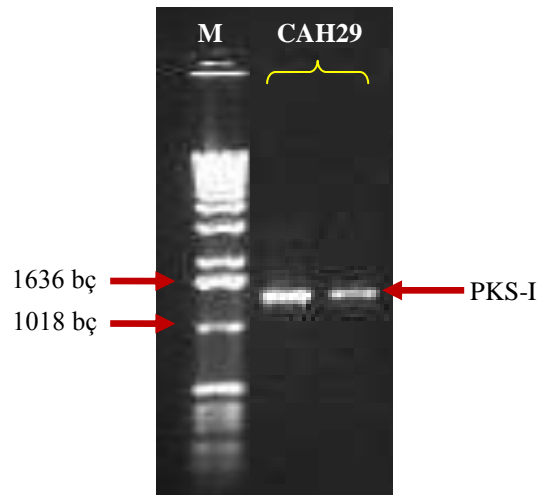


Şekil 4.9. İzolatlardan elde edilen A domain PCR ürünü (3,5 mM MgCl₂, 50 °C primer bağlanma sıcaklığı).

4.1.2.2. PKS-I Geni KS Domaini PCR Optimizasyonları

Streptomyces izolatlarından saflaştırılan DNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PCR reaksiyonları sonucunda, PKS-I genlerine ait KS domainleri standart koşullardan başlanarak $MgCl_2$ konsantrasyonları, denatürasyon süresi, primer bağlanma sıcaklığı ve polimerizasyon süresi değiştirilerek farklı optimizasyonlar yapıldı. Bu optimizasyonlar sonucunda toplamda 65 izolattan 54'ünde beklenen bölgede ürün elde edildi. Bu 54 izolatın PCR amplifikasyonunun 44'üne ilişkin bulgular grubumuzun diğer araştırmacılarının çalışmalarında yer almıştır (Acer 2011, Bali 2011, Porsuk 2011). Geriye kalan 10 izolatın KS domain amplifikasyon çalışmaları yeni tezin bulgularıdır. İzolatların çeşitli optimizasyon koşullarında amplifiye edilen pütatif PKS-I KS domainleri aşağıda Şekil 4.10-4.14. arasında gösterilmektedir.

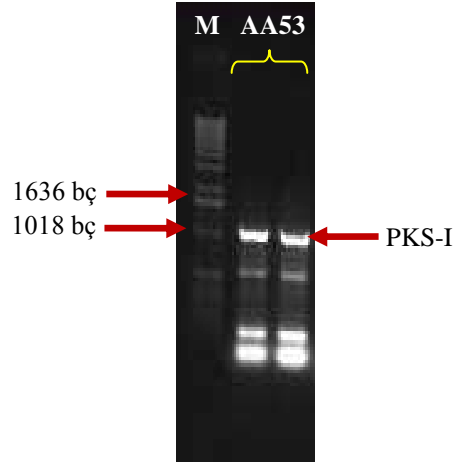
Standart koşullarda yapılan PCR reaksiyonları sonucunda yukarıda bahsedilen 10 izolatın hiçbirinde amplifikasyon elde edilmedi. *Streptomyces* sp. CAH29 izolatında şekil 4.10'da görüldüğü üzere 2,5 mM $MgCl_2$ ve 53 °C primer bağlanma sıcaklığında ürün elde edildi.



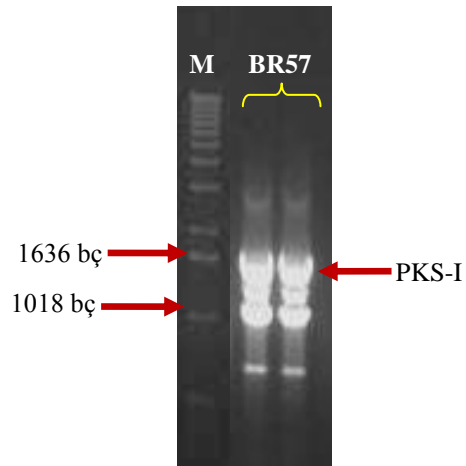
Şekil 4.10. İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü (2.5 mM $MgCl_2$, 53 °C primer bağlanma sıcaklığı)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Streptomyces sp. AA53 ve *Streptomyces* sp. BR57 izolatları için $MgCl_2$ konsantrasyonu 2,5 mM primer bağlanma sıcaklığı 50 °C'ye ayarlandığı koşullarda ürün elde edildi (Şekil 4.11- 4.12).



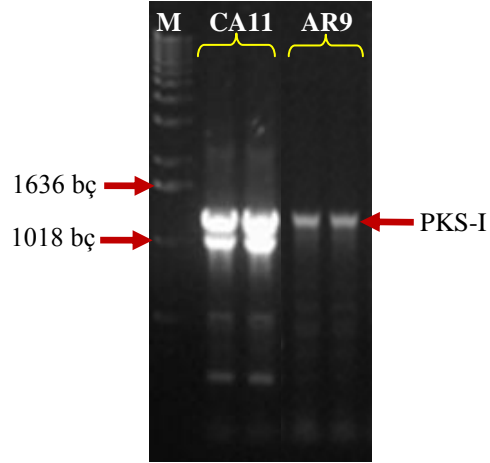
Şekil 4.11. İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü (2,5 mM $MgCl_2$, 50 °C primer bağlanma sıcaklığı).



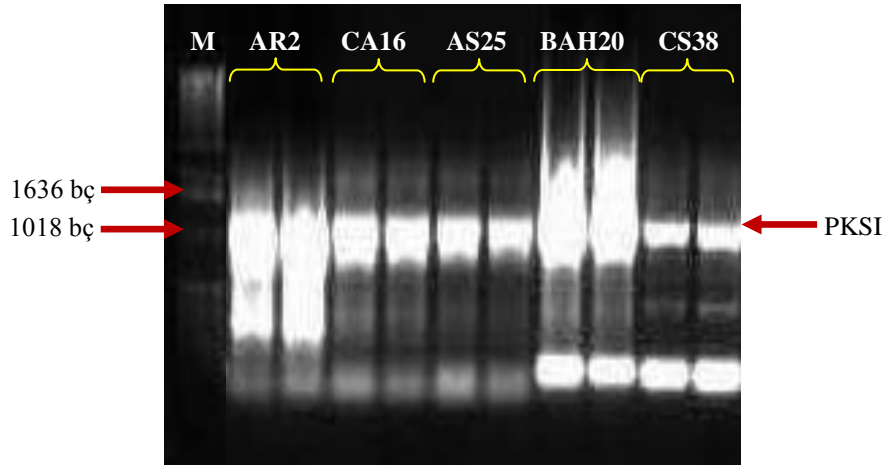
Şekil 4.12. İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü (2,5 mM $MgCl_2$, 50 °C primer bağlanma sıcaklığı)

Şekil 4.14'de görüldüğü üzere 2,5 mM $MgCl_2$ varlığında ve termal döngüde denaturasyon süresinin 30 saniyeden 1 dk' ya, polimerizasyon süresinin 4 dk'dan 3 dk'ya ve primer bağlanma sıcaklığının 49 °C olarak değiştirilmesiyle *Streptomyces* sp. CA11, *Streptomyces* sp. AR9 *Streptomyces* sp. AR2, *Streptomyces* sp. CA16, *Streptomyces* sp.

AS25, *Streptomyces* sp. BAH20 ve *Streptomyces* sp. CS38 izolatlarında ürün elde edildi (Şekil 4.13- 4.14).



Şekil 4.13. İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü (2,5 mM MgCl₂, 1dk denatürasyon, 2 dk 49 °C primer bağlanma sıcaklığı, 3 dk polimerizasyon)



Şekil 4.14. İzolatlardan elde edilen KS domain PCR ürünü (2,5 mM MgCl₂, 1dk denatürasyon, 2 dk 49 °C primer bağlanma sıcaklığı, 3 dk polimerizasyon)

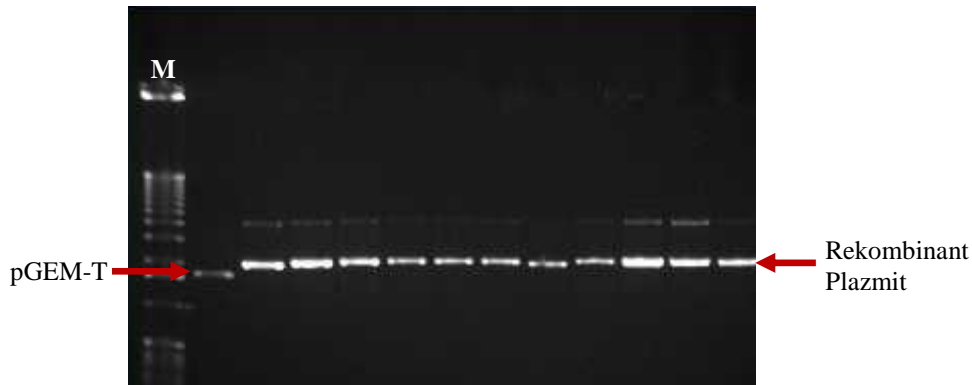
4.1.3. PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması

PCR deneyleri sonucunda elde edilen yaklaşık 700 bç uzunluğundaki pütatif NRPS geni A domaini ve 1200-1400 bç uzunluğundaki PKS-I geni KS domaini amplifikasyon ürünleri agaroz jelden kesilerek ekstrakte edildi. Ligasyon deneylerinde kullanılan bu DNA fragmentleri bir sonraki aşamada pGEM-T vektörlere klonlandı.

4.1.4. PCR Ürünlerinin Klonlanması ve Gen Kütüphanelerinin Kurulması

4.1.4.1. Pütatif NRPS Geni A Domainlerinin Klonlanması

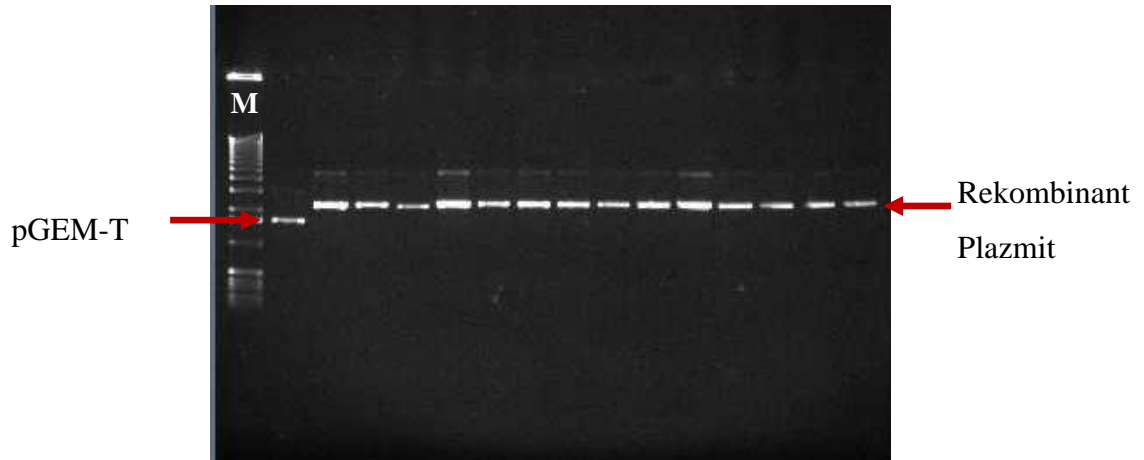
Tüm *Streptomyces* izolatlarından elde edilen pütatif A domaini DNA fragmentleri, jelden geri kazanılarak pGEM-T vektörlere klonlandı. Alıcı hücre olarak *E.coli* DH5- α 'nın kullanılmasıyla her izolat için ilgili DNA fragmentini içeren mini gen kütüphaneleri kuruldu. Rekombinant koloniler, ampisilin dirençliliği ve mavi-beyaz seleksiyon sistemine göre seçildi. Beyaz renkli *ampicilline* dirençli kolonilerin pütatif rekombinant plazmid içermesinden dolayı, bu koloniler yeniden üretilerek hücrelerden plazmid izolasyonları yapıldı. Her gen kütüphanesinden 10-20 arasında koloni seçildi. Şekil 4.15'te *Streptomyces* sp. CAH29 izolatının A domain minigen kütüphanelerinden izole edilmiş olan rekombinant plazmitler gösterilmektedir. Son olarak her bir rekombinant plazmidin içerdiği yabancı DNA'lara dizi analizi yapıldı.



Şekil 4.15. *Streptomyces* sp. CAH29 izolatı A domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler.

4.1.4.2. Pütatif PKS-I Geni KS Domainlerinin Klonlanması

PCR ile 54 *Streptomyces* izolatından amplifiye edilen pütatif KS DNA fragmentleri A domaininde olduğu gibi jelden geri kazanılarak pGEM-T vektörlere klonlandı. *E. coli* DH5- α kompetent hücrelerine transformasyon yapılarak ilgili gen ve her bir izolat için mini gen kütüphaneleri oluşturuldu. Rekombinant koloniler, ampisilin dirençliliği ve mavi-beyaz seleksiyon sistemine göre seçildi. Beyaz renkli ampisiline dirençli kolonilerin pütatif rekombinant plazmid içermesinden dolayı, ortalama 10-20 koloni sıvı besiyerinde üretilerek hücrelerden plazmid izolasyonları yapıldı. Şekil 4.16'da *Streptomyces* sp. CAH29 izolatının KS domain minigen kütüphanelerinden izole edilmiş olan rekombinant plazmitler gösterilmektedir. Rekombinant kolonilerden saflaştırılan plazmitlerin MvaI, Pst-I ve EcoR-I restriksiyon enzim kesimleri yapıldı. Kesim profillerinin benzerliğine göre koloniler gruplandı. Her bir gruptan rekombinant plazmidler seçildikten sonra DNA dizi analizlerine tabi tutuldu.



Şekil 4.16. *Streptomyces* sp. CAH29 izolatı KS domaini gen kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmitler

4.1.5. Biyoinformatik İncelemeler

Altmış beş *Streptomyces* izolatının tümüyle NRPS, 54'ü ile de PKS-I mini gen kütüphanesi kuruldu. Bu mini gen kütüphanelerinden rastgele seçilen rekombinat

plazmitlerin DNA dizi analizleri sonrasında ilgili genlerin nükleotit dizilimleri NCBI web sitesinde BLASTN ve BLASTX programlarının kullanılmasıyla veri tabanındaki mevcut genlerle homoloji oranları tespit edildi. Protein benzerliğini vermesinden ötürü BLASTX analizleri dikkate alınarak, izolatlardan elde edilen A ve KS domaini DNA dizilimlerinin biyoinformatik analiz sonuçlarında klonlar bir grup içerisine dahil edildi. Bundan dolayı tablolarda izolatların sahip olduğu grup sayısı, o organizmadan elde edilen genlere ait domain çeşitliliğini göstermektedir. Bu domain çeşitliliği de izolatın genomundaki NRPS ve PKS-I gen kümelerinin çeşitliliğini ifade etmektedir.

BLASTX analizlerinin yanısıra ‘NRSPredictor2’ programı ile NRPS A domainlerinin substrat bağlayan korunmuş motiflerinin analizi yapılarak, bu domainlerin bağlanabileceği substratlar tahmin edildi.

4.1.5.1. NRPS A Domainlerinin Biyoinformatik Analizleri

NRPS A domainlerini hedef alan dejenere primerlerin kullanılması ile tüm endemik bitki kök bölgesi *Streptomyces* izolatlarımızın NRP sentez potansiyelleri ortaya çıkarıldı. Çizelge 4.1, 64 izolata ait 249 sekans ve 1800 klonun taranması sonucunda elde edilmiştir. Her bir türe ait farklı klonlar, ayrı bir grup içerisinde değerlendirilmiştir. Tüm izolatlar içinde *Streptomyces* sp. CA14 izolatında başarıyla kütüphane kurulmasına rağmen (ki DNA dizilimleri genbankasında NRPS’ler ile eşleşebilmektedir), elde edilen klonların DNA dizilimleri bir kaç tekrara rağmen kaliteli olmadığı için domain araştırmasından sonuç alınamadı. Bu sebepten ötürü CA14’ün biyoinformatik analizleri çizelge 4.1’den çıkarılmıştır. Klonlara ait biyoinformatik veriler incelendiğinde izolatların A domain açısından oldukça çeşitlilik gösterdiği tespit edildi. Örneğin *Streptomyces* sp. BSH50 ve *Streptomyces* sp. CA18 izolatlarında NRP bileşik çeşitliliği 8’e kadar çıkabilmektedir. Bunu 6 farklı NRPS A domaini ile *Streptomyces* sp. AA50, *Streptomyces* sp. AS37, *Streptomyces* sp. BA12, *Streptomyces* sp. BA14, *Streptomyces* sp. CA13 ve *Streptomyces* sp. CA19 izolatları takip etmektedir (Ozakin ve ark. 2014). Geriye kalan izolatların yaklaşık %50’si en az 3 ile 4 farklı NRPS A domaininine sahiptir. Bu potansiyel ve çeşitliliğin yanısıra, incelenen dizilerin, genbankasında bulunan diğer dizilerle benzerliklerinin yüksek olmadığı tespit edildi. İzolatlara ait A domain dizilerinin

%34'ünün, bilinen DNA dizilimleri ile benzerliğinin %70'in altında olduğu bulundu. Literatürde %70'in altındaki benzerlik oranının yeni domainleri işaret edebileceği belirtilmiş olmasından ötürü, bu veri yeni NRP sentezinden sorumlu gen kümelerinin keşfi açısından oldukça önemlidir. Bunun yanısıra klonların A domainlerinin çoğu, biyosentetik ürünü henüz tespit edilmemiş NRPS veya hibrit NRPS/PKS gen kümeleri ile benzerlik göstermektedir. Benzerlik tespit edilen homolog diziler başka aktinobakterilere ait olabileceği gibi bunlarla hiç yakınlığı olmayan diğer bakterilerin NRPS genleriyle de homoloji gösterdi (Çizelge 4.1). Bunlardan dikkat çekici olanlar (homoloji gösteren genlerin ait olduğu bakteriler ve parantez içinde en yakın benzerlik gösteren klonlar); *Burkholderia pseudomallei* (AA50-1), *Pseudomonas syringae* (AAH61-7), *Bradyrhizobium* sp. ORS285 (AR17-30), *Coralloccoccus coralloides* (AS25-6), *Micromonospora globose* (BA2-1), *Clostridium cellulolyticum* (BA3-5), *Paenibacillus mucilaginosus* (BA11-32), *Herpetosiphon aurantiacus* (BR57-19), *Actinokineospora spheciospongiae* (BS33-1), *Chitinophaga pinensis* (BSH50-19), *Myxococcus xanthus* (CA16-12), *Myxococcus fulvus* (CA19-4), *Lyngbya majuscula* (CAH29-10), *Catenulispora acidiphila* (CS38-14) *Xenorhabdus bovienii* (CS41-5) ve *Pseudogulbenkiania ferroxidans* (CS41-12), olarak sıralanmaktadır. Benzerlik tespit edilen NRPS ve NRPS/PKS hibrid gen kümeleri içerisinde, antikanser bileşikler olan *actinomycin* ve *zorbamycin* antibiyotik ve antifungallerden *gramicidin*, *enduracidin*, *friulimicin*, *tyrocidin*, *laspartomycin*, *trindamycin*, *althiomycin*, *mycosubtilin* ve sidereforlardan; *pyochelin*, *yersiniabactin*, *enterobactin* ve *bacillibactin* yer almaktadır.

Biyoinformatik incelemelerde BLAST analizleri dışında 'NRSPredictor2' programı da kullanıldı. Bu program A domainlerinin sahip olduğu amino asit dizilimi içerisinde belli bölgelerdeki korunmuş amino asitleri bularak, bu amino asitler tarafından oluşturulan substrat bağlanma paketlerini tespit etmektedir. Bu substrat bağlama paketleri NRP'lerin yapısına katılacak amino asitin seçilmesinde görev almaktadır. 'NRSPredictor2' analizleri sonucunda klonlarımızda veri tabanında bulunan sekiz bağlanma bölgesinden yedisine rastlandı (Ozakin ve ark. 2014).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

İzolatların A domainlerinde en sıklıkla tespit edilen substrat bağlanma bölgeleri alifatik yan zincir amino asitleri [Ser/Thr/Dhpg/Hpgi], sistein [Cys], aromatik grup içeren amino asitler [Phe/Trp/Phg/Tyr/Bht] ve apolar yan zincirlere sahip olan amino asitlere [Gly/Ala/Val/Leu/Ile/Abu/Iva] başlıca bağlanma motifleri olarak saptandı. Sıralamada bunlardan sonra gelen bağlanma bölgeleri ise pozitif yüklü yan zincir içeren amino asitleri [Orn/Lys/Arg], halkasal alifatik zincir içerenleri [Pro/Pip] ve B-bağı vericisi alifatik zincire sahip amino asitleri [Asp/Asn/Glu/Gln/Aad] substrat olarak seçen bağlanma peketleridir. Veri tabanında bulunan hidroksi-benzoik asit türevi amino asitlere [Dhb/Sal] ilişkin bir bağlanma bölgesine hiçbir izolatın A domaininde rastlanmamıştır. Ayrıca, farklı izolatlara ait 61 adet sekansta, program tarafından A domain bulunmuş olmasına karşın, bu A domainlerinin substratları tahmin edilememiştir. Bu veri şimdiye kadar tespit edilmiş NRPS gen kümelerinde rastlanmamış bir substrata işaret edebilmesi açısından oldukça önemlidir. NRPS dizilimlerinden (AA50-5), (AR4-3), (AS31-7), (ASH47-1), (BA1-1), (BSH50- 27), (BS32-5), (CA11-3), (CAH33-12), (CS38-14), (CS43-7) ve (CS44-4) BLASTX sonuçları farklı *Streptomyces* NRPS'leri ile %90'ın üzerinde homoloji göstermesine rağmen, 'NRSPredictor2' programı tarafından A domain substratı tespit edilememiştir.

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. AA50	AA50-1	<i>Burkholderia pseudomallei</i> FMH NRPS (WP_038769901.1)	103/199 (%52)	DSIDVGHND (asp=asn=glu=gln=aad)
	AA50-2	<i>S</i> sp. AS31 (AGS13615.1)	144/211 (%68)	Substratı tahmin edilemedi
	AA50-3	<i>S. scopuliridis</i> (DsaH) (AJW76710.1)	129/212 (%61)	DALWMGGIF (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AA50-4	<i>S. tsukiyonensis</i> , NRPS (BAH68652.1)	146/211 (%69)	DVWHISLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. AA50	AA50-5	<i>S. purpureus</i> , NRPS (BAH68576.1)	185/204 (%91)	Substratı tahmin edilemedi
	AA50-13	<i>S.sp.CA12-13</i> NRPS (AFP49774.1)	198/199 (%99)	DVATVGEVV (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. AA53	AA53-13	<i>S. coeruleoprunus</i> NRPS (BAH68712.1)	205/219 (%94)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
<i>Streptomyces</i> sp. AA58	AA58-1	<i>S.venezuelae</i> , yersiniabactin (CCA53799)	149/218 (%68)	DLYNLSLIW (cys)
	AA58-4	<i>S. viridochromogenes</i> , NRPS (AEG64697)	144/213 (%68)	DILQLGVVW (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AA58-14	<i>S.tsukiyonensis</i> , NRPS (BAH68652)	144/216 (%67)	DVWHISLVD (ser=thr=ser- thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	AA58-6	<i>S.bingchengensis</i> BCW- 1,(ADI04487)	137/207 (%66)	DASTVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. AA59	AA59-1	<i>S. sp. e14</i> , enterobactin (ZP_06710581)	164/211 (%78)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser- thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	AA59-2	<i>S.pristinaespiralis</i> , NRPS ATCC 25486 (ZP_06907900)	179/221 (%81)	DPQDFGVIQ (asp=asn=glu=gln=aad)
	AA59-4	<i>S.coeruleoprunus</i> , NRPS (BAH68712)	213/222 (%96)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	AA59-21	<i>S.venezuelae</i> , yersiniabactin (CCA53799)	151/217 (%70)	DLYNLSLIW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH61	AAH61-6	<i>S. sp. Tu607,1</i> NRPS (ZP_08455386)	139/218 (%64)	DLPKIAEVG (asp=asn=glu=gln=aad)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH61	AAH61-7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. glycinea str. race 4, NRPS (EGH15901)	112/219 (%51)	DAWHVGYIV (pro=pip)
	AAH63-30	<i>S.thermoluteus</i> subsp. fuscus, NRPS (BAH68642)	126/217 (%58)	DLTKMGVIN (asp=asn=glu=gln=aad)
	AAH63-42	<i>S. sp.</i> ID05-A0242, NRPS (BAH68882)	140/217 (%65)	DAQEGGLVD (asp=asn=glu=gln=aad)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH66	AAH66-4	<i>S.chartreusis</i> NRRL 12338, NRPS (ZP_09952732)	156/207 (%75)	DVQFFAQVI (pro=pip)
	AAH66-3	<i>S.acidiscabies</i> 84-104, NRPS (ZP_10455567)	131/203 (%65)	DAWVVAAIM (phe=trp=phg=tyr=bht)
	AAH66-2	<i>Streptomyces</i> sp. ID05- A0111, NRPS (BAH68864)	111/219 (%51)	DAGDVGMVD (asp=asn=glu=gln=aad)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH67	AAH67-1	<i>S. sp.</i> NRRL B-1347, NRPS (WP_030676827.1)	144/205 (%70)	DITQVGQVW (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AAH67-2	<i>S. sp.</i> SPB78, Tyr A domain proteini (WP_009065813.1)	162/205 (%79)	DPAQLMLIA (phe=trp=phg=tyr=bht)
	AAH67-7	<i>S. tsukubaensis</i> , NRPS(WP_006350628.1)	194/205 (%95)	DAYYWGSFA (val=leu=ile=abu=iva)
	AAH67-13	<i>S. sp.</i> NRRL F-4415, NRPS (AGE11898.1)	197/208 (%95)	DTWTIASVD (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH68	AAH68-1	<i>S. flavoviridis</i> , Zorbamycin (ACG60782)	183/215 (%85)	DFTKVGVEVG (asp=asn=glu=gln=aad)
	AAH68-2	<i>S. sp.</i> AA58-14, NRPS (AFP49719.1)	208/209 (%99)	DVWHISLVD (ser=thr=ser- thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH68	AAH68-6	<i>S.sp.</i> NRRL S-1448, pyochelin (WP_030411358.1)	173/214 (%81)	DLYNLSLIW (cys)
	AAH68-9	<i>S.viridochromogenes</i> , Lpmc (AEG64697.1)	121/205 (%59)	Substratı tahmin edilemedi
	AAH68-10	<i>S. coelicoflavus</i> ZG0656, NRPS (EHN72117.1)	143/209 (%68)	DILQLGMIW (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AAH68-18	<i>S. sp.</i> Sp080513GE-23, NRPS (BAI44083)	109/203 (%54)	DASTVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. AR2	AR2-11	<i>S.venezuelae</i> ATCC 10712, NRPS (CCA57372)	169/207 (%82)	DAWQYGLIN (asp=asn=glu=gln=aad)
<i>Streptomyces</i> sp. AR3	AR3-1	<i>S. griseus</i> , NRPS (ACN86280.1)	131/207 (%63)	DILQLGVIW (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AR3-2	<i>S.sp.</i> PRh5, NRPS (EXU64823.1)	120/209 (%57)	DIQFHAQVI (pro=pip)
	AR3-11	<i>S. aurantiacus</i> , NRPS (WP_037658667.1)	182/196 (%93)	DALLTGSVV (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. AR4	AR4-1	<i>S. sp.</i> e14, enterobactin (ZP_06710581)	175/210 (%83)	YVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	AR4-3	<i>S. sp.</i> e14, NRPS (ZP_06711701)	201/211 (%95)	Substratı tahmin edilemedi
	AR4-4	<i>S.sp.</i> CA13 NRPS (AGS13570.1)	211/211 (%100)	DLYNMSLIW (cys)
	AR4-9	<i>S xylophagus</i> , NRPS (WP_043678212.1)	203/210 (%97)	DFWNIGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. AR6	AR6-1	<i>S.sp.</i> NRRL F-2580., NRPS (WP_030715844.1)	162/206 (%79)	DALFIGGAL (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AR6-4	<i>S. sp.</i> , BAH46-2 NRPS (CBZ42146)	137/203 (%67)	DALFIGGAL (val=leu=ile=abu=iva)
<i>Streptomyces</i> sp. AR9	AR9-1	<i>S.sp.</i> AS41-1 NRPS (AFP49803.1)	204/205 (%99)	DLMAHGIVA (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
<i>Streptomyces</i> sp. AR12	AR12-1	<i>S. coeruleoprunus</i> , NRPS (BAH68712)	209/217 (%96)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	AR12-2	<i>S.sp.</i> AA59-2, NRPS (AFP49800.1)	205/215 (%95)	DPQDFGVIQ (asp=asn=glu=gln=aad)
	AR12-4	<i>S. sp.</i> CA3, NRPS, (AGS13526.1)	183/205 (%89)	DPQDFGVIQ (asp=asn=glu=gln=aad)
	AR12-7	<i>S. thermoluteus</i> subsp. Fuscus, NRPS (BAH68643)	135/205 (%66)	DAFTVAAVW (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. AR17	AR17-5	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. dassonvillei DSM 43111, NRPS (YP_003682204.1)	188/207 (%91)	DAYFVGGTF (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AR17-6	<i>S. sp</i> W007, NRPS (WP_032794009.1)	130/204 (%64)	DIWEITADD (asp=asn=glu=gln=aad)
	AR17-30	<i>Bradyrhizobium sp.</i> ORS 285, NRPS ZP_09476467.1	111/217 (%51)	DSTKGHVG (asp=asn=glu=gln=aad)
<i>Streptomyces</i> sp. AR24	AR24-22	<i>S.tsukubaensis</i> NRRL18488, NRPS (ZP_10073265)	165/208 (%79)	Substratı tahmin edilemedi
	AR24-14	<i>S. fungicidicus</i> , enduracidin (ABD65956)	157/217 (%72)	DFWSVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. AR24	AR24-6	<i>S.hygroscopicus</i> sp. hygroscopicus, NRPS (BAH68620)	116/207 (%56)	DALWWGVVF (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AS25-10	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110, NRPS (YP_006263978)	100/216 (%46)	DALGMGFVN (orn=lys=arg)
	AS25-6	<i>C.coralloides</i> DSM 2259, NRPS (YP_005370175)	115/215 (%53)	DVWHFSLID (ser=thr=ser=thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	AS25-13	<i>S.avermitilis</i> MA-4680, NRPS (NP_821778)	164/213 (%77)	Substratı tahmin edilemedi
<i>Streptomyces</i> sp. AS28	AS28-7	<i>S. sp.</i> 10-28-9, NRPS (BAH68798)	155/201 (%77)	Substratı tahmin edilemedi
	AS28-8	<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712, bacillibactin (CCA60345)	187/211 (%89)	Substratı tahmin edilemedi
<i>Streptomyces</i> sp. AS29	AS29-5	<i>S. sp.</i> Pol013, NRPS (AEW23428.1)	209/216 (%97)	DINYWGGIG (orn=lys=arg)
	AS29-2	<i>S. avermitilis</i> MA-4680, NRPS (NP_821778)	165/205 (%80)	Substratı tahmin edilemedi
	AS29-3	<i>S. glaucescens</i> , NRPS (AIR96919.1)	184/212 (%87)	DLYNLSLIW (cys)
	AS29-6	<i>Actinoplanes</i> sp. N902-109, NRPS (AGL19083.1)	145/211 (%69)	DAFFLGGTF (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AS29-8	<i>S.sp.</i> NRRL S-37, NRPS (WP_030861585.1)	186/218 (%85)	DLFNMSLIW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. AS31	AS31-2	<i>S. coeruleoprunus</i> , NRPS (BAH68712)	210/218 (%96)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	AS31-6	<i>S sp.</i> CA12-1, NRPS (AFP49773.1)	172/211(%82)	Substratı tahmin edilemedi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
Streptomyces sp. AS31	AS31-7	<i>S.sp.</i> AS28, NRPS, (AFP49738.1)	201/206 (%98)	Substratı tahmin edilemedi
	AS31-10	<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064, NRPS / PKS (ZP_06775082)	159/218 (%73)	DVGEIGSVD (orn=lys=arg)
Streptomyces sp. AS34	AS34-1	<i>S. glomerochromogenes</i> , NRPS (BAH68439)	181/214 (%85)	DVDENGNVT (asp=asn=glu=gln=aad)
	AS34-3	<i>Streptosporangium sibiricum</i> , <i>sibiromycin</i> (ACN39727)	147/217 (%68)	Substratı tahmin edilemedi
	AS34-4	<i>S. sp.</i> BAH26 (AGS13593.1)	185/214 (%86)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	AS34-8	<i>S. griseus subsp. rhodochrous</i> , NRPS (BAH68550)	137/212 (%65)	DIYWIGGSL (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	AS34-11	<i>S. coelicoflavus</i> ZG0656, NRPS (ZP_13045408)	179/201 (%89)	DLTKVGAVN (asp=asn=glu=gln=aad)
Streptomyces sp. AS36	AS36-1	<i>S.sp.</i> M-17, NRPS (ACM45801)	189/206 (%92)	Substratı tahmin edilemedi
	AS36-2	<i>S.sp.</i> DpondAA-B6, tyrocidine (WP_037748871.1)	150/210 (%71)	DLYNLSLIW (cys)
	AS36-3	<i>S.griseolus</i> , NRPS (BAH68411.1)	186/208 (%89)	Substratı tahmin edilemedi
Streptomyces sp. AS37	AS37-14	<i>S.griseoflavus</i> Tu4000, NRPS (ZP_07313267)	152/216 (%70)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. AS37	AS37-12	<i>S.bingchenggensis</i> BCW-1, NRPS (YP_004959212)	171/207 (%83)	DVQFFAQII (pro=pip)
	AS37-18	<i>S.albus</i> J1074, actinomycin (ZP_06589153)	103/203 (%51)	DFWNVGAVV (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	AS37-21	<i>S.turgidiscabies</i> , NRPS (BAH68764)	197/221 (%89)	DFWNVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	AS37-26	<i>S.hygroscopicus</i> ATCC 53653, NRPS (ZP_07292125)	210/217 (%97)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
<i>Streptomyces</i> sp. AS40	AS40-1	<i>S.tsukubaensis</i> NRRL18488, NRPS (ZP_10073266)	160/204 (%78)	DAWTVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	AS40-2	<i>S.coeruleoprunus</i> , NRPS (BAH68712)	206/214 (%96)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
<i>Streptomyces</i> sp. AS41	AS41-1	<i>S.sioyaensis</i> , NRPS (ACO94998)	102/214 (%48)	Substratı tahmin edilemedi
	AS41-2	<i>S.venezuelae</i> , yersiniabactin (CCA53799)	151/221 (%68)	DLYNLSLIW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. ASH47	ASH47-1	<i>S.sp</i> AS25-10, NRPS (AFP49734.1)	207/207 (%100)	Substratı tahmin edilemedi
	ASH47-2	<i>S.sp</i> AS25-1, NRPS (AFP49733.1)	207/207 (%100)	Substratı tahmin edilemedi
	ASH47-4	<i>S.coeruleoprunus</i> NRPS (BAH68712)	211/219 (%96)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	ASH47-8	<i>S.sp</i> CA18, NRPS (AGS13566.1)	212/212 (%100)	DFWHFGQID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. BA1	BA1-1	<i>S.sp.</i> AS41-1, NRPS (AFP49803.1)	202/204 (%99)	Substratı tahmin edilemedi
	BA1-8	<i>Micromonospora sp. MLI</i> , NRPS (CAJ34370)	158/216 (%73)	DLYDLSLVW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. BA2	BA2-1	<i>Micromonospora globosa</i> , NRPS (WP_030268851.1)	140/220 (%63)	DPFYALALVT (val=leu=ile=abu=iva)
	BA2-2	<i>S. purpureus</i> , NRPS (BAH68577)	149/206 (%72)	DILQLGVIW (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	BA2-4	<i>S. sp.</i> CA19, NRPS (AGS13665.1)	148/205 (%72)	DAWTVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	BA2-6	<i>S. purpeofuscus</i> , NRPS (BAH68582)	165/214 (%77)	Substratı tahmin edilemedi
	BA2-7	<i>S. anulatus</i> , NRPS (ADG27359)	149/210 (%71)	Substratı tahmin edilemedi
	BA2-17	<i>S. sp.</i> BAH26, NRPS (AGS13593.1)	201/212 (%95)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. BA3	BA3-1	<i>S. sp.</i> e14, NRPS (ZP_06711701.1)	211/222 (%95)	Substratı tahmin edilemedi
	BA3-5	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10, NRPS (YP_002505319)	124/217 (%57)	DLYNMSLIW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. BA5	BA5-1	<i>Actinoplanes friuliensis</i> , friulimicin (CAM56770)	127/211 (%60)	Substratı tahmin edilemedi
	BA5-6	<i>Rhodococcus fascians</i> D188, NRPS (AET25251)	173/228 (%76)	DVWSIAMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. BA5	BA5-12	<i>S. hygrosopicus</i> subsp. jinggangensis, NRPS (YP_006249266)	182/213 (%85)	DALLTGSSVV (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. BA11	BA11-4	<i>S. sp.</i> 03-12B, NRPS (BAH68789)	106/205 (%52)	DIWELTADD (asp=asn=glu=gln=aad)
	BA11-2	<i>S. sioyaensis</i> , NRPS (ACO94998)	99/211 (%47)	Substratı tahmin edilemedi
	BA11-32	<i>P. mucilaginosus</i> KNP414, tyrocidine (YP_005313259)	112/210 (%53)	DAFWLGATF (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
<i>Streptomyces</i> sp. BA12	BA12-1	<i>S. viridochromogenes</i> DSM 40736, NRPS (ZP_07301719)	213/218 (%98)	DINYWGGIG (orn=lys=arg)
	BA12-3	<i>S. sp.</i> , BAH20-1, NRPS (AFP49754.1)	212/214 (%99)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	BA12-10	<i>S. sp.</i> AAH68, NRPS (AGS13639.1)	173/217 (%80)	DFWSVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BA12-11	<i>S. griseus subsp. formicus</i> , NRPS (BAH68585)	147/221 (%67)	DFWSVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BA12-15	<i>S. lavendulae</i> rectus, NRPS (BAH68447)	98/189 (%52)	DAWFLGVIA (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	BA12-20	<i>S. ribosidificus</i> , NRPS (BAH68520)	131/205 (%64)	DAWCVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	<i>Streptomyces</i> sp. BA14	BA14-1	<i>S. sp.</i> .CS44, NRPS (AGS13538.1)	199/206 (%97)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. BA14	BA14-2	<i>S.sp.</i> AA59-2, NRPS (AFP49800.1)	186/214 (%87)	Substratı tahmin edilemedi
	BA14-6	<i>S.sp.</i> BS44, NRPS (AGS13660.1)	152/208 (%73)	DSALIAEVW (val=leu=ile=abu=iva)
	BA14-9	<i>S. fimbriatus</i> , NRPS, (BAH68718)	142/208 (%68)	DFWNVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BA14-11	<i>S. sp.</i> PCS3-D2, NRPS (EYU68217.1)	192/213 (%90)	DMYNFGLIH (cys)
	BA14-20	<i>S.sp.</i> AS31, NRPS (AGS13614.1)	196/208 (%94)	Substratı tahmin edilemedi
<i>Streptomyces</i> sp. BAH20	BAH20-1	<i>S.hygroscopicus</i> ATCC 53653, NRPS (ZP_07292125)	216/220 (%98)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	BAH20-9	<i>S.viridochromogenes</i> , laspartomycin (AEG64696)	193/225 (%86)	DFQFFGIAA (pro=pip)
<i>Streptomyces</i> sp. BAH26	BAH26-1	<i>S. ends</i> , NRPS (BAH68616.1)	155/211 (%73)	DLYNMSLIW (cys)
	BAH26-2	<i>S.sp.</i> BA2, NRPS (AGS13600.1)	201/212 (%95)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BAH26-4	<i>S.sp.</i> NRRL WC-3742, NRPS (WP_031064510.1)	136/216 (%63)	DVEFVGQNV (pro=pip)
<i>Streptomyces</i> sp. BAH28	BAH28-5	<i>S. lividoclavatus</i> , NRPS (BAH68565)	157/217 (%72)	DFWNIGMVI (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. BAH28	BAH28-6	<i>S. cinereospinusgi</i> , NRPS, (BAH68708)	185/214 (%86)	Substratı tahmin edilemedi
	BAH28-13	<i>S. auranticus</i> , Mycosubtilin (WP_016639378.1)	211/216 (%98)	DINYWGGIG (orn=lys=arg)
<i>Streptomyces</i> sp. BAH46	BAH46-2	<i>S. arenicola</i> CNS-205, NRPS (YP_001539321)	132/209 (%63)	DALFIGLVA (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	BAH46-11	<i>S. baarnensis</i> , NRPS (BAH68670)	132/214 (62%)	DVWHLSLID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BAH46-17	<i>S. bingchenggensis</i> BCW-1, NRPS (YP_004959618)	125/203 (%62)	DAWTA AAIC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	BAH46-30	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350, NRPS (YP_001821960)	163/224 (%73)	DAQEGGLVD (asp=asn=glu=gln=aad)
	BAH46-9	<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350, NRPS (YP_001821961)	149/217 (%69)	Substratı tahmin edilemedi
	<i>Streptomyces</i> sp. BR57	BR57-15	<i>S. purpureus</i> KA281, NRPS (BAH68577)	116/207 (%56)
BR57-21		<i>S. albidus</i> , NRPS (BAH68629)	215/218 (%99)	DAWQFGFIN (asp=asn=glu=gln=aad)
BR57-19		<i>Hemiphyllocladactylus aurantiacus</i> DSM 785, NRPS (YP_001544801)	130/220 (%59)	Substratı tahmin edilemedi
<i>Streptomyces</i> sp. BS29	BS29-5	<i>Rhodococcus fascians</i> D188, NRPS (AET25251)	182/224 (%81)	DVWSVAMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. BS29	BS29-8	<i>S.nigrogriseolus</i> , NRPS (BAH68452)	156/217 (%72)	DAWQFGLIN (asp=asn=glu=gln=aad)
	BS29-7	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC 19860, NRPS (YP_004236113)	100/211 (%47)	DFWHFGQID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. BS32	BS32-3	<i>S. achromogenes</i> , TomA (ACN39014)	182/209 (%87)	AAISLSGSI (val=leu=ile=abu=iva)
	BS32-5	<i>S.atroolivaceus</i> , NRPS (WP_033302102.1)	185/200 (%93)	Substratı tahmin edilemedi
	BS32-10	<i>S.scabrisporus</i> , NRPS (WP_040877368.1)	157/198 (%79)	FSVAAYA (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. BS33	BS33-1	<i>Actinokineospora spheciospongiae</i> siderefor, (EWC59380.1)	137/203 (%67)	Substratı tahmin edilemedi
	BS33-2	<i>S. sp. PBH53</i> , bacillibactin (AKN68643.1)	144/196 (%73)	Substratı tahmin edilemedi
	BS33-4	<i>S. stramineus</i> , NRPS (BAH68592)	204/219 (%93)	DFWNVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BS33-7	<i>S.rubellomurinis</i> , NRPS (WP_045705748.1)	167/217 (%79)	DADDQTLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. BS39	BS39-1	<i>S.sp. CA18</i> , NRPS (AGS13566.1)	213/213 (%100)	DFWHFGQID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BS39-3	<i>S. sp. SS</i> , indigoidine (WP_017237530.1)	189/213 (%89)	DAWQFGLIN (asp=asn=glu=gln=aad)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolot	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. BS39	BS39-6	<i>S.sp.</i> BS29-5, NRPS (AFP49805.1)	214/214 (%100)	DVWSVAMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BS39-9	<i>S. sp.</i> 43-30-14, NRPS BAH68817.1	154/215 (%72)	DVWHISLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BS39-16	<i>S. marinus</i> , NRPS (BAI44085)	156/217 (%72)	DIWEVTADD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. BS40	BS40-4	<i>S. microspores</i> , NRPS, (BAH68451)	185/194 (%95)	DALWWGGVF (val=leu=ile=abu=iva)
	BS40-6	<i>S. rimosus</i> , NRPS (WP_030635683.1)	186/225 (%83)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BS40-8	<i>S. rubellomurinis</i> , NRPS (WP_045705748.1)	173/215 (%80)	DTEDLGLVD (asp=asn=glu=gln=aad)
	BS40-17	<i>S.cattleya</i> NRRL 8057, NRPS, (AEW95038.1)	151/204 (%74)	DLTKVGEVG (asp=asn=glu=gln=aad)
<i>Streptomyces</i> sp. BS44	BS44-1	<i>S. scabiei</i> , NRPS (WP_037699247.1)	195/205 (%95)	DVWHVGAVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BS44-3	<i>Myxococcus xanthus</i> , NRPS/PKS (CCA29203)	120/195 (%62)	Substratı tahmin edilemedi
	BS44-4	<i>S. griseus subsp. griseus</i> NBRC 13350, NRPS/PKS (YP_001828288)	179/200 (%90)	DILQLGLIW (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	BS44-8	<i>S.sp.</i> BA14, NRPS (AGS13534.1)	152/208 (%73)	DSALIAEVW (phe=trp=phg=tyr=bht)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. BS44	BS44-10	<i>S. sp.</i> OAct 113, NRPS (AFX82107)	131/202 (%65)	DAYWWGGVF (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
<i>Streptomyces</i> sp. BSH50	BSH50-1	<i>S. roseosporus</i> NRRL 11379, NRPS (ZP_04713303)	149/219 (%68)	DARSHGLVN (asp=asn=glu=gln=aad)
	BSH50-15	<i>S. sp.</i> e14, enterobactin (ZP_06710581)	179/209 (%86)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	BSH50-6	<i>S. macromomyceticus</i> , NRPS (BAH68554)	172/209 (%82)	Substratı tahmin edilemedi
	BSH50-14	<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331, NRPS (YP_004921076)	143/211 (%68)	Substratı tahmin edilemedi
	BSH50-19	<i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588, NRPS (YP_003123086)	91/203 (%45)	DLFNNALTY (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	BSH50-27	<i>S. hygrosopicus</i> ATCC53653, NRPS (ZP_07292125)	206/215 (%96)	Substratı tahmin edilemedi
	BSH50-42	<i>Actinomycete</i> GW31-48, NRPS (AEE69398)	132/207 (%64)	DAWTVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	BSH50-43	<i>Micromonospora sp.</i> ATCC 39149, NRPS (ZP_04608967)	172/210 (%82)	DVWHVSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. CA3	CA3-1	<i>S.sp.</i> NRRL S-515, NRPS (WP_030903327.1)	203/215 (%94)	DLAESGAVD (orn=lys=arg)
	CA3-3	<i>S. macrosporeus</i> , NRPS, BAH68572.1	209/218 (%96)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. CA3	CA3-9	<i>S.sp.</i> AR12, NRPS (AGS13624.1)	183/205 (%89)	DVWECGFIQ (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. CA11	CA11-1	<i>S. sp.</i> ID05-A0433, NRPS (BAH68899)	140/174 (%80)	DPYQIGTLF (val=leu=ile=abu=iva)
	CA11-3	<i>S.sp.</i> CA13, NRPS (AGS13571.1)	186/189 (%98)	Substratı tahmin edilemedi
	CA11-4	<i>S. anulatus</i> , NRPS (BAH68589.1)	136/206 (%66)	Substratı tahmin edilemedi
	CA11-16	<i>S. ipomoeae</i> 91-03, dimodular NRPS (EKX62555.1)	170/209 (%81)	DVWHVSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CA11-23	<i>S. scabiei</i> , NRPS (BAH68490)	132/202 (%65)	Substratı tahmin edilemedi
<i>Streptomyces</i> sp. CA12	CA12-1	<i>Frankia</i> sp. CcI3, NRPS (YP_481556)	147/213 (%69)	Substratı tahmin edilemedi
	CA12-13	<i>Streptomyces</i> sp. Sp080513SC-05, NRPS (BAI44097)	100/190 (%53)	Substratı tahmin edilemedi
	CA12-11	Uncultured soil bacterium, NRPS (ADK54819)	143/208 (%69)	DASTVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	CA12-17	<i>S. sp.</i> 307-9, triandamycin (ADC79642)	141/213 (%66)	Substratı tahmin edilemedi
<i>Streptomyces</i> sp. CA13	CA13-1	<i>S.sp.</i> CA18, NRPS (AGS13566.1)	213/213 (%100)	DFWHFGQID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. CA13	CA13-4	<i>S. sp.</i> ASH47, NRPS (AGS13607.1)	217/217 (%100)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	CA13-22	<i>S.sp.</i> CA11, NRPS (AGS13576.1)	186/189 (%98)	Substratı tahmin edilemedi
	CA13-23	<i>S. sp.</i> AR4, NRPS (AGS13631.1)	211/211 (%100)	DLYNMSLIW (cys)
	CA13-28	<i>S.sp.</i> BAH46-11, NRPS, (AFP49804.1)	156/216 (%72)	DVWHVSLID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CA13-29	<i>S. viridochromogenes</i> , NRPS (WP_048580739.1)	187/207 (%93)	DATKMGHVG (asp=asn=glu=gln=aad)
<i>Streptomyces</i> sp. CA16	CA16-3	<i>S. noursei</i> , NRPS (BAH68405)	118/221 (%53)	Substratı tahmin edilemedi
	CA16-7	<i>Streptomyces</i> sp. Sp080513SC-05, NRPS (BAI44096)	161/227 (%71)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CA16-12	<i>Myxococcus xanthus</i> , althiomycin (CCA29202)	140/220 (%64)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. CA17	CA17-3	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32, NRPS (YP_003770394)	157/217 (%72)	DLYNMSLIW (cys)
	CA17-2	<i>S. verticillus</i> , NRPS (AAG02359)	181/212 (%85)	DVWHISLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CA17-24	<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021, NRPS (YP_003339431)	149/214 (%70)	DLYNISMIW (cys)

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. CA18	CA18-1	<i>S.sp.</i> M-17, NRPS (ACM45801)	189/206 (%92)	Substratı tahmin edilemedi
	CA18-2	<i>S. sp.</i> ASH47, NRPS (AGS13607.1)	217/217 (%100)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	CA18-3	<i>S. sp.</i> CA13, NRPS (AGS13661.1)	213/213 (%100)	DFWHFGQID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CA18-5	<i>S. zinciresistens</i> K42 NRPS/PKS (ZP_08808566)	130/193 (%67)	Substratı tahmin edilemedi
	CA18-8	<i>S. sp.</i> CA19, NRPS (AGS13558.1)	194/194 (%100)	DAGMIGAVC (val=leu=ile=abu=iva)
	CA18-9	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877, NRPS (CAJ89363)	137/218 (%63)	DFWSVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CA18-11	<i>S. bikiniensis</i> , NRPS, (BAH68659)	160/209 (%77)	Substratı tahmin edilemedi
	CA18-15	<i>S. sp.</i> CA19, NRPS (AGS13560.1)	212/212 (%100)	DMFNFGVLW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. CA19	CA19-1	<i>S.sp.</i> AS40, NRPS (AGS13609.1)	215/215 (%100)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)
	CA19-3	<i>S.sp.</i> CA18, NRPS (AGS13562.1)	212/212 (%100)	DMFNFGVLW (cys)
	CA19-4	<i>Myxococcus fulvus</i> 124B02, NRPS (AKF82354.1)	128/218 (%59)	DIMFFAQVI (pro=pip)
	CA19-9	<i>S.sp.</i> CA18, NRPS (AGS13564.1)	194/194 (%100)	DAGMIGAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. CA19	CA19-11	<i>S.sp.</i> CA24, NRPS (AGS13666.1)	204/213 (%96)	DINYWGGIG (orn=lys=arg)
	CA19-16	<i>S. sp.</i> BS29-7, NRPS (AFP49764.1)	209/210 (%99)	DFWHFGQID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpğ=hpg)
	CA19-26	<i>S.sp.</i> NRRL S-920, NRPS (WP_037895867.1)	170/201 (%85)	DASTVAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
<i>Streptomyces</i> sp. CA21	CA21-3	<i>Micromonospora</i> sp. ATCC 39149, NRPS (ZP_04604018)	149/211 (%71)	DLFNCALTY (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
	CA21-4	<i>S.propurpuratus</i> , NRPS (BAH68540)	78/217 (%36)	Substratı tahmin edilemedi
	CA21-17	<i>S. sp.</i> C NQ-418, NRPS (AFP87519)	160/201 (%80)	Substratı tahmin edilemedi
	CA21-27	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110, NRPS (YP_006263979)	143/212 (%67)	DLPKVAEVG (asp=asn=glu=gln=aad)
<i>Streptomyces</i> sp. CA24	CA24-1	<i>S. lividans</i> , CDA (WP_016326485.1)	168/202 (%83)	DLTKIGAVN (asp=asn=glu=gln=aad)
	CA24-6	<i>S. sp.</i> ID05-A0109, NRPS BAH68862.1	203/210 (%97)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpğ=hpg)
	CA24-12	<i>S.sp.</i> AS29, NRPS (AGS13621.1)	208/215 (%97)	DINYWGGIG (orn=lys=arg)
	CA24-17	<i>S. sp.</i> NBRC, NRPS (BAH68426.1)	198/202 (%98)	DILQLGLIW (gly=ala=val=leu=ile=abu=iva)
<i>Streptomyces</i> sp. CA28	CA28-1	<i>S. sp.</i> M-17, NRPS (ACM4580)	188/204 (%92)	Substratı tahmin edilemedi

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. CA28	CA28-11	<i>S. vinaceusdrappus</i> , NRPS (AEF16059)	119/196 (%61)	DMYNLGLIH (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. CAH29	CAH29-10	<i>Lyngbya majuscula</i> , lyngbyatoxin (AAT12283)	138/209 (%66)	DGWTISGVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	CAH29-18	<i>S. kitasatoensis</i> , NRPS (BAH68475)	205/221 (%93)	DFWNVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CAH29-9	<i>Kribbella flavida</i> DSM 17836, NRPS (YP_003381971)	121/213 (%57)	Substratı tahmin edilemedi
	CAH29-13	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32, NRPS (YP_003770394)	159/219 (%73)	DLYNMSLIW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. CAH33	CAH33-1	<i>S. aurantiacus</i> , Mycosubtilin (WP_016639378.1)	211/214 (%99)	DINYWGGIG (orn=lys=arg)
	CAH33-12	<i>Catenulispora acidiphila</i> , NRPS (WP_015794870.1)	187/203 (%92)	Substratı tahmin edilemedi
	CAH33-6	<i>S. sp.</i> CNQ431, gramicidin (WP_033946727.1)	114/217 (%53)	DMPKAGEVG (asp=asn=glu=gln=aad)
	CAH33-9	<i>S. violaceorubidus</i> , NRPS (BAH68735)	128/208 (%62)	DFWSVGIVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CAH33-18	<i>S. marinus</i> , NRPS (BAI44084)	151/207 (%73)	DFFSVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. CS38	CS38-1	<i>S. ochraceiscleroticus</i> , bacillibactin (WP_031061687.1)	134/198 (%71)	Substratı tahmin edilemedi

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. CS38	CS38-2	<i>S.sp.</i> NRRL S-920, NRPS (WP_037895867.1)	185/205 (%90)	DASTIAAVC (phe=trp=phg=tyr=bht)
	CS38-6	<i>S.iranensis</i> , NRPS (CDR08916.1)	166/203 (%82)	DMTKVGEVG (asp=asn=glu=gln=aad)
	CS38-10	<i>S.aurantiacus</i> JA 4570, gramicidin (EPH46596.1)	176/211 (%83)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CS38-14	<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928 (YP_003116982)	188/203 (%93)	Substratı tahmin edilemedi
<i>Streptomyces</i> sp. CS41	CS41-2	<i>S.griseus</i> , NRPS (BAH68699)	116/209 (%56)	DAWVVAAVM (phe=trp=phg=tyr=bht)
	CS41-5	<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004, NRPS (YP_003468051)	94/235 (%40)	Substratı tahmin edilemedi
	CS41-6	<i>S.endus</i> , NRPS (BAH68616)	157/212 (%74)	DLYNLSLIW (cys)
	CS41-12	<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i> , NRPS (ZP_03697987)	122/219 (%56)	DLFNLSMIW (cys)
	CS41-32	<i>S.venezuelae</i> ATCC 10712, bacillibactin (CCA60345)	191/232 (%82)	DVWHFSLVD (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. CS42	CS42-1	<i>S.violens</i> , NRPS (WP_030263264.1)	159/218 (%73)	Substratı tahmin edilemedi
	CS42-2	<i>Saccharomonospora cyanea</i> , gramicidin (WP_005455422.1)	116/209 (%56)	Substratı tahmin edilemedi
	CS42-4	<i>S.coeruleoprunus</i> , NRPS (BAH68712)	208/222 (%94)	DMENLGLIN (orn=lys=arg)

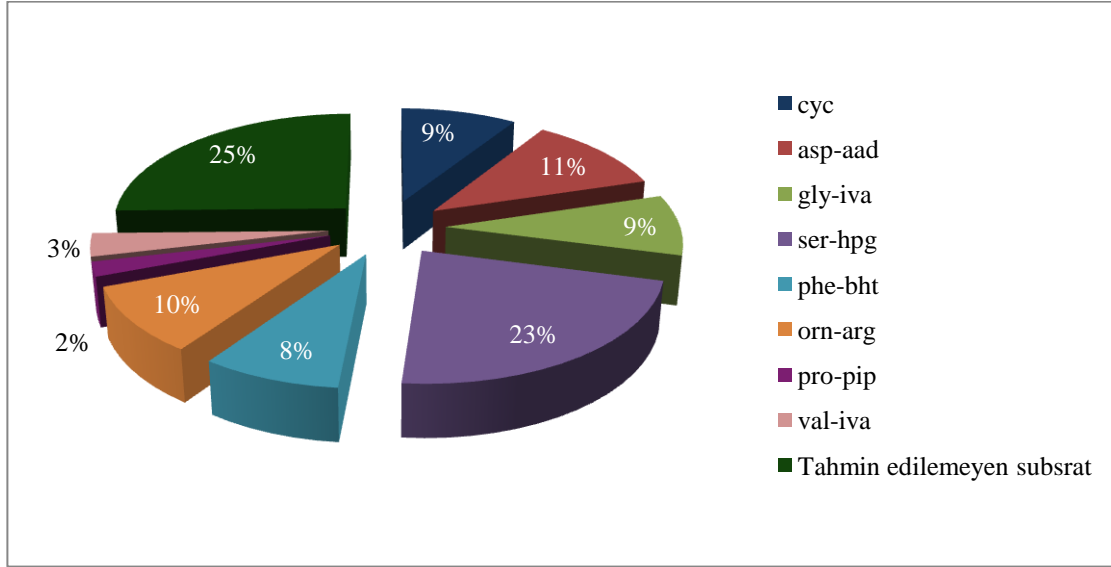
Çizelge 4.1. Dejenere primerler ile elde edilen NRPS A domainleri ve biyoinformatik incelemeleri (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (GenBank giriş no)	Benzerlik (%)	Amino asit substratına bağlanma bölgesi (bağlandığı amino asit)
<i>Streptomyces</i> sp. CS42	CS42-12	<i>S. sp.</i> NRRL S-87, NRPS (WP_030202424.1)	199/210 (%95)	DLYNLSLVW (cys)
<i>Streptomyces</i> sp. CS43	CS43-1	<i>S. cinnamoneus subsp. albosporus</i> , NRPS (AB432722)	193/212 (%91)	DFWNVGMVH (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
	CS43-2	<i>S. netropsis</i> , NRPS (BAH68437)	172/203 (%85)	DALLVGAVA (phe=trp=phg=tyr=bht)
	CS43-3	<i>S.sp.</i> CA16-3, NRPS (AFP49777.1)	206/209 (%99)	Substratı tahmin edilemedi
	CS43-7	<i>S.sp.</i> CA16-12, NRPS (AFP49779.1)	207/209 (%99)	Substratı tahmin edilemedi
	CS43-22	<i>Myxococcus xanthus</i> , NRPS/PKS (CCA29203)	149/221 (%67)	DVWHFSLID (ser=thr=ser-thr=dht=dhpg=dpg=hpg)
<i>Streptomyces</i> sp. CS44	CS44-4	<i>S.sp.</i> BA14, NRPS (AGS13536.1)	199/206 (%97)	Substratı tahmin edilemedi
	CS44-16	<i>S.sp.</i> NRRL S-813, NRPS (WP_030173575.1)	169/240 (%70)	Substratı tahmin edilemedi

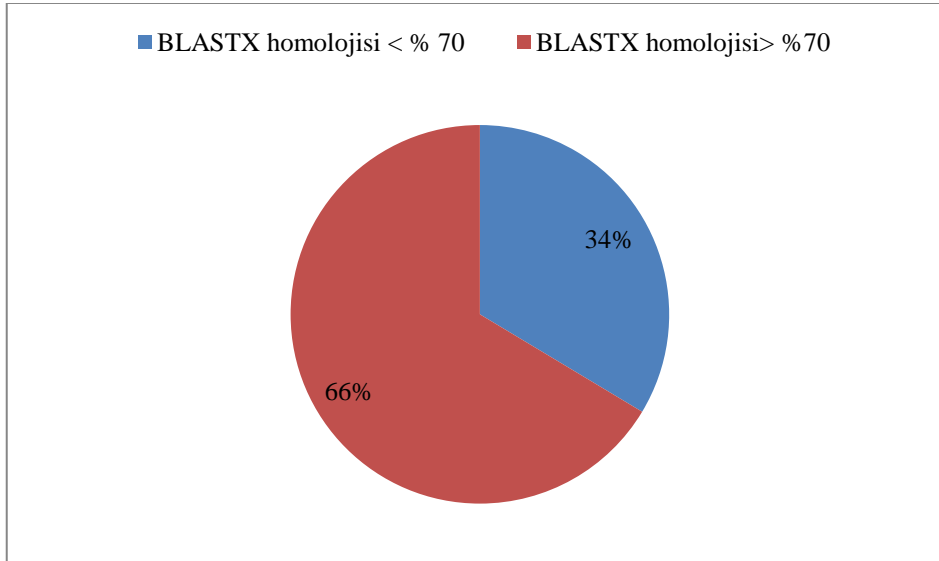
Şekil 4.17'de izolatlara ait A domainlerinin bağlanma paketlerinin program tarafından tahmin edilen substratlar ile bunların yüzdeleri gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde A domain dizilimlerinin en yüksek oranının (%25), bir bağlanma paketine sahip olup substratları tahmin edilmeyen klonların oluşturduğu tespit edildi. Bunu %23 oranıyla alifatik yan zincir aminoasitleri (Ser/Thr/Dhpg/Hpgi) izlemektedir. En az oranda ise Pro/pip aminoasitlerinin substrat olarak kullanıldığı program tarafından tahmin edildi. Ayrıca

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

BLASTX analizleri sonucunda izolatlarımıza ait A domain dizilimlerinin %34'nün NCBI veri tabanında bilinen dizilimlerle %70'in altından benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.18.).



Şekil 4.17. İzolatların A domain çeşitliliği



Şekil 4.18. İzolatların A domaini BLASTX analizleri

4.1.5.2. PKS-I KS Domainlerinin Biyoinformatik Analizleri

PCR optimizasyonları sonucunda 65 *Streptomyces* izolatının 54'ünde pütatif PKS-I KS domain ürünü elde edildi. Sekans analizleri sonucunda doğru amplikon büyüklüğüne sahip (yaklaşık 1200 bp) olan 3 izolattan (AA53, BA3, CS38) kurulan kütüphanelerden elde edilen klonların PKS-I dışında başka genlere ait fragmentler verdiği görüldü. Geriye kalan 51 izolatın amplikonlarının spesifik olduğu ve modüler poliketid sentaz genlerinin domainlerini işaret ettikleri görüldü. Bunlardan ancak 36'sının kütüphaneleri tamamlandı. Geriye kalan diğer kütüphanelerde sekanslar bozuk olduğu için bu klonlar gen bankasına sunulmadı ve bunlara tabloda yer verilmedi. PKS-I mini gen kütüphanelerinden rastgele seçilen klonlardan plazmit izolasyonları yapıldı. İzole edilen rekombinant plazmitler EcoRI, PstI ve MvaI restriksiyon enzim kesim profillere göre DNA dizi analizi öncesinde gruplandırıldı. Bu gruplardan temsili klonların DNA dizi analizleri gerçekleştirildi.

36 izolata ait KS domaini DNA fragmanlerinin BLASTX analizleri Çizelge 4.2'de görülmektedir. Biyoinformatik analizler sonucunda izolatlara ait KS domaini çeşitliliği ve PK bileşik sentezleme potansiyelleri değerlendirildi. AA50-1 (*olendomycin*), BA11-14, (*Ann4*), BA12-4 (*mycocerosic asit*), BSH50-12 (*erythromycin*), CA19-8 (*chlorothricin*) ve CS43-2 (*nystatin*) klonlarına ait KS domain dizilimleri bilinen gen kümeleri ile homoloji gösterdiği tespit edildi.

KS domaini BLASTX analizleri incelendiğinde klonların yarısından fazlasının homoloji oranının %70'in altında olduğu görüldü (Şekil 4.19).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.2. Dejenere primerler ile elde edilen PKS-I KS domainleri ve biyoinformatik incelemeleri.

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (Genbank giriş no)	Benzerlik (%)
<i>Streptomyces</i> sp. AA50	AA50-1	<i>S. himastatinicus</i> , oleandomycin (EFL23221.1)	237/380 (%62)
<i>Streptomyces</i> sp. AA58	AA58-12	<i>S. bingchenggensis</i> , PKS-I (WP_014174583.1)	237/401(%59)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH61	AAH61-6	<i>S. avermitilis</i> , PKS-I (BAB69304.1)	331/385 (%86)
	AAH61-12	<i>S. antibioticus</i> , PKS-I (AAZ77693.1)	233/410 (%57)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH67	AAH67-1	<i>S. sp.</i> e14, PKS-I (WP_009191175.1)	257/396 (%65)
<i>Streptomyces</i> sp. AAH68	AAH68-3	<i>S. sp.</i> FXJ7.023, LobS4 (AGC09499.1)	215/401 (%54)
	AAH68-6	<i>S. murayamaensis</i> , LanU like protein (AAO65353)	70/114 (%61)
<i>Streptomyces</i> sp. AR3	AR3-1	<i>S.sp.</i> PRh5, PKS- I (WP_037963242.1)	344/379 (%91)
	AR3-9	<i>S.ruber</i> , PKS-I (WP_031192560.1)	238/340 (%70)
	AR3-13	<i>S. thioluteus</i> , PKS I (CAE02606)	293/419 (%70)

Çizelge 4.2. Dejenere primerler ile elde edilen PKS-I KS domainleri ve biyoinformatik incelemeleri. (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (Genbank giriş no)	Benzerlik (%)
<i>Streptomyces</i> sp. AR6	AR6-2	<i>S. sp.</i> ID05-A0098, PKS- I (BAH67693)	163/274 (%59)
	AR6-3	<i>S. zinciresistens</i> K42, PKS-I (ZP_08801518)	239/271(%88)
	AR6-8	<i>S. orinoci</i> , NorA, (CAO85896)	165/253(%65)
	AR-10	<i>S.ruber</i> , PKS-I (WP_031192831.1)	170/226 (%75)
<i>Streptomyces</i> sp. AR17	AR17-1	<i>S. sp.</i> ID05-A0005, PKS- I (BAH67519)	76/133 (%57)
	AR17-9	<i>S. lividans</i> TK24, PKS-I (ZP_06527466)	35/63 (%56)
<i>Streptomyces</i> sp. AS28	AS28-2	<i>S.mycarofaciens</i> , PKS-I (BAH67156.1)	206/255 (%81)
<i>Streptomyces</i> sp. AS29	AS29-2	<i>S. sp.</i> FxanaA7, PKS I (WP_045558330.1)	239/328 (%73)
	AS29-3	<i>S. avermitilis</i> MA 4680, PKS- I (NP_824074)	205/338 (%60)
<i>Streptomyces</i> sp. AS31	AS31-1	<i>S. violaceusniger</i> Tu 4113, PKS- I (YP_004817597)	170/272(%63)
	AS31-11	<i>Pseudonocardia</i> sp. P1, PKS- I (ZP_08124018)	212/312(%68)
<i>Streptomyces</i> sp. AS40	AS40-4	<i>S. auratus</i> , PKS -I (WP_006608277.1)	245/370 (%66)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.2. Dejenere primerler ile elde edilen PKS-I KS domainleri ve biyoinformatik incelemeleri. (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (Genbank giriş no)	Benzerlik (%)
<i>Streptomyces</i> sp. BA2	BA2-2	<i>S. sp.</i> NRRL 11266, PKS -I (BAE93728)	280/424 (%66)
<i>Streptomyces</i> sp. BA11	BA11-1	<i>S. aizunensis</i> , PKS I (AAX98190)	234/262 (%89)
	BA11-10	<i>S. sp.</i> Mg1, PKS I (ZP_05000638)	201/240 (%84)
	BA11-14	<i>S. calvus</i> , Ann4 (AGY30676.1)	321/354 (%91)
<i>Streptomyces</i> sp. BA12	BA12-1	<i>S. avermitilis</i> , PKS- I (WP_010982990.1)	287/389 (%74)
	BA12-4	<i>S. leewenhoekii</i> , mycocerosic acid (CQR60908.1)	314/386 (%81)
<i>Streptomyces</i> sp. BA14	BA14-1	<i>S. violaceusniger</i> Tu 4113, PKS-I (YP_004814091)	215/353 (%61)
	BA14-3	<i>S. sp.</i> CNS654 , PKS-I (WP_032769686.1)	280/379 (%74)
<i>Streptomyces</i> sp. BAH26	BAH26-4	<i>S. varsovienses</i> , PKS-I (WP_048832936.1)	227/397 (%57)
<i>Streptomyces</i> sp. BS29	BS29-8	<i>S. hygrosopicus</i> subsp. PKS I ossamyceticus (BAH67054)	109/194 (%56)
<i>Streptomyces</i> sp. BS32	BS32-2	<i>S. sp.</i> NRRL S-325, PKS-I (WP_037831754.1)	322/347 (%93)
<i>Streptomyces</i> sp. BS33	BS33-7	<i>S. sp.</i> ID05-A0002, PKS -I (BAH67501)	46/52 (%88)

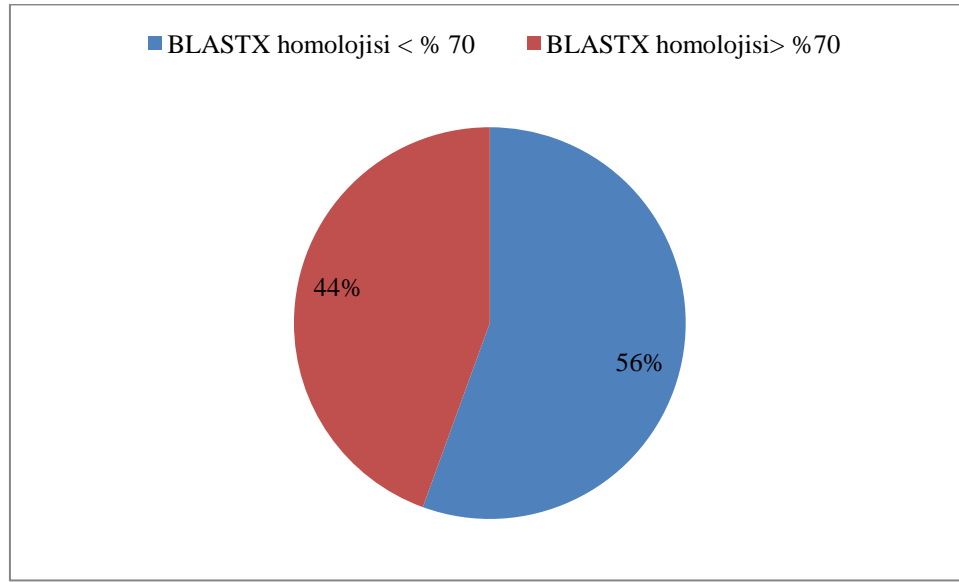
Çizelge 4.2. Dejenere primerler ile elde edilen PKS-I KS domainleri ve biyoinformatik incelemeleri. (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (Genbank giriş no)	Benzerlik (%)
<i>Streptomyces</i> sp. BS40	BS40-4	<i>S. hygroscopicus</i> ATCC53653, oleandomycin (EFL23221.1)	281/374 (%75)
<i>Streptomyces</i> sp. BSH50	BSH50-1	<i>S. viridochromogenes</i> DSM 40736, PKS -I (ZP_07301993)	171/244 (%70)
	BSH50-12	<i>S. auranticus</i> , erythronolide (WP_016638481.1)	321/390 (%82)
<i>Streptomyces</i> sp. CA3	CA3-4	<i>S. cattleya</i> NRRL 8057, PKS -I (CCB78447)	179/268 (%67)
<i>Streptomyces</i> sp. CA12	CA12-2	<i>S. sp.</i> ID05-A0002, PKS I (BAH67500)	138/230 (%60)
<i>Streptomyces</i> sp. CA13	CA13-1	<i>S. sp.</i> NRRL F-5140 , PKS- I (WP_030956855.1)	311/368 (%85)
<i>Streptomyces</i> sp. CA14	CA14-2	<i>S. afghaniensis</i> , erythronolide (WP_020275884.1)	258/371 (%70)
<i>Streptomyces</i> sp. CA16	CA16-9	<i>S. avermitilis</i> , PKS- I (WP_037653194.1)	336/409 (%82)
<i>Streptomyces</i> sp. CA17	CA17-1	<i>S. himastatinicus</i> ATCC 53653, oleandomycin (EFL23221.1)	267/355 (%75)
<i>Streptomyces</i> sp. CA18	CA18-11	<i>S. davawensis</i> , PKS-I (WP_015656913.1)	186/377 (%49)
<i>Streptomyces</i> sp. CA19	CA19-2	<i>S. davawensis</i> , PKS-I (WP_015656913.1)	186/377 (%49)
	CA19-8	<i>S. antibioticus</i> , ChlB1 (AAZ77673)	111/202 (%55)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge 4.2. Dejenere primerler ile elde edilen PKS-I KS domainleri ve biyoinformatik incelemeleri. (devamı)

İzolat	Klon adı	BLASTX Sonuçları (Genbank giriş no)	Benzerlik (%)
<i>Streptomyces</i> sp. CA24	CA24-8	<i>S. sp.</i> NRRL F-4835 (WP_037822853.1)	359/380 (%94)
<i>Streptomyces</i> sp. CA28	CA28-8	<i>Acetobacteraceae bacterium</i> AT-5844, PKS- I (ZP_09396779)	16/32 (%50)
<i>Streptomyces</i> sp. CAH29	CAH29-20	<i>S. himastatinicus</i> ATCC 53653, oleandomycin (EFL23221.1)	274/364 (%75)
<i>Streptomyces</i> sp. CS41	CS41-2	<i>S. bikiniensis</i> , PKS-I (AGO59063.1)	211/400 (%53)
	CS41-19	<i>S. sp.</i> 307-9, TamAI (ADC79637)	289/358 (%81)
<i>Streptomyces</i> sp. CS42	CS42-1	<i>S. pristinaespiralis</i> ATCC 25486, PKS- I (ZP_06909288)	138/161 (%86)
<i>Streptomyces</i> sp. CS43	CS43-2	<i>S. noursei</i> ATCC 11455, NysB (AF263912)	143/228 (%63)
	CS43-3	<i>S. netropsis</i> , PKS-I (BAH67483)	234/240 (%98)
	CS43-16	<i>S. avermitilis</i> , PKS- I (WP_037653194.1)	320/391 (%82)



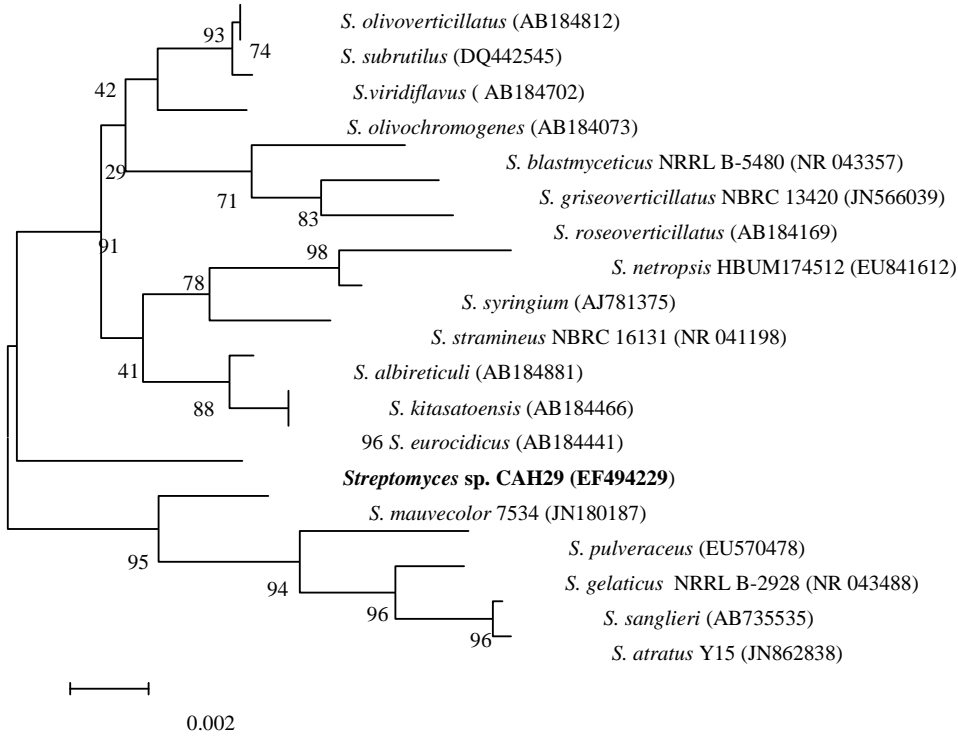
Şekil 4.19. İzolatların KS domain BLASTX analizleri

4.1.6. *Streptomyces* sp. CAH29 İzolatının Biyoaktif Doğal Ürünün Kimyasal Yapısının Aydınlatılması

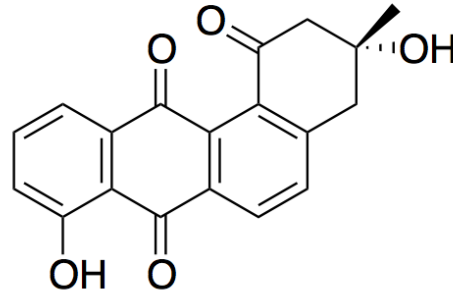
Yüksek oranda ve geniş yelpazede antimikrobiyal aktiviteye sahip (Yılmaz ve ark. 2008), NRPS domain çeşitliliği yüksek (Çizelge 4.1.) ve 16S rRNA genlerine göre (Şekil 4.20) yeni olabilecek *Streptomyces* sp. CAH29 izolatının kültür ekstraktlarında kimyasal tarama yapıldı. Grubumuz tarafından daha önce bu izolatın ekstraktlarında kinon fonksiyonel gruplu biyoaktif bir bileşiğe rastlanmıştı (Özakın 2010). Bu bileşiğin kimyasal yapısının analizi ve farklı biyolojik aktivite testleri için saflaştırma çalışmalarına devam edildi. Saflaştırma çalışmaları sonucunda 1,8 mg saf madde elde edildi. MS ve NMR spektroskopileri yardımıyla yapılan yapı aydınlatma çalışmaları ile bileşiğin aromatik poliketidleri içeren ‘angucycline’ grubuna dahil *tetrangomycin* (C₁₉H₁₄O₅, M+H 323,0919) olduğu tespit edildi (Şekil 4.21).

¹H NMR spekturumu sonucunda 12.27 (s, 1H), 8.34 (d, 1H, J=7.8 z), 8.00 (s, 1H), 7.70-7.67 (m, 2H), 7.58 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.24, 3.19 (s, 2H), 3.15 (d, 1H, J = 14.4 Hz), 3.02 (d, 1H, J = 14.1 Hz), 1.49 sinyalleri tespit edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA



Şekil 4.20. *Streptomyces* sp. CAH29 izolatını filogenetik ağacı (Ozakin ve ark. 2015)



Şekil 4.21. *Tetrangomycin*'in kimyasal yapısı

Tetrangomycin'in ilk kez 1966 yılında *Streptomyces rimosus*'tan izole edildiği rapor edilmiştir (Dann ve ark. 1965). Bileşik PKS-II gen kümesi tarafından sentezlenmekte olup şimdiye kadar çeşitli *Streptomyces* türlerinden farklı birçok türevleri izole edilmiştir (Shaaban ve ark. 2011).

4.1.7. *Tetrangomycin*'in Biyolojik Aktivitesi

4.1.7.1 *Tetrangomycin*'in Antimikrobiyal Aktivitesi

Streptomyces sp. CAH29 izolatından saflaştırılan *tetrangomycin*'in yanısıra ham etilasetat ekstraktının çeşitli patojen test mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu tespit edildi (Çizelge 4.3). Ham ekstraktın patojen mikroorganizmalar üzerine geniş ölçekte inhibisyon etkisinin olduğu gözlemlendi. *C.albicans*'a karşı 30 mm'lik maksimum inhibisyon zonuna sahip olduğu belirlendi. Buna karşın Gram (-) patojenlere karşı herhangi bir inhibisyon etkisi tespit edilemedi. En önemli sonuçlardan bir diğeri ise ham ekstrakt içinde MRSA ve VRE gibi antibiyotik dirençli patojenlerin büyümesini inhibe eden metabolitlerin bulunduğu gözlenmesiydi.

Şekil 4.22'de görüldüğü üzere 50 µg *tetrangomycin*'in özellikle Gram (+) patojenler *S. aureus*, *S.pyogenes* ve antibiyotik dirençli MRSA hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği görüldü.

Çizelge 4.3. Antimikrobiyal aktivite sonuçları

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zon çapı (mm) (Ham ekstrakt/ <i>Tetrangomycin</i>)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	-/-
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	26/14
<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	28/10
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-/-
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	30/-
<i>Methicillin</i> dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA, Hastane izolatu)	22/12
<i>Vancomycin</i> dirençli Enterococcus (VRE, Hastane izolatu)	12/-
<i>C. albicans</i> (Hastane izolatu)	12/8

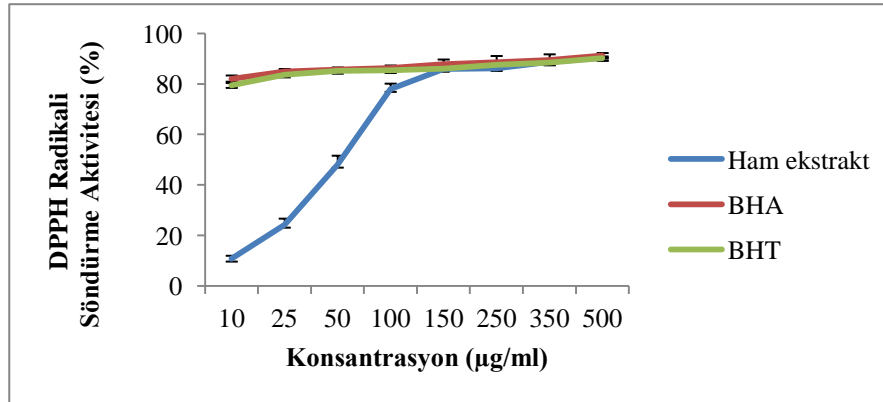


Şekil 4.22. *Tetrangomycin*'in MRSA üzerine inhibisyon etkisi

Tetrangomycin'in antibakteriyel aktivitesi dışında hastane izolatu *Candida albicans*'a karşı 8 mm'lik inhibisyon zonu ile antifungal aktiviteye de sahip olduğu görüldü.

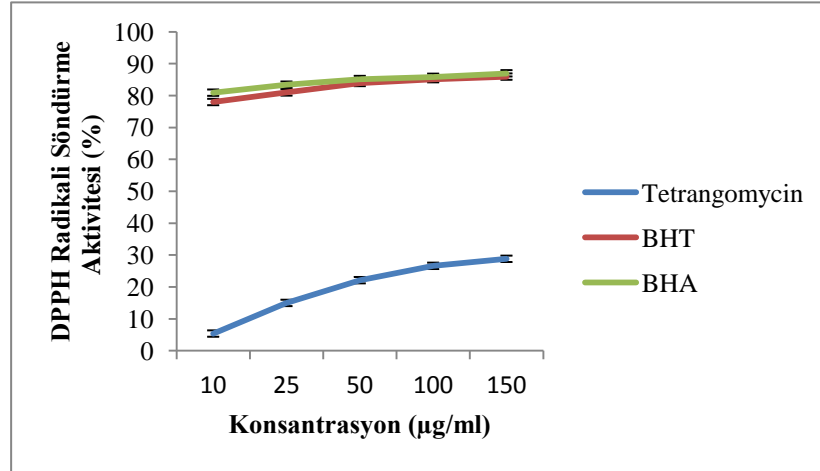
4.1.7.2. *Tetrangomycin*'in ve CAH29 Ham ekstraktının DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Streptomyces sp. CAH29 izolatının kültür ortamından elde edilen etil asetat ekstraktı ve *tetrangomycin*'in DPPH radikalini söndürme aktivitesine bağlı olarak antioksidant aktivitesi test edildi. Şekil 4.23'te görüldüğü gibi ham ekstraktın antioksidant aktivitesinin madde konsantrasyon artışına bağlı olarak yükseldiği tespit edildi. Ayrıca ham ekstraktın yüksek konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve BHA gibi pozitif kontrollerle kıyaslandığında % 80'lerin üzerinde aktivite gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.23. Ham ekstraktın konsantrasyonuna bağlı DPPH söndürme aktivitesi

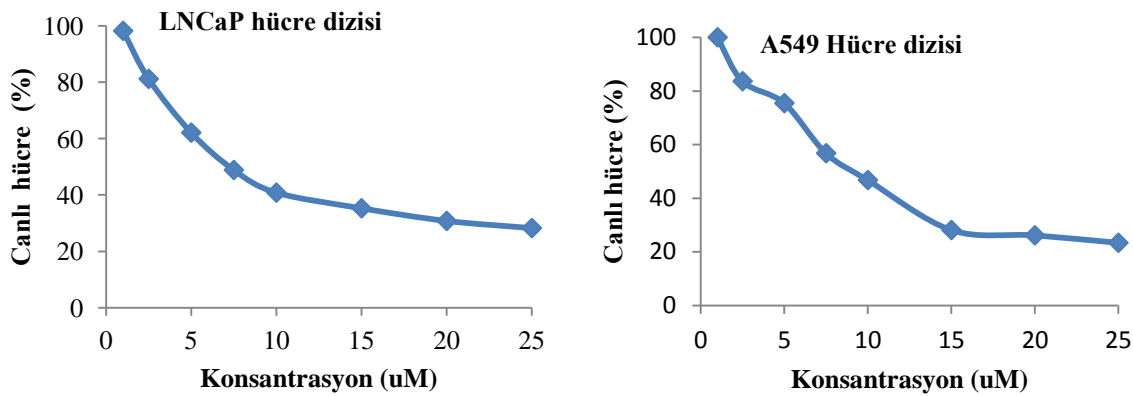
Tetrangomycin'in DPPH söndürme aktivitesi incelendiğinde bileşiğin antioksidant aktivitesinin ham ekstrakt ve pozitif kontrollere göre düşük olduğu görüldü (Şekil 4.24). *Tetrangomycin*'in artan madde konsantrasyonuna rağmen en yüksek aktivitesinin %30'ları geçmediği görüldü. Bu sebepten bileşiğin düşük düzeyde antioksidant aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.



Şekil 4.24. *Tetrangomycin* molekülünün konsantrasyonuna bağlı DPPH söndürme aktivitesi

4.1.7.3. *Tetrangomycin*'in Sitotoksik Aktivitesi

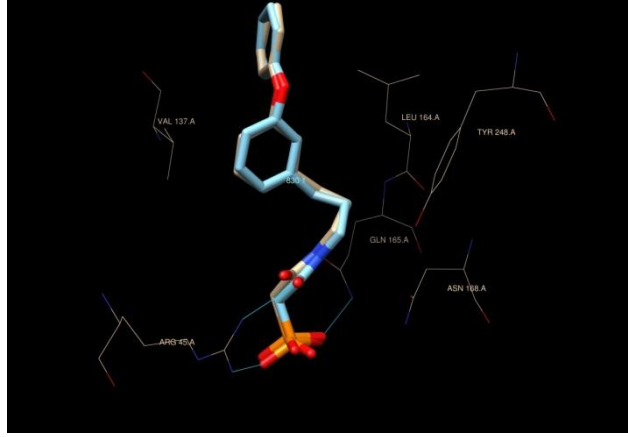
Sitotoksitite testi için farklı morfoloji, genom özelliği ve orjinden elde edilen iki farklı kanser hücre dizileri kullanıldı. Bunlar insan prostat ve akciğer kanseri hücre dizileri LNCaP ve A549'dur. Yapılan deneyler sonucunda *tetrangomycin*'in her iki hücre dizisi üzerine sitotoksik etkisi olduğu tespit edildi. Şekil 4.25'te görüldüğü gibi bileşiğin LNCaP hücreleri üzerine IC_{50} değerinin $4,82 \mu M$ olduğu görüldü. Diğer hücre dizisi A549 için ise IC_{50} değerinin $4,93 \mu M$ olduğu tespit edildi.



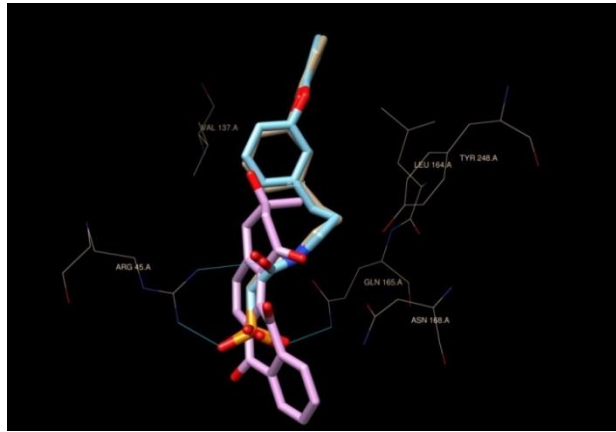
Şekil 4.25. *Tetrangomycin*'in LNCaP ve A549 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi

4.1.7.4. *Tetrangomycin*'in Docking Analizi

Tetrangomycin'in MRSA'da *staphyloxanthin* sentezini inhibe ettiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Sakai ve ark. 2012). Bu inhibisyon mekanizmasının detayları tam olarak bilinmemektedir. Dehidrosqualen sentaz (CrtM) enziminin *staphyloxanthin* biyosentezinin ilk aşamasındaki enzim olması ve metabolik yolakta hız sınırlayıcı basamakta olmasından dolayı *tetrangomycin* ile etkileşimi docking analizleri ile incelendi. CrtM enziminin spesifik inhibitörü olan 830 bileşiğinin (dipotasyum 2-oko-2-[[3-(3-fenoksifenil) propil] amino}etil fosfonat) docking analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanıldı. CrtM ile etkileşimi Şekil 4.26'da görülmektedir. 830 bileşiğinin fosfat grubunun CrtM'in aktif merkezindeki Arg⁴⁵, Gln¹⁶⁵ ve Asn¹⁶⁸ ile hidrojen bağı ile etkileşim içinde olduğu tespit edildi. Ayrıca kontrolün hem terminal hem de ikincil aromatik halkalarının Leu¹⁶⁴ ve Val¹³⁷ ile π /CH etkileşiminde olduğu gözlemlendi. Bu etkileşimlere ek olarak 830 bileşiğinin -CH₂CH₂CH₂- grubu Tyr²⁴⁸'in aromatik halkası ile hidrofobik etkileşimde olduğu görüldü. *Tetrangomycin*'in karbonil gruplarının da Arg⁴⁵ ile hidrojen bağı oluşturabildiği tespit edildi (Şekil 4. 27). Bunun dışında metil grubunun Tyr²⁴⁸ ve Leu¹⁶⁴ ile hidrofobik etkileşim içinde olduğu görüldü. Docking skoları çizelge 4.4'te görülmektedir. Her iki ligandın (830 ve *tetrangomycin*) elektrostatik kuvvetleri benzerken, van der Waals etkileşimlerinde ise *tetrangomycin*'in 830'a yakın değerlerde etki gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.26. 830'un CrtM ile etkileşimi



Şekil 4.27. Tetrangomycin ve 830'un CrtM ile etkileşimi

Çizelge 4.4. Ligandların docking skorları

Etkileşim	Ligandların Docking Skoru	
	'830' (pozitif kontrol)	Tetrangomycin
Toplam	-49,55	-33,71
Van der Walls	-46,96	-30,93
Elektrostatik	-2,59	-2,78

4.1.8. *Salinispora* İzolatlarının Doğal Ürün Biyosentez Gen Kümelerinin Biyoinformatik Programlarda İncelenmesi

Genom dizilimi bilinen *Salinispora* izolatlarının sahip olduğu doğal ürün gen kümeleri ‘antiSMASH’ ve ‘NapDOS’ biyoinformatik programları ile analiz edildi. ‘antiSMASH’ izolatların sahip olduğu, NRPS, PKS (I-II-II), terpen, lantibiyotik ve indol gibi farklı doğal ürün biyosentez gen kümelerinin tespit edilmesinde kullanılırken ‘NapDOS’, sadece izolatların genomlarında NRPS ve PKS gen kümelerindeki domainlerin tespitinde kullanılmaktadır. ‘antiSMASH’ analizleri sonucunda doğal ürün gen kümeleri ile ilişkili biyosentetik yolak sayısı ve çeşidi belirlendi. İzolatlara ait yolak çeşitliliği incelendiğinde programca pütatif ve diğerleri olarak sınıflandırılanlar dışında bilinen farklı doğal ürün sınıflarına ait gen kümeleri tahmin edildi. Bakterisin, bütirolakton, terpen ve aminoglikozit (Amg) gen kümeleri bunlardan bazılarıdır.

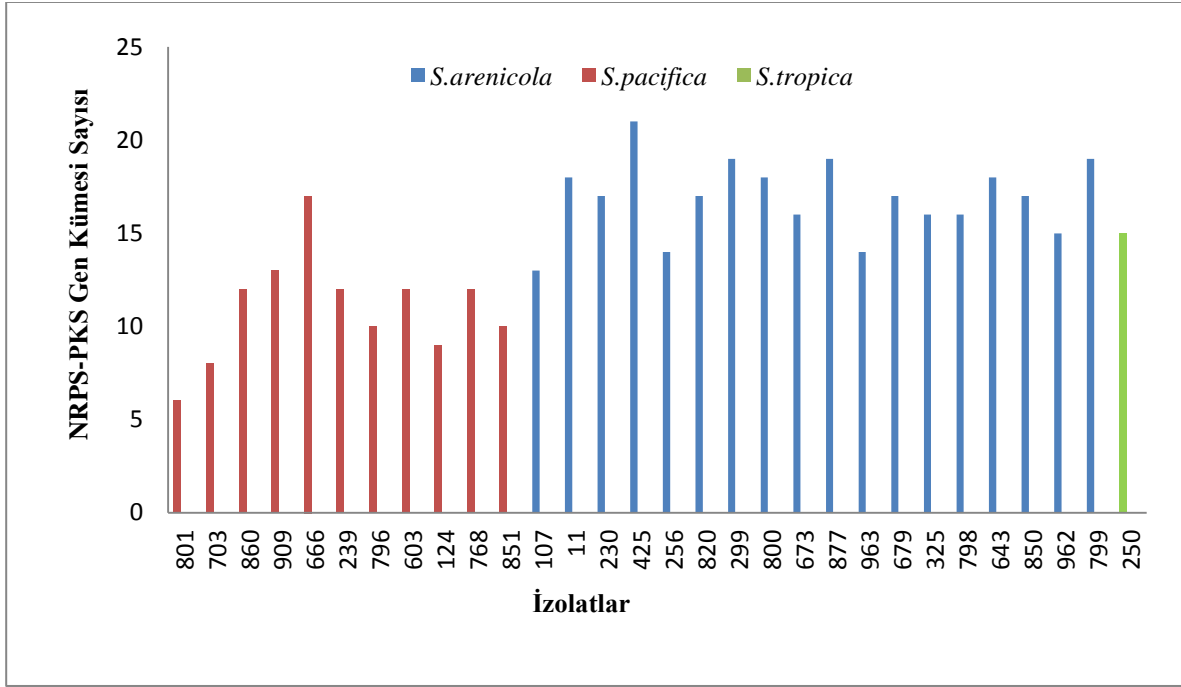
Şekil 4.28’de görüldüğü gibi izolatlar içinde maksimum sayıda biyosentetik yolak *S. arenicola* CNH877’de, en az sayıda yolak ise *S. pacifica* CNS801’de tespit edildi. *S. arenicola* CNR107, CNS673, CNS325, CNY230, CNR425, CNS820, CNH962, CNH963, CNY299 izolatu genomlarında şeker üniteli (oligo) NRPS ve PKS yolakları tespit edildi. Benzer şekilde şeker üniteli yolaklardan lantibiyotik (Lan)-PKS-NRPS genlerine *S. arenicola* CNY011, CNH643 ve CNT850 izolatlarının genomunda rastlandı. PKS-II gen kümesinin sayıca en fazla *S. pacifica* CNT851 ve CNT796 izolatlarında olduğu, PKS-III gen kümelerini kodlayan genlerin ise tüm izolatların genomunda kodlandığı ‘antiSMASH’ analizleri sonucunda ortaya konuldu. Bunun yanı sıra izolatların yaklaşık %98’in demir şelasyonundan sorumlu siderefor biyosentez gen kümelerine sahip oldukları görüldü. *S. pacifica* CNS801, CNT603, CNT124 ve *S. tropica* CNT250 dışındaki tüm izolatların lantibiyotik sentezleme potansiyeline sahip olduğu gözlemlendi.

İzolat	NRPS	PKS-I	PKS-II	PKS-III	NRPS-PKS-I	Bakteriosin	İndol	Lan	Lan-NRPS	Lan-PKS-I	Sid	Ang	Terpen	Terpen-Lan	Biotroloktan	Phtatif	Dğer	Terpen-Lan-Sid	Lan-PKS-NRPS	Amg-NRPS-PKS-Lan	Oligo-PKS-I	Toplam
801	1	0	2	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	21	0	0	0	0	0	33
703	3	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1	0	0	0	0	41
860	4	1	2	1	3	1	1	1	1	0	1	1	2	0	1	18	2	0	0	0	0	40
909	4	6	2	1	0	1	0	1	1	2	0	1	2	0	1	22	2	1	1	0	0	48
666	4	10	2	1	0	2	0	2	1	1	0	1	2	0	0	19	4	0	1	0	0	50
239	4	4	2	1	1	2	0	1	1	1	0	1	1	0	1	23	2	1	2	0	0	48
796	2	4	3	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	21	3	1	1	0	0	43
603	4	5	2	1	0	2	0	0	1	1	0	1	1	0	1	21	2	1	2	0	0	45
124	3	1	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	2	15	2	0	0	0	0	34
768	5	4	2	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	23	3	1	2	0	0	48
851	2	4	3	1	0	1	0	2	1	1	0	1	1	0	1	20	4	1	1	0	0	44
107	4	6	1	1	oligo-3	0	1	2	1	1	1	1	3	0	1	18	1	0	0	0	0	45
011	4	9	1	1	2	0	1	3	1	1	1	1	3	0	1	24	1	0	oligo-1	0	0	55
230	2	8	1	1	3	0	1	3	1	1	1	1	3	0	1	21	3	0	0	1	1	53
425	6	9	1	1	2	0	1	4	1	1	1	1	3	0	1	22	2	0	0	0	0	57
256	2	8	1	1	1	0	1	3	1	1	1	1	3	0	1	21	2	0	0	0	0	48
820	2	9	1	1	2	0	1	2	1	1	1	1	3	0	1	20	3	0	0	1	1	51
299	2	10	1	2	oligo-3	1	1	4	1	1	1	1	3	0	1	18	2	0	0	0	0	52
800	3	10	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	23	2	0	1	0	0	55
673	2	11	1	1	oligo-1	0	1	2	1	1	1	1	3	0	1	23	1	0	0	0	0	51
877	5	9	1	1	2	0	1	3	1	1	1	1	3	0	1	25	2	0	1	0	0	58
963	4	6	1	1	0	0	1	3	1	1	1	1	3	0	1	17	1	0	0	0	0	43
679	3	9	1	1	2	0	1	3	1	1	1	1	3	0	1	20	1	0	1	0	0	50
325	2	10	2	1	oligo-1	0	1	2	1	1	1	1	3	0	1	20	2	0	0	0	0	49
798	3	8	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	22	2	0	1	0	0	52
643	4	9	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	2	1	1	21	2	0	oligo-1	0	0	51
850	3	9	1	1	2	0	1	2	1	1	1	1	2	1	1	19	1	0	oligo-1	0	0	48
962	4	7	1	1	0	0	1	3	1	1	1	1	3	0	1	19	1	0	0	0	0	46
799	3	11	1	1	2	0	1	2	1	1	1	1	2	1	1	20	2	0	1	0	0	52
250	4	5	2	1	2	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	17	0		0	0	0	38

Şekil 4.28. *Salinispora* Genomlarında Doğal Ürün Gen Kümelerinin ‘antiSMASH’ ile taranması (Lan: Lantibiyotik, Sid: Siderofor, Amgl:Aminoglikozit, oligo +, şeker üniteli biyosentez yollarını ifade etmektedir)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan genom analizleri indol grubu içeren doğal ürün biyosentezinin *S. arenicola* türleri için spesifik olduğunu göstermesine rağmen biyoinformatik analizleri sonucunda *S. pacifica* izolatlarından sadece CNY703, CNS860 ve CNT124'ün de bu biyosentez yolağına ait genlere sahip olduğu ortaya çıkarıldı. NRPS-PKS hibrid gen kümesi sayısının en yüksek *S. arenicola* CNR107 izolatında olduğu gözlemlendi. Programca taranan NRPS ve PKS gen kümelerinin sayıca en fazla *S. arenicola* CNR425 izolatında olduğu görüldü (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. *Salinispora* NRPS ve PKS gen kümelerinin 'antiSMASH' ile taranması

İzolatların spesifik olarak PKS biyosentez potansiyelleri incelendiğinde tüm izolatların PKS-II ve PKS-III gen kümelerine ait genler içerdiği ve *S. arenicola* CNS673 izolatının PKS-I genlerince yüksek potansiyele sahip olduğu görüldü. Genel olarak *S. arenicola* ve *S. pacifica* üyelerinin NRPS ve PKS biyosentez potansiyelleri karşılaştırıldığında *S. arenicola* izolatlarının daha yüksek potansiyele sahip olduğu tespit edildi.

Tüm izolatların genom dizilimleri aynı zamanda 'NapDOS' programı ile de analiz edildi. Bu analizlerin 'antiSMASH' tahminleri ile uyum içinde olduğu görüldü. 'NapDOS' analizleri sonucunda *S. tropica* CNY250, *S. pacifica* CNS860, *S. pacifica* CNR909, *S.*

pacifica CNY666, *S. pacifica* CNT124, *S. pacifica* CNS801 ve *S. pacifica* CNQ768 genomlarında sadece bu izolatlara özgü NRPS ve PKS genleri tespit edildi.

Sonuçlar genel olarak incelendiğinde *S. arenicola* CNH877, CNY 230 ve *S. pacifica* CNY666 izolatlarının NRPS ve PKS ilişkili genlerinin diğer izolatlardan daha fazla olduğu görüldü. Özellikle *S. pacifica* CNY666 genomda hem sayıca hem de çeşitlilik açısından en fazla NRPS ve PKS geni kodlandığı gözlemlendi. Dikkat çekici bir diğer sonuç ise ‘NapDOS’ analizleri sonucunda açığa çıkarılan yolların birçoğunun ürününün bilinmediği tespit edildi. İzolatların genomlarında bilinen yollardan ise *rifamycin*, *salinosporamide A*, *cyclomarin*, *salinilactam*, *cyanosporaside*, *lymphostin* ve *sporolide* sentezinden sorumlu genlerin bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.30).

Yolaklar	801	703	860	909	666	239	796	603	124	768	851	107	O11	230	425	256	820	299	800	673	877	963	679	325	798	643	850	962	799	250
NPRS	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
PKS-I	x	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
PKS-II	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
A NRPS-PKS	√	√	√	x	x	√	x	x	√	x	x	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	x	√
Lan	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	x
Oligo-NRPS-PKS-Lan	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√	√	√	√	x	√	x	x	√	x	√	x	√	x	√	x	√	√	x
<i>Siderophore</i>	√	√	√	x	x	x	x	x	√	x	x	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>Rifamycin</i>	x	x	x	x	√	x	x	x	x	x	x	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	x
<i>Salinosporamide A</i>	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√
<i>Lymphostin</i>	√	√	x	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
B <i>Cyanosporaside</i>	x	√	x	√	√	√	√	√	√	√	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Salinilactam</i>	x	x	x	√	√	√	√	√	x	√	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√
<i>Cyclomarin</i>	x	x	x	x	√	x	x	x	√	√	x	x	√	x	√	x	x	x	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Sporolide</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	√	x	x	x	x	x	x	x	√

Şekil 4.30. *Salinispora* ‘antiSMASH’ (A) ve ‘NapDOS’ (B) analizi (√= mevcut, x= mevcut değil)

Salinispora cinsinin üyelerinde bazı biyosentez yolları türe özgüdür. 30 izolatın genomlarında ‘NapDOS’ ile yapılan taramalar sonucunda tüm *S. arenicola* izolatlarının genetik olarak *rifamycin* sentezleme potansiyelinin olduğu tespit edildi. Benzer şekilde şu an faz I klinik aşamasında bulunan antikanser ilacı *salinosporamide A* biyosentezinin *S. tropica* üyelerine özgü olduğu bilinmekteydi. Fakat ‘NapDOS’ taramalarımız sonucunda *S. tropica* CNT250 dışında *S. pacifica* CNS860 izolatının *salinosporamide A* sentezleme potansiyelinin olduğu görüldü. *Cyanosporaside* biyosentezine ait genler sadece *S. pacifica* izolatlarında gözlenirken cinsin diğer iki türünün üyelerinde bu yolağa ait genlere rastlanmadı. Her iki biyoinformatik programı ile *Salinispora* izolatlarının genomlarında

doğal ürün sentezinden sorumlu gen kümelerinin taranması sonucunda, cinsin üyelerinin bu açıdan oldukça yüksek potansiyele sahip olduğu gözlemlendi.

4.1.9. *Salinispora* İzolatlarının ‘GNPS’ Dereplikasyon ve Network Analizleri

Tüm *Salinispora* izolatlarının A1M1 sıvı kültürlerinden elde edilen etilasetat ekstraktlarının LC/MS/MS analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda elde edilen MS/MS spektrumları dereplikasyon ve moleküler network incelemeleri için ‘GNPS’ programında (www.gnps.ucsd.edu) analiz edildi.

4.1.9.1. ‘GNPS’ Dereplikasyon Analizi

İzolatlara ait dereplikasyon analiz sonuçları Çizelge 4.5’te görülmektedir. *S. pacifica* (CNS801, CNY703, CNQ768, CNY 666, CNT 851, CNS860) ve *S. arenicola* (CNH962, CNH963, CNY011) izolatlarının MS/MS verisinin GNPS kütüphanesindeki mevcut bileşiklerin MS/MS verisi ile benzerlik göstermediği tespit edildi. Bu nedenle 9 izolatin ham ekstraktlarında yapısı bilinmeyen bileşikler olduğu düşünüldü.

Geriye kalan 21 izolatin ise farklı sayıda ve kimyasal yapıdaki bileşikleri sentezlediği belirlendi. *Staurosporine*, *rifamycin* ve *saliniketal* doğal ürünlerinin özellikle *S. arenicola* izolatları tarafından sentezlendiği gözlemlendi. *S. pacifica* türleri için spesifik bir metabolit olan *cyanosporaside*’nin *S. pacifica* CNR909, *S. pacifica* CNY239 ve *S. pacifica* CNT603 izolatları tarafından üretildiği tespit edildi.

Her üç türün analiz sonuçları incelendiğinde *S. arenicola* izolatlarının bilinen doğal ürün biyosentezi açısından diğerlerine göre daha aktif olduğu gözlemlendi. Dereplikasyon analizlerinin biyoinformatik analiz sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi sonucunda *S. pacifica* CNY666 gibi genetik potansiyeli oldukça yüksek olan izolatların kültür ortamlarında bilinen bileşiklere rastlanmadı. Dikkat çekici sonuçlardan biri de *S. pacifica* CNT124’ün ham ekstraktında *mycalamide A* tespit edilmesiydi. *Mycalamide A* özellikle deniz süngerleri tarafından sentezlendiği bilinen doğal ürünlerden biridir.

Çizelge 4.5. ‘GNPS’ Dereplikasyon Analizi

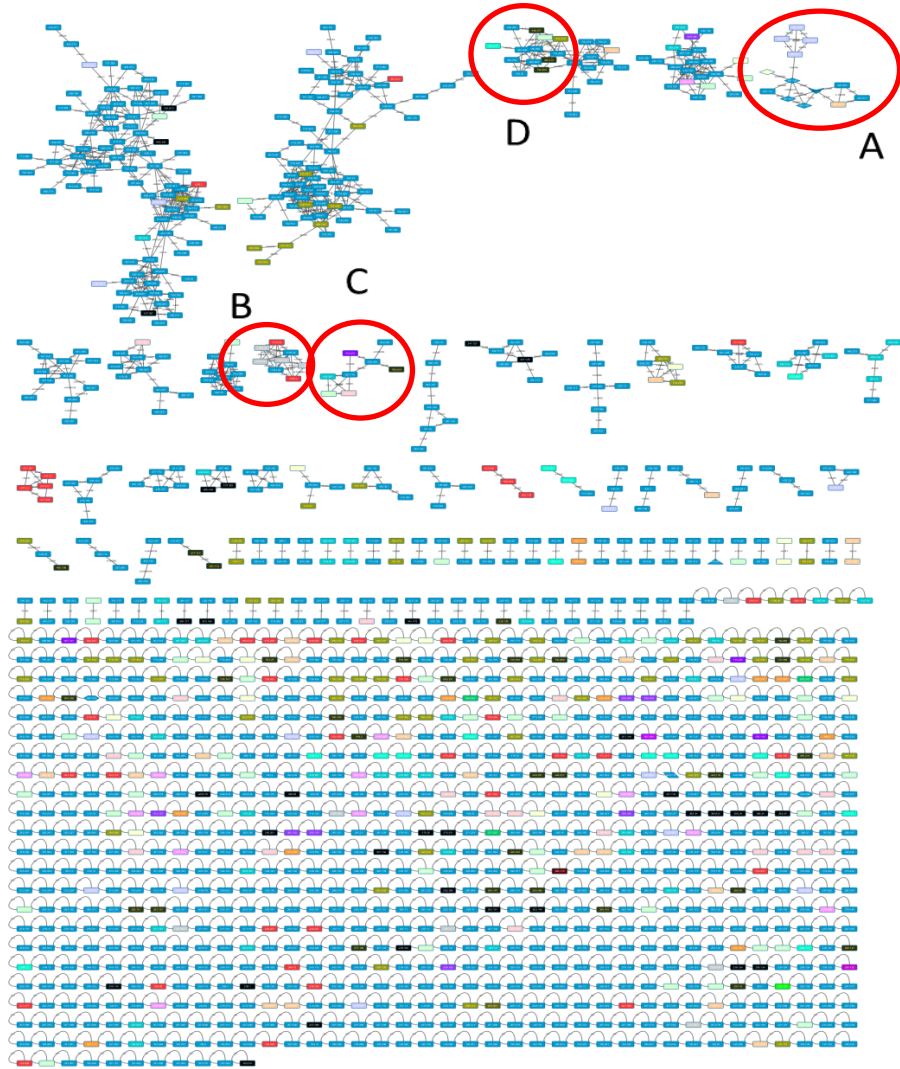
İzolot	GNPS Bileşik Kütüphanesi				
<i>S. pacifica</i> CNS801	-				
<i>S. pacifica</i> CNY703	-				
<i>S. pacifica</i> CNS860	-				
<i>S. pacifica</i> CNR909	Cyanosporaside B				
<i>S. pacifica</i> CNY666	-				
<i>S. pacifica</i> CNY239	Cyanosporaside B	Mycalamide A			
<i>S. pacifica</i> CNT796	Enterocin	Lomaiviticin C			
<i>S. pacifica</i> CNT603	Cyanosporaside B	Lomaiviticin C			
<i>S. pacifica</i> CNT124	Mycalamide A				
<i>S. pacifica</i> CNQ768	-				
<i>S. pacifica</i> CNT851	-				
<i>S. arenicola</i> CNR107	7-OH Staurosporine	Staurosporine	Rifamycin S		
<i>S. arenicola</i> CNY011	-				
<i>S. arenicola</i> CNY230	7-OH Staurosporine	Staurosporine			
<i>S. arenicola</i> CNR425	Salinisporazine A				
<i>S. arenicola</i> CNY256	7-OH Staurosporine	Staurosporine	Rifamycin S	Saliniketal A	Aphidicolin
<i>S. arenicola</i> CNS820	7-OH Staurosporine	Staurosporine	Rifamycin S	Saliniketal A	
<i>S. arenicola</i> CNS299	7-OH Staurosporine	Staurosporine	Rifamycin S	Rifamycin W	
<i>S. arenicola</i> CNT800	Staurosporine				
<i>S. arenicola</i> CNS673	7-OH Staurosporine	Staurosporine	Rifamycin S	Saliniketal A	Aphidicolin
<i>S. arenicola</i> CNH877	7-OH Staurosporine	Staurosporine	Rifamycin S	Saliniketal B	
<i>S. arenicola</i> CNH963	-				
<i>S. arenicola</i> CNY679	Staurosporine	Rifamycin S	Saliniketal A	Saliniketal B	
<i>S. arenicola</i> CNS325	Rifamycin S	Saliniketal B			
<i>S. arenicola</i> CNT798	Staurosporine	Saliniketal A	Saliniketal B		
<i>S. arenicola</i> CNH643	Staurosporine	Rifamycin S			
<i>S. arenicola</i> CNT850	Staurosporine	Rifamycin S			
<i>S. arenicola</i> CNH962	-				
<i>S. arenicola</i> CNT799	Staurosporine	Rifamycin S	Dinactin		
<i>S. tropica</i> CNT250	Lomaiviticin C				

4.1.9.2. ‘GNPS’ Network Analizi

Salinispora izolatu ham ekstraktlarındaki metabolit çeşitliliğinin incelenmesi için ‘GNPS’ moleküler network analizleri gerçekleştirildi. Moleküler network analizi Şekil 4.31’de görülmektedir. Analizler sonucunda network’un 1347 kutucuk ve 1627 kenar oluşturduğu görülmektedir. Networktaki her kutucuk ilgili izolata ait MS/MS verisi ifade ederken, kenarlar ise MS/MS verisi birbirine yakın kutucuklar arasındaki benzerliğin vektörel ölçüsünü ifade etmektedir. Her izolata ait spesifik kutucuk farklı renklerle gösterilmektedir. Negatif kontrole ait kutucuklar ise network içinde siyah renkle ifade edilirken, mavi ve siyah renkteki kutucuklar dışındaki her bir kutucuk farklı izolata ait spesifik MS/MS verisi işaret etmektedir. Örneğin kırmızı renk ile gösterilen tüm kutucuklar

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

S. tropica CNT250'ye özgü MS/MS verisini ifade etmektedir. Dikdörtgen dışındaki paralel kenar, üçgen gibi geometrik şekiller ile ifade edilen kutucuklar 'GNPS' kütüphanesindeki bileşikler temsil etmektedir. Network tekli veya birbiri ile ilişkili kutucuklardan oluşmaktadır. Birbiri ile ilişkili kutucuklar bir araya gelerek kümeler oluşturmaktadır. Ayrıca birbiri ile ilişkisi olmayan fakat kendi içinde MS/MS fragmentasyonları benzerlik gösterdiğinden en az 40 farklı küme içermektedir. Bu kümelerden özellikle dördü (A, B, C ve D) MS temelli genom taramaları açısından oldukça önemlidir.



Şekil 4.31. GNPS Moleküler Network Analizi

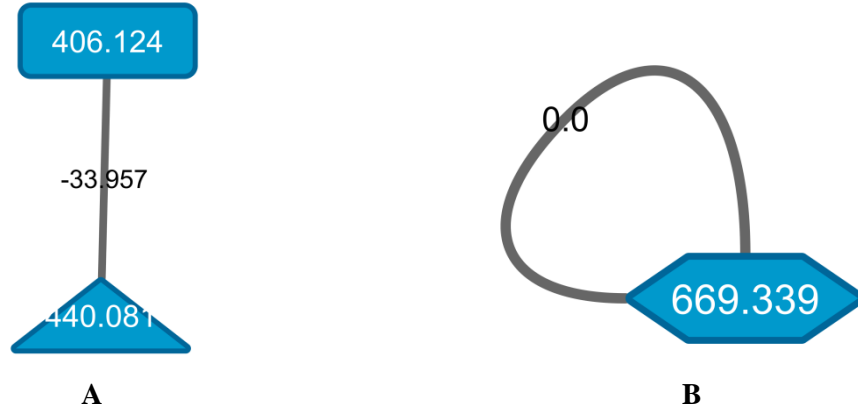
Moleküler network analizinde *lomaiviticin C*, *7-OH-staurosporine*, *staurosporine* ve *cyanosporaside B* bileşiklerine ait MS/MS fragmentasyonu içeren kutucuklar gözlemlendi (Şekil 4.33). Bu kutucukların bazıları küme içinde bulunurken (*7-OH-staurosporine* ve *staurosporine*) diğerlerinin ise herhangi bir küme içinde bulunmadığı gözlemlendi.

Genel olarak network içindeki kümeler incelendiğinde tek veya farklı izolatlara ait kutucukların olduğu gözlemlendi. Örneğin Şekil 4.31’ de gösterilen ‘A’ kümesindeki menekşe renkli dörtlü kutucuklardan oluşan küçük alt küme sadece *S. pacifica* CNY703 izolatından elde edilen MS/MS verilerini ifade etmektedir. Bu dört kutucuktaki moleküler iyonların m/z (kütle/yük) değerlerinin 324.168, 338.183, 366,214 ve 380.23 olduğu görüldü. ‘A’ kümesindeki kutucukların *7-OH-staurosporine* ve *staurosporine* ile ilişkili bileşiklere ait MS/MS verileriyle yakından benzerlik gösterdiği görüldü. Benzer şekilde turuncu renkli ve moleküler iyonu 497.207 olan kutucuğun sadece *S. arenicola* CNS820’yi temsil ettiği ve mavi renkli üçgen şeklindeki *7-OH-staurosporine* (m/z 483.178) kutucuğuyla bağlantısının olduğu görüldü. Her iki kutucuk arasındaki kütle farkının 14 olmasından ötürü izolatin *staurosporine* türevlerinden birini sentezleyebildiğini düşündürmektedir.

‘B’ kümesinin incelenmesi durumunda gri, mavi ve kırmızı olmak üzere üç farklı renkte kutucuklar tespit edildi. Gri renkli kutucuklar *S. pacifica* CNT796 ve *S. tropica* CNT250, mavi *S. pacifica* CNT603 ve *S. pacifica* CNT796, kırmızı ise sadece *S. tropica* CNT250 izolatlarından elde moleküler iyonlarını temsil etmektedir. Kümede 1020, 1150, 1164 ve 1178 m/z değerlikli moleküler iyonlar tespit edildi.

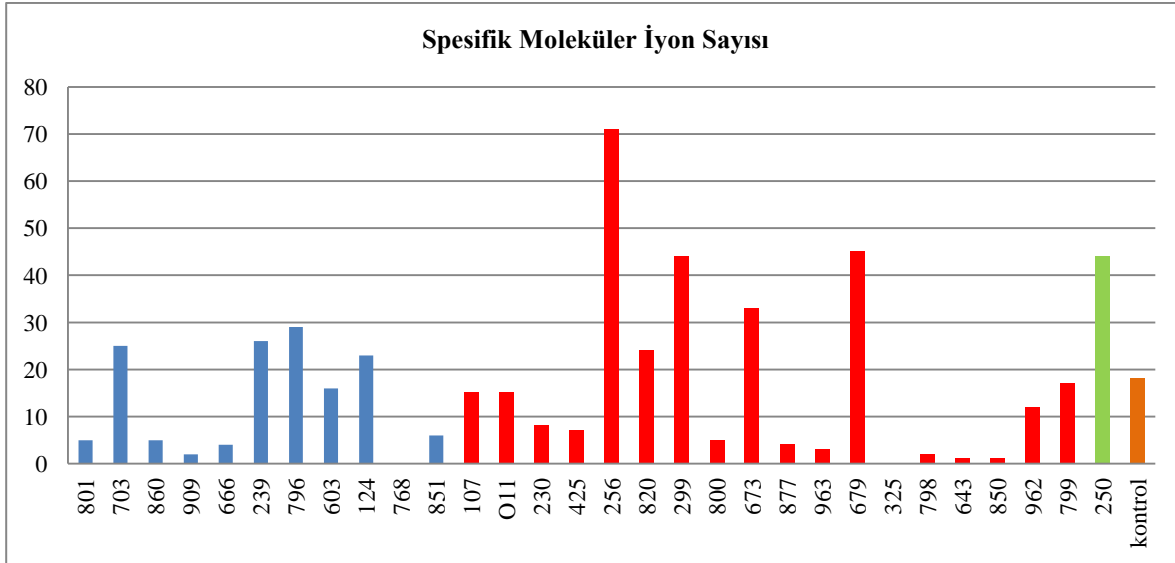
Network analiz sonucunda bazı izolatların MS/MS fragmentasyonları *lomaiviticin* ve *cyanosporaside* bileşiklerinininki ile eşleştiği görüldü. Şekil 4.32’de görüldüğü gibi *cyanosporaside* ikili ve üçgen *lomaiviticin* ise tekli ve hegzagonal kutucuklu şekilde network içinde yer almaktadır. 669.339 m/z değerlikli *lomaiviticin C* eşleşmesinde *S. pacifica* CNT603, *S. pacifica* CNS801 ve *S. tropica* CNT250 izolatlarının ilişkili olduğu görüldü. Üçgen şekilli kutucukla gösterilen *cyanosporaside* ait MS/MS fragmentasyonunun ise *S. pacifica* CNT603, *S. pacifica* CNY239, *S. pacifica* CNR909 ve *S. pacifica* CNQ768 izolatlarından elde edilenlerle yakın benzerlik gösterdiği gözlemlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA



Şekil 4.32. *Cyanosporaside* (A) ve *Lomaiviticin* (B) ve moleküllerinin network eşlemesi

Moleküler iyon sayısı izolata ait ekstraktlarında bulunan metabolitleri işaret etmesi açısından önemlidir. Bu durumda izolatların spesifik MS/MS sinyallerinin sayısı karşılaştırıldığında *S. arenicola* CNY256'nın bu açıdan en yüksek potansiyele sahip olduğu görüldü (Şekil 4.33). Bunun yanı sıra *S. arenicola* CNS325 ve *S. pacifica* CNQ768 izolatu ham ekstraktlarında bulunan bileşiklerden spesifik moleküler iyon tespit edilmedi.



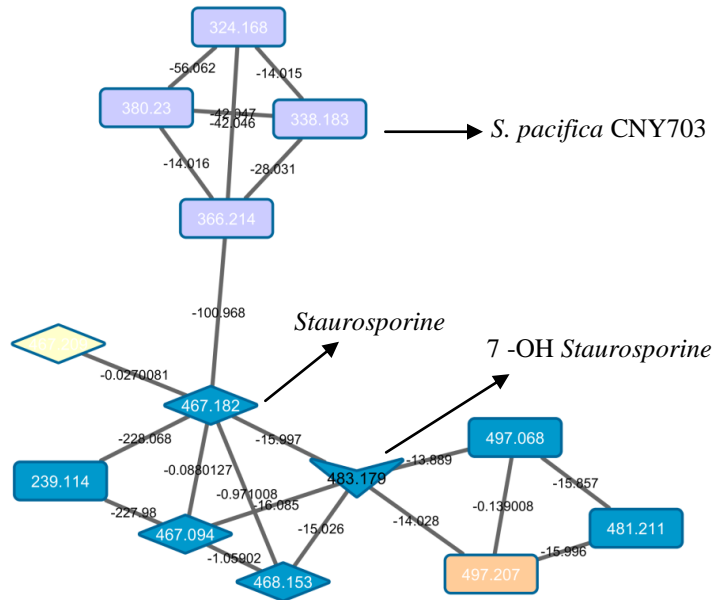
Şekil 4.33. İzolatlara ait spesifik moleküler iyon sayısı (Mavi: *S. pacifica*, Kırmızı: *S. arenicola*, Yeşil: *S. tropica*, kontrol: A1M1 besiyeri)

4.1.10. MS Temelli Genom Taraması

Network analizleri sonucunda tespit edilen ‘A’, ‘B’, ‘C’ ve ‘D’ kümeleri, içermiş oldukları spesifik moleküler şeker iyonları ve bu iyonların MS/MS fragmentasyonlarından ötürü daha detaylı olarak MS temelli genom tarama çalışmalarında incelendi. Bu iyonların tespit edildiği ham ekstraktlarla ilişkili izolatların genomları ‘antiSMASH’ ve ‘NapDOS’ programları ile analiz edildi. Bu analizler sonucunda spesifik şeker sentezinden sorumlu genler ve bu genlerin dahil olduğu metabolik yollar ortaya çıkarıldı. Sonuç olarak yeni doğal ürün keşfi için MS/MS ve biyoinformatik verileri birlikte değerlendirildi.

4.1.10.1. ‘A’ Kümesinin MS Temelli Genom Taraması

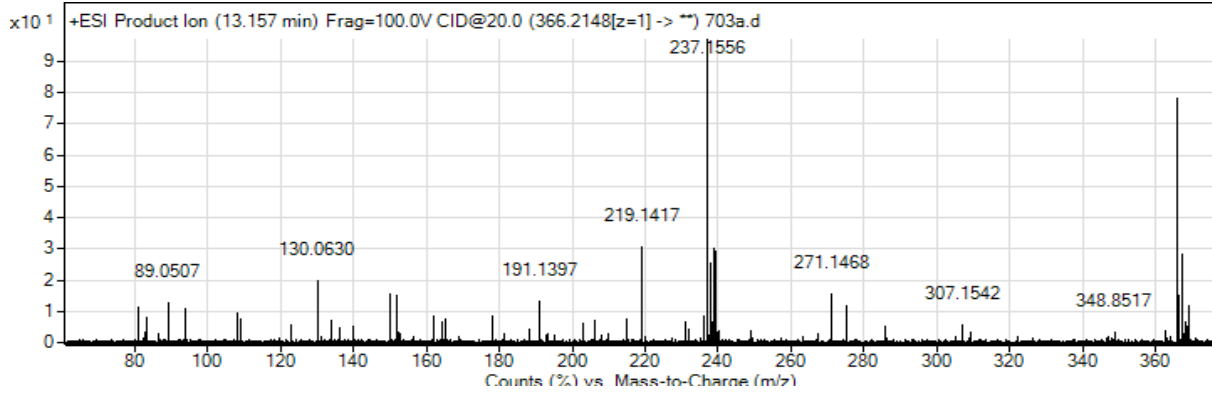
‘A’ kümesi Şekil 4.34’te görüldüğü üzere 13 kutucuklu iki alt kümeden oluşmaktadır. Alt kümelerden ilki menekşe renkli dördütlü kutucuk sadece *S. pacifica* CNY703 izolatından elde edilen sinyallerden elde edildi. Diğer alt kümenin ise eşkenar dörtgen, içbükey üçgen ile temsil edilen 7-OH-staurosporine ve staurosporine sinyalleri ve bu sinyallerle ilişkili dikdörtgen şeklinde gösterilen 4 farklı kutucuktan oluştuğu görüldü.



Şekil 4.34. ‘A’ network kümesi

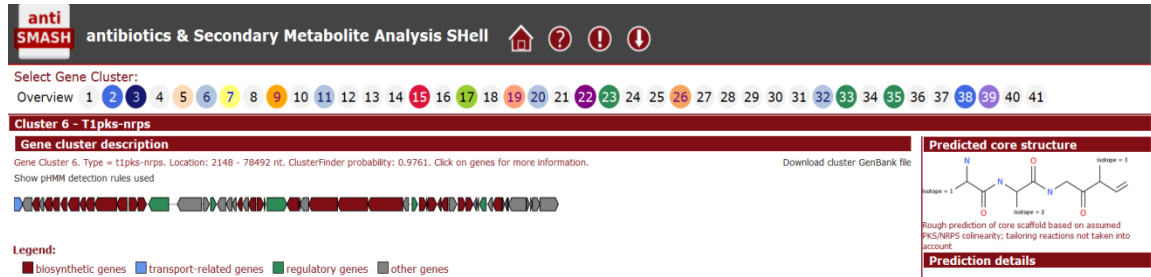
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

S. pacifica CNY703 izolatına özgü MS/MS sinyallerinin oluşturduğu dörtlü alt kümedeki 338.183,366.214 ve 380.23 moleküler iyonların MS/MS fragmentleri incelendi. Bu inceleme sonucunda her üç iyon fragmentasyonunda da MS spektrumu aşağı bölgede 130 (B iyonu) ve 129 (Y iyonu) sinyalleri tespit edildi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. 366.214 moleküler iyonunun MS/MS spektrumu

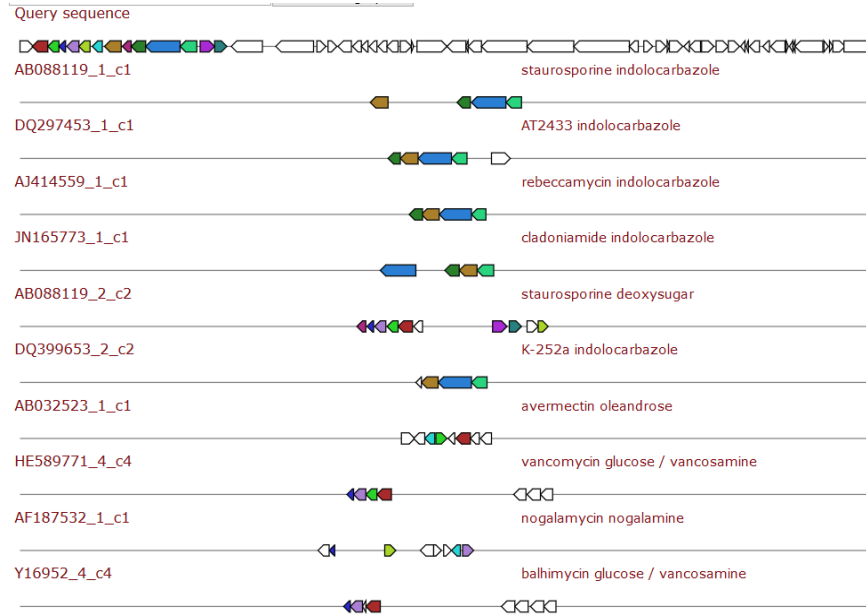
MS/MS fragmentasyonunda görülen spesifik B ve Y iyonlarının *ristosamin* ve *daunosamin*'e (amino şeker) ait olduğu belirlendi. Bu veri ışığında *S. pacifica* CNY703'ün 'antiSMASH' ve 'NapDOS' analizleri tekrar gözden geçirildi. 'antiSMASH' analizleri sonucunda izolatın 41 doğal ürün gen kümesine sahip olduğu görüldü (şekil 4.36).



Şekil 4.36. *S. pacifica* CNY703 izolatının 'antiSMASH' analizi

Farklı kimyasal yapıdaki glikolize doğal ürün biyosentezinden sorumlu gen kümelerinin şeker biyosentez genlerinin homolojileri 'MultiGeneBlast' programı ile incelendi (şekil 4.37). Bunun sonucunda farklı orjinli doğal ürün gen kümelerinde benzer spesifik şeker biyosentez genlerinin bulunduğu görüldü. Şekil 4.37'de görüldüğü üzere

kırmızı renkli gen aminotransferazı, yeşil 2,3 dehidratazı kahverenkli ise NDP epimerazı göstermektedir.



Şekil 4.37. Farklı doğal ürün gen kümelerinin ‘MultiGeneBlast’ analizi

‘antiSMASH’ analizleri sonucunda izolata ait doğal ürün gen kümelerinden sadece 3’ünün aminotransferaz, metil transferaz, 2,3 dehidrataz, NDP şeker epimeraz ve glikozil transferaz gibi spesifik şeker biyosentez genlerine sahip olduğu görüldü. Bu gen kümelerinin indol (5), NRPS-PKSI (6) ve NRPS (33) olduğu belirlendi. Özellikle indol (*staurosporine*) ve NRPS-PKS gen kümelerinin şeker biyosentez genlerinin benzer olduğu görüldü (Çizelge 4.6).

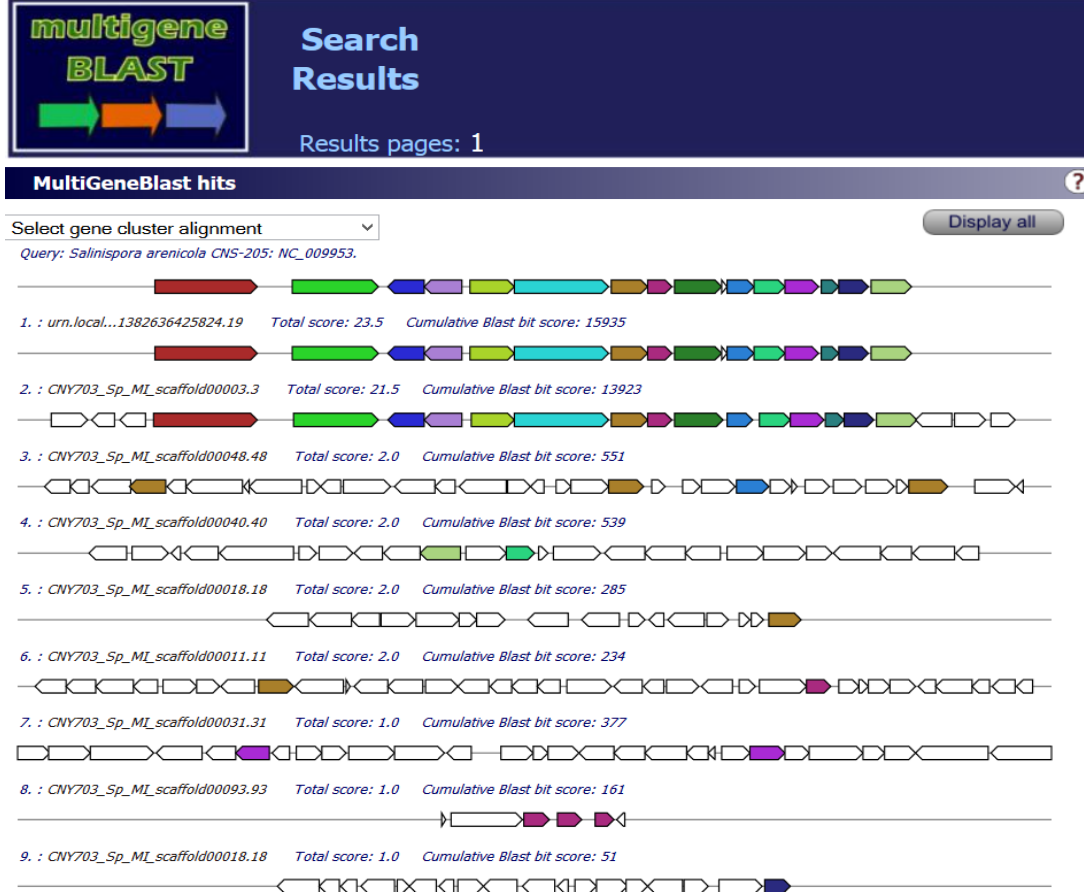
Çizelge 4.6. Indol ve NRPS-PKS gen kümelerinin şeker biyosentez genleri

Gen Kümesi	Şeker biyosentez genleri
İndol (5)	Aminotransferaz, 2,3 dehidrataz, NDP şeker epimeraz, 4,6 dehidrataz, Glu-1fosfattimidil transferaz, metiltransferaz, glukozil transferaz
NRPS-PKS (6)	Aminotransferaz, 2,3 dehidrataz, NDP şeker epimeraz, 4,6 dehidrataz, Glu-1fosfattimidil transferaz, metiltransferaz, glukozil transferaz, O-metil transferaz

NRPS-PKS gen kümesinin indol gen kümesinden farklı olarak O-metil transferaz genine sahip olduğu tespit edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

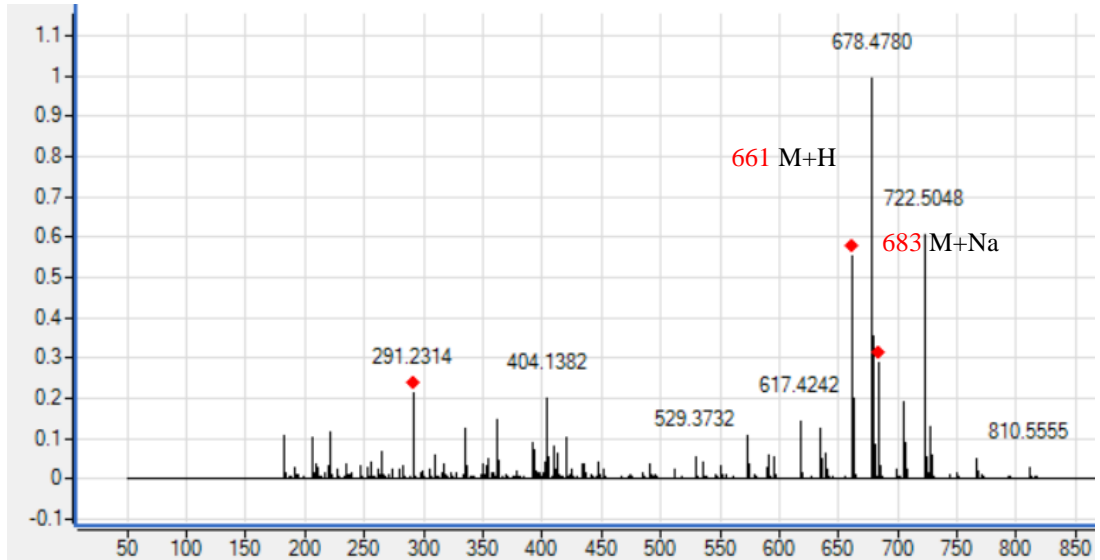
İndol ve NRPS-PKS gen kümeleri farklı biyosentetik yollar olmasına rağmen her iki gen kümesinin benzer homolojiye sahip biyosentez genleri içerdiği ‘MultiGeneBlast’ analizleri ile tespit edildi. Şekil 4.38’de görüldüğü üzere kahverengi P450’yi, mavi glukoz-1-fosfat timidiltransferazı, açık yeşil nükleosit şeker epimerazı son olarak koyu yeşil ise 2,3 dehidrataz genini simgelemektedir.



Şekil 4.38. İndol ve NRPS-PKS gen kümelerinin ‘MultiGeneBlast’ analizi

Dereplikasyon analizleri sonucunda *S. pacifica* CNY703 izolatının kültür ortamında *staurosporine* tespit edilememiştir. Buna rağmen izolata ait ekstrakta spesifik *ristosamin* sinyali 130 (B iyonu) ve 129 (Y iyonu) iyon fragmentasyonlarına sahip 338.183, 366.214 ve 380.23 moleküler iyonlarının tespit edilmesi ilgili metabolitin glikozile doğal ürün sentezinden sorumlu NRPS-PKS gen kümesinin ürünü olabileceği düşünüldü. Bu sebepten ötürü NRPS-PKS gen kümesi ve ürünü üzerinde yoğunlaşıldı. Sonrasında NRPS-PKS gen

kümesinin ürününün olası monomerleri ‘antiSMASH’ ve ‘NRSPredictor2’ programlarının kullanılmasıyla tespit edildi. Bu analizler sonucunda bileşiğin triptofan, glisin, lösin veya izölösin üçlü peptidi, şeker ve ketid zincire sahip olduğu belirlendi. Mevcut biyoinformatik veriler doğrultusunda ileri düzey kimyasal analizler gerçekleştirildi. Bileşiğin monomer içeriği göz önünde bulundurulduğundan molekül ağırlığının 600-700 aralığında olabileceği tespit edildi. Bu aralıktaki metabolitlerin tespiti için LC/MS analizleri yapıldı. Analiz sonucunda MS spektrumunda 661 (M+H) ve 683 (M+Na) moleküler iyonları gözlemlendi (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. *S. pacifica* CNY703 ekstraktının LC/MS analizi

366.214 ve 683 moleküler iyonlarının UV spektrumları ‘Chemstation’ programında analiz edildi. Her iki sinyalin UV spektrumlarının kütüphanedeki benzer bileşikler ile eşleştiği görüldü (Şekil 4.40 ve 4.41). Her iki moleküler iyonun UV analizi sonucunda kütüphanede CNS.205 311 kodlu bileşik ile benzer kromofora sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.42). Ayrıca 683 iyonun MS/MS fragmentasyonunun UV spektrumunda olduğu gibi 366.214 sinyali ile benzerlik gösterdiği görüldü. 683 iyonun total iyon kromatografisi (TIC) ve MS/MS fragmentasyonunun 366.214 iyonu ile benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 4.43).

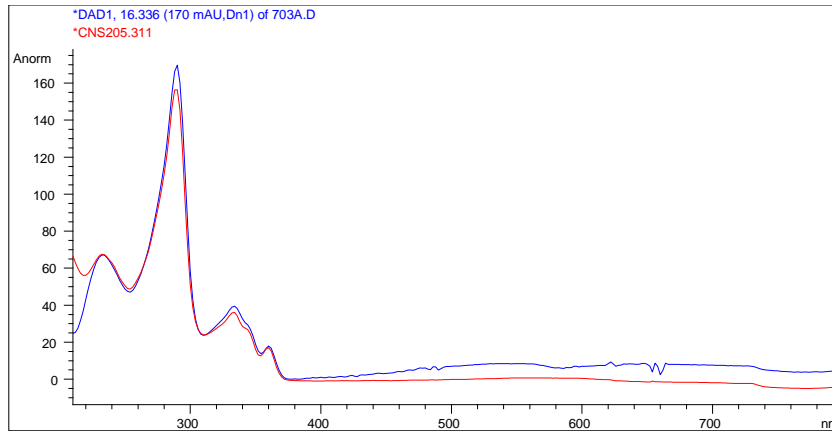
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

1	959.632	879	12.41	CNS205.311	0	CNS205.311
2	931.308	739	11.00	NPI-3003 from 262.02.AD	0	NPI-3003
3	929.477	618	7.00	STAUROSPORIN	0	
4	892.557	761	12.77	staurosporine	0	staurosporin
5	890.075	762	12.36	staurosporine	0	staurosporine
6	869.427	268	5.28	OOSPOREIN	0	
7	816.536	137	4.55	N-FORMYL-HATOMAMICIN	0	
8	811.706	856	11.50	CNQ085.332	0	CNQ085.332, unpublished
9	795.201	740	11.54	NPI-3004 from 1583-05-ab-453	0	NPI-3004

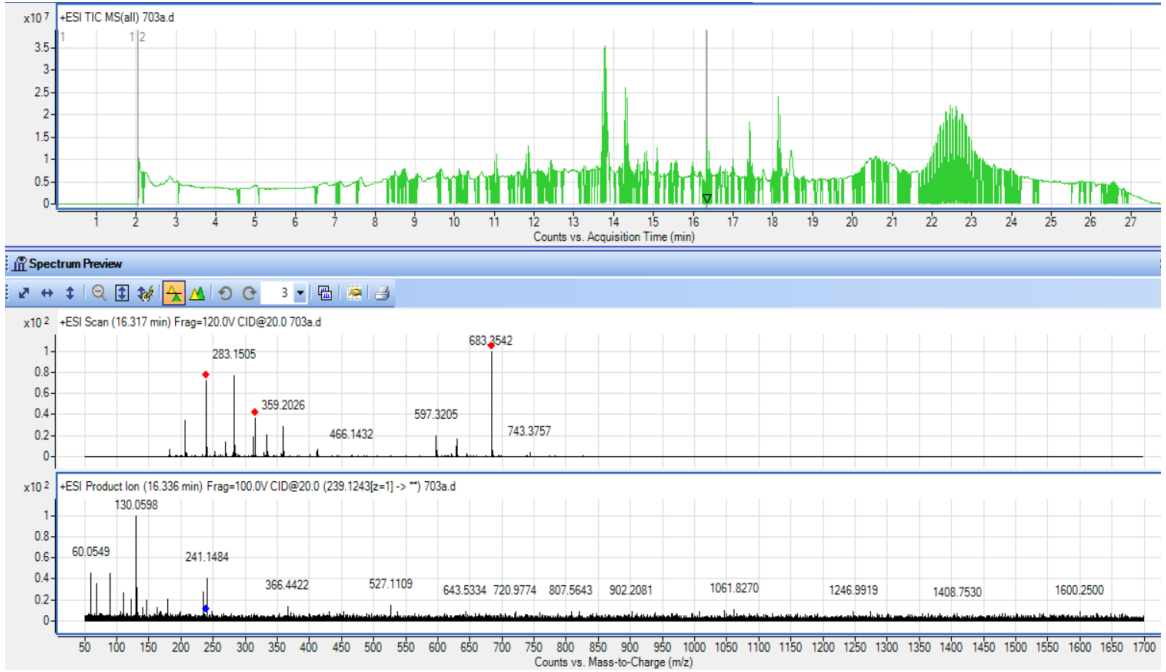
Şekil 4.40. 683 moleküler iyonunun UV spektrum analizi

1	983.263	761	12.77	staurosporine	0	staurosporin
2	981.220	762	12.36	staurosporine	0	staurosporine
3	979.073	618	7.00	STAUROSPORIN	0	
4	949.638	879	12.41	CNS205.311	0	CNS205.311
5	892.855	268	5.28	OOSPOREIN	0	
6	870.152	739	11.00	NPI-3003 from 262.02.AD	0	NPI-3003
7	838.527	856	11.50	CNQ085.332	0	CNQ085.332, unpublished
8	820.271	857	10.77	CNQ085.350	0	CNQ085.350, unpublished
9	811.363	855	10.30	CNQ085.318	0	CNQ085.318, unpublished

Şekil 4.41. 366.124 moleküler iyonunun UV spektrum analizi

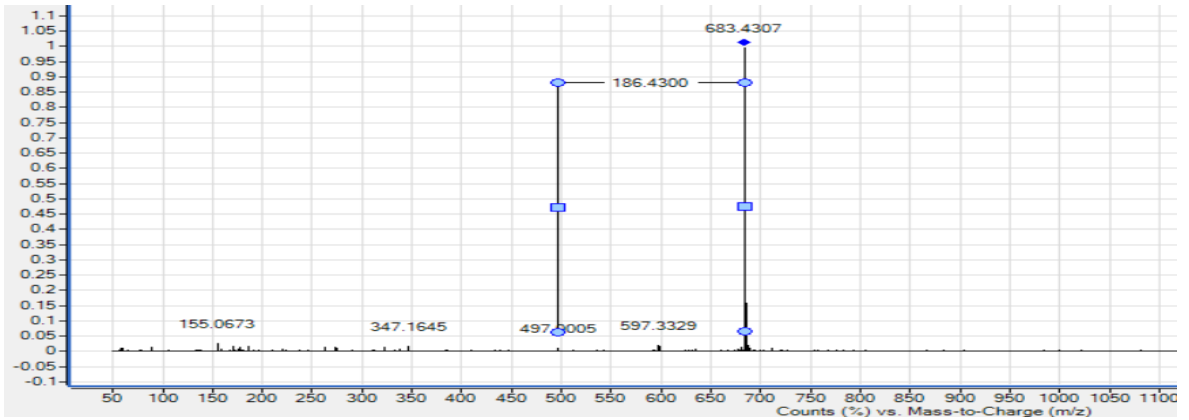


Şekil 4.42. 683 moleküler iyonunun UV kromatogramı



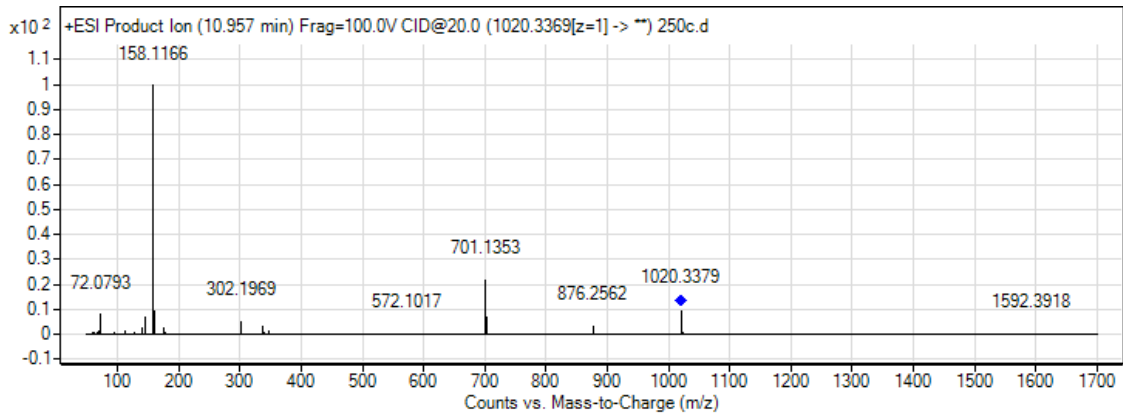
Şekil 4.43. 683moleküler iyonun total iyon ve MS/MS kromatogramı

NRPS-PKS gen kümesinin ürünün monomerlerinin triptofan, glisin, lösin- izölösin olduğu biyoinformatik analizler sonucunda belirlendi. Bu sebepten 683 moleküler iyonunun MS/MS spektrumunda aminoasit kütle kayma değerleri tarandı. Bunun sonucunda spektrumda triptofan kütle kayma değeri tespit edildi (Şekil 4.44).



Şekil 4.44. 683 MS/MS spektrumunda triptofan kütle kayma değeri

B-158 iyonu *desosamin* Y-144 iyonu ise *oleandrose* şekerleri için spesifik iyon tipleridir. Networktaki ilgili izolatlardan *S. tropica* CNT250'nin 1020.34 moleküler iyonu MS/MS fragmentasyonunda B-158 ve Y-144 iyonları olarak tespit edildi (Şekil 4.46.). İlgili şekerlerin *lomaiviticin C* bileşiğinin yapısında bulunduğu belirlendi. Bu sebepten *S. pacifica* CNT796, *S. tropica* CNT250 ve *S. pacifica* CNT603 izolatlarının izolatlarının dereplikasyon, 'antiSMASH' ve 'NapDOS' analizleri incelendi. Dereplikasyon incelemeleri sonucunda *lomaiviticin C*'nin her üç izolat içinde ortak bileşik olduğu tespit edildi. Ayrıca her üç izolatın biyoinformatik incelemeleri sonucunda hem spesifik şeker biyosentezi genleri içeren PKS-II gen kümesine hem de genetiksel olarak *lomaiviticin C* sentezleme potansiyeline sahip olduğu görüldü.



Şekil 4.46. Moleküler iyon 1020.34'ün MS/MS spektrumu

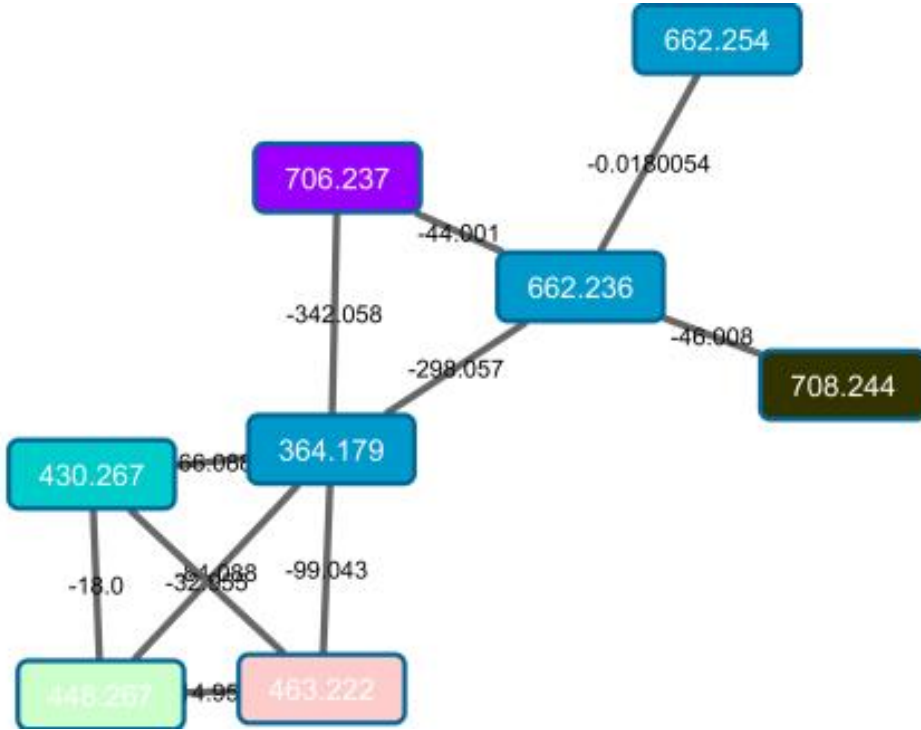
Tüm veriler doğrultusunda 'B' kümesindeki moleküler iyonların *lomaiviticin C*'ye ait olduğu tespit edildi.

4.1.10.3. 'C' Kümesinin MS Tabanlı Genom Taraması

Network analizlerindeki önemli kümelerinden biri diğeri Şekil 4.47'de görülmektedir. Küme içindeki mavi dışındaki renkli kuyucuklar farklı izolatlara ait spesifik MS/MS spektrumlarını temsil etmektedir. Kutucuklardan menekşe (706.237) *S. arenicola* CNH877'yi, kahverengi (708.244) *S. arenicola* CNS673'ü, pembesi (463.222) *S. arenicola* CNR107'yi, turkuaz (430.267) *S. arenicola* CNY299'u, son olarak açık yeşil (448.267) renkli olanı *S. arenicola* CNY679'a ait moleküler iyonlardır. Bu iyonlardan 430.267

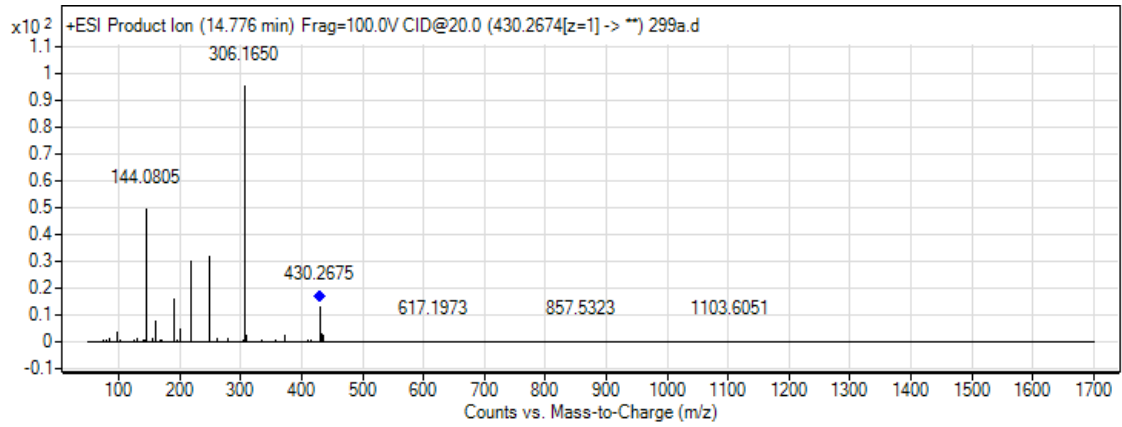
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

MS/MS fragmentasyonunda B-144 *vancosamine* iyonu tespit edildi (Şekil 4.48). Bu veri doğrultusunda *S. arenicola* CNY299 izolatının olası glikolize doğal ürün sentezinden sorumlu gen kümeleri ‘antiSMASH’ incelemeleri ile tespit edildi. Bu incelemeler sonucunda spesifik şeker biyosentezi genleri içeren 2 NRPS, 2 PKS-I ve bir adet indol olmak üzere toplam 5 gen kümesi belirlendi (Çizelge 4.7).



Şekil 4.47. ‘C’ network kümesi

Bu incelemelere ek olarak 430.267 moleküler iyonu ‘MarinLit’ veritabanında tarandı. Bu tarama sonucunda L11295 kodlu şeker üniteli bir bileşik tespit edildi.



Şekil 4.48. 430.267 moleküler iyonun MS/MS spektrumu

Çizelge 4.7. *S. arenicola* CNY299'un glikolize doğal ürün gen kümeleri

İzolat	Moleküler iyon	Şeker	Gen Kümesi
<i>S. arenicola</i> CNY299	B-144	<i>vancosamine</i>	(1) NRPS (15) Oligo NRPS (16) PKS-I (17) İndol (26) PKS-I

4.1.10.4. 'D' Kümesinin MS Tabanlı Genom Taraması

'D' network kümesinde 4 farklı *S. arenicola* izolatına ait spesifik MS/MS spektrumu gözlemlendi. Bu izolatlar açık kahverengi (314.102) *S. arenicola* CNY256'yı, kahve renkli (466.277, 492.274, 732.298) *S. arenicola* CNS673'ü, açık yeşil (434.252) *S. arenicola* CNY679'u, yeşil (480.257) ile gösterilen kutucuk ise *S. arenicola* CNY011'e ait moleküler iyon spektrumlarıdır (Şekil 4.49).

Tüm spesifik spektrumların MS/MS fragmentasyonları incelendi. Spektrum incelemeleri sonucunda 480.257 MS/MS spektrumunda Y-130 iyonu tespit edildi. 'Metlin' veri tabanında yapılan incelemeler sonucunda bu iyonun *daunomycin*'in yapısında bulunan *daunosamin* olduğu belirlendi.

halityloside B ve *acondontasteroside* F gibi glizolize terpenoid bileşiklerini işaret etmektedir. *S. arenicola* CNR107'un 'antiSMASH' analizi incelendiğinde ise 3 farklı terpen biyosentez genine sahip olduğu bunlardan birinin ise spesifik şeker biyosentez geni olan metil transferaz genini içerdiği tespit edildi. Ayrıca 'MultiGeneBlast' analizleri sonucunda terpen biyosentez kümesindeki bazı genlerin, glizolize terpenoid *sioxanthin* gen kümesindeki UDP galaktopiranoz mutaz ve poliprenil sentetaz genleri ile %90'nın üzerinde homoloji gösterdiği görüldü.

4.2. TARTIŞMA

4.2.1. *Streptomyces* İzolatı Genomlarında NRPS ve PKS-I Genlerinin Taranması

Bilinen mikrobiyal metabolitlerin yaklaşık %70'i aktinomisetler tarafından üretilmekte olup, bunların içerisinde *Streptomyces* cinsinin üyeleri, geniş varyetede ve yüksek potansiyelde doğal ürün biyosentezi açısından dikkat çekmektedirler. Son yıllarda, farklı doğal kaynaklardan (deniz, mağara, endemik bitkiler vb.) yeni aktinomisetlerin izole edilmesine ilişkin çeşitli metodlar uygulanabilmektedir. Yeni kaynaklardan yeni aktinomisetlerin çeşitliliğinin, doğal ürün çeşitliliğine de yol açacağı tahmin edilmektedir. Bu tür doğal ürünlerin mikrobiyal rekabetin önemli olduğu durumlarda, üretici mikroorganizmaya büyük bir seleksiyon avantajı sağlayarak habitatlarına adaptasyonlarından rol oynamaktadır. Özellikle toprakta yaşayan *Streptomyces*'ların rizosferlerde bulunan simbiyotik/patojen mantarlar ve bitkiler ile etkileşimi, besin transferi ve kimyasal savunma gibi ekolojik roller açısından önem teşkil etmektedir.

Daha önce yapılmış olan bazı araştırmalar, *Streptomyces*'ların topraktaki patojenlerin baskılanması için önemli katkıları olduğunu göstermiştir. Gerek sucul gerekse karasal ortamlardan izole edilerek doğal ürünleri taranmış aktinomisetler olmasına karşın, rizosfer yada endofit izolatlarının biyoaktif doğal ürünleri üzerine olan çalışmalar sınırlıdır. Bazı rizosfer aktinomisetlerinin yeni doğal ürünler sentezlediği ortaya konmuştur (Nachtigall ve ark. 2010, Thaker ve ark. 2013, Wu ve ark. 2015). Çalışmaların büyük bir çoğunluğunda analitik yaklaşımlar kullanılarak metabolitler taranmış, ancak birkaç

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

çalışmada, moleküler teknikler kullanılarak bu mikroorganizmaların doğal ürün sentezinden sorumlu genlerinin çeşitliliği ortaya konmuştur (Nikolouli ve Mossialos 2012, Thaker ve ark. 2013, Ozakin ve ark. 2014).

Şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen biyoaktif metabolitlerin çoğunluğu poliketidler, ribozomal olmayan peptidler veya her ikisinin hibridi olan moleküllerdir (Marahiel ve ark., 1997). Ribozomal olmayan peptidleri sentezleyen NRPS genleri ve modular poliketid bileşiklerini sentezleyen PKS-I genleri, daha önce izole edilmiş ve teşhisleri yapılmış olan 65 rizosfer *Streptomyces* izolatında tarandı. NRPS A domainini ve PKS-I KS domainini hedef alan dejenere primerler yoluyla, 65 izolatın hepsinde NRPS genlerinin, 51'inde ise PKS-I genlerinin varlığı tespit edildi. Elde edilen PCR amplikonlarının ilgili genlere ait olup olmadığını tespit etmek için klonlama ve sekans analizleri yapıldı. Bulgularımız, rizosfer izolatlarımızın çok büyük çeşitlilikte ve sayıda NRPS genlerine sahip olduğunu gösterdi. PKS-I genlerinin de, izolatlarımızın genomunda yaklaşık %80 oranında yayılış gösterdiği tespit edildi. Bu sonuçların sadece birer primer çifti ile elde edildiği göz önünde bulundurulduğunda, literatür ile kıyaslandığında bu genlerin izolatlarımızda oldukça yüksek bir oranda olduğu görülmektedir (Pathom-aree ve ark. 2006, Jiang ve ark. 2007, Janso ve ark. 2010, Xin ve ark. 2011). Örneğin, 2004 yılında yapılan bir çalışmada, araştırmacılar aktinomistlerde NRPS ve PKS-I genlerini amplifiye etmek için spesifik primerler dizayn etmişler ve PCR'a dayalı tarama yöntemi ile taradıkları türlerin %79,9'unda NRPS ve %56,7'sinde PKS-I genlerinden amplifikasyon elde etmişlerdir (Ayuso-Sacido ve Genilloud 2004). PCR'a dayalı genom taramaları çalışmalarımızda bu araştırmacıların dizayn ettikleri dejenere primerler kullanıldı. Bir başka çalışmada ise, (Gonzales ve ark. 2005) likenlerden izole ettikleri aktinomisetlerin doğal ürün genlerini tespit etmeyi amaçlamış, PKS-I ve NRPS genlerinin oranlarını, sırasıyla, %62,6 ve %58,5 olarak bulmuşlardır. Bu rakamlara rağmen, klasik kültür koşullarında tüm izolatların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri %27 olarak tespit edilmiştir. NRPS ve PKS-I genleri taranan izolatlarımızın daha önce klasik kültür koşullarında üretilerek tespit edilen antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri %40 olarak bulunmuştu (Yılmaz ve ark. 2008). Bu sonuçlar, standart fermentasyon koşullarında üretimi başarısızlıkla sonuçlanmış olan biyoaktif doğal ürünlerin genom analizleri ile ortaya

çıkarılması ve doğrudan rasyonel yaklaşımlarla yeni biyoaktif bileşiklerin tespiti, ekspresyonu ve saflaştırılmasının mümkün olabileceğini göstermektedir. Bu açıdan da bakıldığında doğal ürün araştırmalarında genetik taramanın kimyasal tarama ile kıyaslandığında ne kadar avantajlı olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak geleneksel kimyasal tarama yönteminde karşılaşılan dereplikasyon probleminin üstesinden gelinmesinde genetik temelli tarama stratejileri oldukça önem arz etmektedir.

Son yıllarda genom projesi tamamlanan birçok *Streptomyces* türünün doğal ürün gen kümeleri incelendiğinde cinsin üyelerinin bu açıdan potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu mikroorganizmaların doğal ürün biyosentez potansiyeli genetik olarak yüksek olmasına karşın klasik kültür ortamlarında tespit edilen bileşik sayısı oldukça düşüktür. Bu sonuçta birçok gen kümesinin kriptomik özellikte olduğunu göstermektedir. Genetik tarama aynı zamanda elde edilen klonlar aracılığıyla, genomda yeni gen kümelerine ulaşmanın yolunu açmaktadır. Bu da hem yeni genlerin keşfine hem de bir çoğu kriptomik olan bu tür genlerin yeniden ekspresyonunun sağlanmasına öncülük etmektedir.

İzolatların A ve KS domain genlerini içeren klonların genbankasında yapılan analizleri sonucunda hangi organizmaların genleri veya bileşikleri ile homoloji gösterdikleri tespit edilmiştir. Sonuçlar, sahip olduğumuz gen dizilerinin çoğunun, genbankasında şimdiye kadar bulunan diğer dizilerle %70'in altında benzerlik gösterdiği bulundu. Birbirinden bağımsız yapılan iki araştırmada (Komaki ve ark. 2008, Zhao ve ark. 2008), incelediğimiz doğal ürün genlerinin bir domainin, BLASTX sonucunda %70'in üzerinde bir homoloji göstermesi durumunda o bileşiği "bilinen" bu değer altındakileri ise "yeni" olarak değerlendirmişlerdir. Klonlarımıza bu açıdan bakıldığında da büyük bir kısmı yeni genlere işaret etmektedir. Ayrıca %70'in üstünde benzerliği bulunan "bilinen" diye nitelendirilen klonlar bilinen bir gen kümesine işaret etseler bile bu genlerin içinde yer aldığı biyosentetik gen kümelerinden hangi bileşiklerin sentezlendiği bilinmediği sürece bu homoloji yüksek dahi olsa yine de yeni bir bileşiğe işaret etmektedir. Dolayısıyla "bilinen" diye sınıflandırılan gruplar da "yeni" olarak sınıflandırılan genler gibi daha önce keşfedilmemiş bir bileşiğin sentezinden sorumlu gen kümesinin bir parçası olabilirler.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

BLAST homolojileri dikkate alındığında, klonların aktinomisetlere ait grupların sahip olduğu genlerle benzerlik göstermesinin yanısıra, azımsanmayacak bir oranda çok çeşitli başka bakteri grupları ile de benzerlik gösteren klonlar mevcuttur. Amplifiye edilen fragmentler içerisinde NRPS gen kümelerine homolojinin yanısıra NRPS/PKS hibrit gen kümelerine de benzerlik görülmüştür. Bu genler, antikanser bileşikler (*actinomycin*), antibiyotik ve antifungaller (*gramicidin*, *enduracidin*, *friulimicin*, *tyrocidin*, *laspartomycin*, *trindamycin*, *althiomycin*) ve sidereforlar (*yersiniabactin*, *enterobactin* ve *bacillibactin*) gibi farklı biyolojik aktiviteye sahip, burada sayamadığımız ancak tablolarda açıkça görülen birçok bileşiği işaret etmektedir.

Giriş bölümünde detaylı olarak verildiği üzere NRPS genlerinin substrat spesifitesi A domaini ile belirlenmektedir. DNA diziliminin amino aside çevrilerek bu domainlerin seçebildiği substratlar bazı programlarda tahmin edilebilmektedir. Bu programlarda özellikle çalışmalarımızda kullanılan ‘NRSPredictor2’ programı bir A domain için temel olarak 2 farklı sonuç vermektedir. Küçük ve büyük küme (small and large cluster) olarak adlandırılan bu analizlerin herbirinin kendine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Küçük küme analizleri daha dar analizler yaparak, korunmuş daha küçük motiflere bakmakta ve sonuç olarak daha az amino asidi substrat tipi olarak vermektedir. Büyük küme analizleri ise A domaininin tüm motiflerini tanıyarak farklı dizilimleri benzer spesifitelerde toplayarak ve bunları gruplandırarak sonuçta bir grup amino asidi substrat olarak vermektedir. Tüm domainlerin birbirleriyle kıyaslanması açısından sadece büyük küme analizleri yapılmıştır. A domainlerinde bu substrat bağlanma bölgelerinin aranması ile veri tabanında bulunan 8 farklı bağlanma bölgesinden 7 tanesi tespit edilmiştir. Birkaç sekans dışında tüm sekanslarda A domain bulunmuştur. Ancak hatırı sayılır miktarda olan bazı sekanslarda, korunmuş A domain motifleri bulunduğu halde bu motiflerin veri tabanında bulunan amino asitleri substrat olarak tanıyan motifler olmadığı tespit edilmiştir. Bunlar tabloda “substrat tahmini yapılamadı” olarak belirtilmiştir. Bunun anlamı, izolatlarımızın şimdiye kadar tanımlanmış NRPS bileşiklerini oluşturan amino asitlerin dışında, başka amino asitleri tanıyabilecek A domainlerine sahip olma olasılığıdır. Bu önemli bulgu aynı zamanda yeni NRPS bileşiklerini işaret etmektedir. Bu sonuçlar yeni amino asitlerin yer aldığı ribozomal olmayan peptidlerin sentezi konusunda da yeni bilgiler

oluşturacak potansiyele sahip olduğundan doğal ürün çalışmalarına da büyük katkılar sağlama potansiyeline sahiptir. Yapılan A domain analizleri, ilgili fragmentin sahip olduğu organizmanın hangi bileşiğin sentezleyeceğini değil, bu fragmentin özgün ve üzerinde çalışmaya değer bir gen kümesinin parçası olup olmayacağı konusunda değerli bilgiler sunmaktadır.

Son yıllarda yayınlanan makalelere bakıldığında, ilgili genlere ait domainlerden yola çıkılarak yapılan bileşik tahminlerinin bazı sakıncaları olduğu belirtilmektedir. Çünkü domain, ilgili gen kümesine ait çok küçük bir parça olup, bu gen kümesinden sentezlenecek bileşik ile ilgili sadece bir tahmin vermektedir. Ancak bir bileşiğin kültür ortamında analitik ve spektroskopik teknikler ile tam anlamıyla ortaya koyulması için bu tahminlerden daha fazlasına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bileşiği sentezleyen ilgili gen kümesine ait bir domainin, bileşiğin nihai yapısı hakkında kesin belirleyici olmayacağı açıktır. Son çalışmalara bakıldığında gen kümesine ulaşılarak genlerin tümü ortaya çıkarıldıktan sonra ancak sentezlenen bileşik kültür ortamında onlarca bileşik içerisinde ayırt edilebilmektedir. Son yıllarda dikkati çeken başka bir nokta ise bu tür bileşiklerin genlerinin kriptik olduğudur. Bu tür genlerin ekspresyonunu sağlamak için ortaya çıkarılan gen kümeleri heterolog olarak eksprese edilmekte ve kriptik genlerin çalışması için farklı promotorlar denenmektedir. Bu da, elimizdeki türlerin, klasik kültür koşullarında sentezlenemeyen veya kimyasal tarama metodları ile tespit edilemeyecek kadar az üretilen bileşiklerin biyosentez genlerinin keşfedilmesine yol açacaktır. PCR'a dayalı tarama stratejisi ile tespit edilen genlerin şimdiye kadar bulunmuş olan diğer bileşik genleri ile yakınlık derecesi ve yeni bileşik sentezleme potansiyellerinin belirlenmesinin yanı sıra, bu klonların aynı zamanda, ilgili organizmaların genomlarında gen kümelerinin taranması için hibridizasyon problemleri olarak kullanılması açısından da önemlidir.

4.2.2. *Tetrangomycin* ve Biyolojik Aktivitesi

Streptomyces sp. CAH29 genomu genetik olarak taranırken, kültür ortamına sentezlediği bileşikler de kimyasal yöntemlerle tarandı. İzolatın kültür ortamına salgıladığı bileşiklerden biyoaktivitesi en fazla ve en geniş spektrumlu olan bileşik seçilerek saflaştırıldı. Spektroskopik incelemeler sonucunda bileşiğin *tetrangomycin* olduğu tespit

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

edildi. PKS-II genleri ile sentezlendiği tahmin edilen *tetrangomycin* bileşiği angucycline grubu antibiyotiklerden kabul edilmektedir. *Tetrangomycin* daha önceleri başka bir *Streptomyces* türünden izole edilerek aydınlatılmış olmasına rağmen üzerine yapılmış detaylı bir çalışma yoktur. Sadece *S. aureus* ve bazı antitümör hücreler üzerine inhibisyon etkisi mevcuttur (Dann ve ark. 1965). Son yıllarda yapılan genetik çalışmalarda bazı angucycline antibiyotiklerin gen kümeleri ortaya çıkarılmıştır (Westrich ve ark. 1999). Bu gen kümelerinin nihai ürünleri iskelet yapısını *tetrangomycin*'in oluşturduğu fakat farklı fonksiyonel gruplara sahip bileşiklerdir. Bunlar içerisinde; antitümör etkili *landomycin* E (Zhu ve ark. 2005) ve antibakteriyel etkili *simocyclinone* bileşikleri (Galm ve ark. 2002) örnek olarak verilebilir. *Tetrangomycin* bu bahsedilen biyosentetik metabolik yollarda ara metabolit gibi görünmektedir. Dolayısıyla CAH29'un taşıdığı ve *tetrangomycin*'in sentezlendiği gen kümesinin nihai ürünü de farklı bir bileşik olabilir. Zira NRPS, PKS-I ve PKS-II gen kümelerinde sentez genlerinin dışında son kimyasal yapıyı verecek olan fonksiyonel grupları sentezleyen genler de mevcuttur. *Tetrangomycin*'in saflaştırılma çalışmalarında geniş ölçekte bakteri üretimi yapılmasına rağmen saf madde miktarının 1.8 mg olacak şekilde az elde edilmesinin nedenlerinden biri de bileşiğin ara metabolit olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bundan dolayı *tetrangomycin* daha önce bulunan bir bileşik olmasına rağmen sentezlediği gen kümesinin ortaya çıkarılması önem arz etmektedir.

1997 yılında yapılan bir çalışmada *tetrangomycin* gen kümesinin klonlanması sonrasında gerçekleştirilen heterolog gen ekspresyon çalışmaları sonucunda *fridamycin* ve *PD116740* bileşiklerinin *tetrangomycin*'nin türevi bileşikler olduğu tespit edilmiştir (Hong ve ark. 1997).

Streptomyces cyanogenus S136'da farklı sayıda şeker grubuna sahip türevleri bulunan ve potent antitümör aktiviteye *landomycin*'in biyosentez gen kümesi araştırmacılar tarafından klonlanmıştır (Westrich ve ark.1999). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda 20 üzerinde *landomycin* türevi keşfedilmiştir (Shaaban ve ark. 2011).

Landomycin gen kümesinin klonmasından sonra özellikle gen kümesindeki şeker biyosentez genlerinin kombinatoriyal yöntemler ile inhibiyonuna bağlı olarak yeni angucycline metabolitler keşfedilmiştir (Kharel ve ark. 2012).

2004 yılında yapılan bir başka çalışmada ise *Streptomyces antibioticus*'da antitümör etkili angucycline *oviedomycin* gen kümesi klonlanmıştır (Lombo ve ark. 2004).

Yukarıda bahsedilen çalışmalar görüldüğü gibi *tetrangomycin*'in farklı fonksiyonel grubuna sahip türevlerinin biyosentezinden sorumlu gen kümelerinin keşfi yol yıllarda artış göstermektedir. Özellikle glikolize türevleri potent antitümör aktiviteye sahiptir. Bunun nedeni biyolojik hedefler ile etkileşimde şeker ünitelerinin önemli rol oynamasından kaynaklanmaktadır.

Daha önceki çalışmalarda *tetrangomycin*'in özellikle *S.aureus* patojeninin üremesini inhibe ettiği bilinmektedir. Bu açıdan antimikrobiyal analizlerimiz sonucunda MRSA inhibisyonuna neden olması dirençli patojen mikroorganizmaların en önemli sağlık problemi olduğu günümüzde bu açıdan oldukça önemlidir. Ayrıca hastane izolatu *C. albicans* hücrelerine karşı antifungal etkisinin tespiti bileşiğin biyoaktivitesi açısından dikkat çekicidir. Literatürde *tetrangomycin*'in antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

Ochromycinone tetrangomycin'in alkol fonksiyonel grubu bulunmayan türevidir. 2005 yılında yapılan bir çalışmada *ochromycinone*'nin ülser etkeni *Helicobacter pylori*'nin üremesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Sohrab 2005).

Angucycline grubu doğal ürünlerinin en iyi bilinen biyolojik etkilerinden bir diğeri ise antitümör aktiviteye sahip olmalarıdır. *Landomycin* gibi potent sitoksik etkiye sahip angucyclinler buna örnek gösterilebilir. Bu sebepten *tetrangomycin*'in A549 ve LNCaP hücre dizilerine karşı sitotoksik etkisi incelendi. Sitotoksitite testi sonucunda bileşiğin 4.82 μ M ve 4.93 μ M IC_{50} değerleri ile sırası ile LNCaP and A549 hücre dizileri üzerine antitümör etkiye neden olduğu belirlendi. Ulusal kanser enstitüsü (NCI) ham ekstraktların IC_{50} değerinin 20 mg/ml az olması durumunda sitoksik etkisinin dikkate değer olduğunu belirtmektedir. Hem bu veri hem de literatürdeki antitümör etkili doğal ürünlerin IC_{50}

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

değerleri göz önünde bulundurulduğunda *tetrangomycin*'in sitotoksik etkisinin potent olmamakla birlikte dikkate değer olduğu göstermektedir. Ayrıca lietratür araştırmalarında bileşiğin LNCaP hücre dizini ile sitotoksik etkileşimine rastlanmamıştır. Bu açıdan da *tetrangomycin*'in bu hücre dizilerine karşı antitümör aktivitesi oldukça önemlidir.

Taxus baccata L. kök bölgesinden izole edilen *Streptomyces* sp. AC113 izolatının kültür ortamından O-metil *tetrangomycin* (1), 8-O-metiltetrangulol (2) ve 8-O-metil 7-hidroksil *tetrangomycin* (3) bileşikleri izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında her üç bileşikte B16, HT-29 tümörlü hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda 1, 2 ve 3 nolu bileşiklerin B16 hücre dizisi üzerine IC₅₀ değeri sırasıyla 7.13, 0.59 ve 0.0054 µg/ml, HT-29 üzerine ise 66.9, 50 ve 8.58 µg/ml olduğu rapor edilmiştir (Maruna ve ark. 2010).

2011 yılında yapılan bir çalışmada 11 farklı *landomycin* türevi ile birlikte *tetrangomycin*'in MCF-7 ve MDA-231 göğüs kanseri hücreleriyle etkileşimine bağlı olarak IC₅₀ değerleri incelenmiştir. Analizler sonucunda *tetrangomycin*'in MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe etmediği, MDA-231'de ise bu değer 1,55 µM olduğu bildirilmiştir. *Landomycin* türevlerinin ise IC₅₀ değerinin ise 1,5-7 µM arasında değiştiği bildirilmiştir (Shaaban ve ark. 2011).

Deniz aktinomiseti *Streptomyces* sp.W007'in genom dizilimi çalışmaları sonucunda *tetrangomycin* türevi yeni angucycline antibiyotikler keşf edilmiştir. Bu bileşiklerin birinin 10, 1 ve 0.1 µM konsantrasyonlarında A549 hücrelerinin büyümesini sırasıyla %71, %30 ve %5 oranlarında inhibe ettiği rapor edilmiştir (Zhang ve ark. 2012).

Doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin kimyasal yapıdaki fonksiyonel gruplar ile ilgili olduğu bilinmektedir. *Tetrangomycin*'in türevlerindeki fonksiyonel grupların değişime bağlı olarak biyolojik aktivitenin gücünde değiştiği yapılan çalışmalar sonucunda görülmektedir. Örneğin yapıda ekstradan bulunan bir metil ve hidroksil grubu bileşiğin antitümör aktivite potensini arttırdığı, tersi durumda hidroksil grubunun karbonil grubu ile değişiminin etkinin azalmasına neden olduğu görülmektedir. Bununda temellinde ligand ve hedef arasındaki etkileşimde fonksiyonel grupların rol oynaması bulunmaktadır.

Bu sebepten dolayı daha etkin bileşiklerin elde edilmesi için yapı aktivite ilişkisi (SAR) temelli çalışmalar günümüzde yoğunca yürütülmektedir.

Bitkiler değişik kimyasal yapı ve sayıda polifenolik doğal ürün sentezleme potansiyeline sahip olduklarından antioksidant etkili bileşiklerin izolasyonu için en önemli biyolojik kaynaklardır. Antioksidant çalışmalarında bitki orjinli ekstraktların yoğunca çalışılmasının temel nedenlerinden biri de budur. Mikrobiyal kaynaklı ekstraktlar genellikle antioksidant parametrelerin incelenmesinde kullanılmamasıyla birlikte DPPH radikalini söndürme etkisinin incelenmesi önemli antioksidant parametrelerden biridir. Bu sebepten *Streptomyces sp.* CAH29 izolatının etilasetat ekstraktı ve *tetrangomycin*'in DPPH radikalini söndürme etkisi test edildi. Bu test sonucunda ham ekstraktın pozitif kontroller gibi yüksek aktivite gücüne sahip olduğu görüldü. Buna karşın *tetrangomycin*'in ise pozitif kontrollere göre düşük aktivite gücüne sahip olduğu tespit edildi. Ham ekstraktın saf bileşiğe göre etkisinin fazla olmasının nedeni ekstrakt içinde DPPH radikalini söndürme etkisi bulunan birden fazla bileşiğin bulunmasından kaynaklanmaktadır. Kimyasal yapısında aromatik halka içeren bileşikler potansiyel antioksidant metabolitlerdir. *Tetrangomycin*'in de yapısında aromatik grupların bulunması olası DPPH söndürme etkisi olabileceğini düşündürmüştü. Antioksidant testlerde madde miktarı aktivitenin gücü açısından önemlidir. Ham ekstraktın konsantrasyonu 10-500 µg arasında değişirken, *tetrangomycin* saf olarak kullanıldığından 10-150 µg aralığındaki konsantrasyonların etkisi incelendi. Ham ekstrakt grafiği incelendiğinde madde konsantrasyonunun artışına bağlı olarak aktiviteninde arttığı gözlemlendi. Fakat *tetrangomycin* de 100 ve 150µg madde konsantrasyonu aralığında aktivitenin kayda değer ölçüde artmadığı görülmektedir. Bu sebepten *tetrangomycin*'in antioksidant aktivitesinin 150µg'ın üzerindeki konsantrasyonlarda da çok fazla artmayacağı görülmektedir.

Literatürde *tetrangomycin*'in DPPH söndürme aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Sadece deniz orjinli *Dermacoccus* cinsi üyeleri tarafından sentezlenen ve yapı itibarıyla bazı üyeleri *tetrangomycin*'e benzerlik gösteren fenazin yapısındaki *dermacozine* türevi bileşiklerin serbest radikal söndürme etkisi rapor edilmiştir

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

(Manivasagan ve ark. 2014). Bu açıdan bakıldığında *tetrangomycin*'in antioksidant aktivitesinin incelenmesi kayda değerdir.

Doğal ürünler DPPH söndürme etkisi dışında farklı mekanizmalar ile antioksidant etkiye neden olabilmektedir. Buna en güzel örnek hücresel metabolizmada radikal oluşumundan sorumlu bazı metabolik yollardaki enzimlerin inhibisyonu ile bu etkiye neden olabilmeleridir. Angucycline grubu üyesi doğal ürünler önemli enzim inhibitörleri olduğu düşünüldüğünde *tetrangomycin*'in radikalik ürün oluşumundan sorumlu çeşitli oksidaz enzimlerinin inhibisyonuna neden olabileceğini düşündürmektedir.

2011 yılında deniz sedimentinden izole edilen *Actinomyces sp.* izolatından tetrangulol metil eter doğal ürünü izole edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda izole edilen bu bileşiğin menadione benzeri toksik kinon metabolitlerinin oluşumundan sorumlu kinon redüktaz 2 enzimin aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Choi ve ark. 2011).

Son yıllarda dereplikasyon sorunundan ötürü yeni doğal ürün keşfi azalırken bunun aksine mevcut antibiyotiklere dirençli patojenlerinin sayısının artması kitlesel sağlık sorunlarının en önemlilerinden birini teşkil etmektedir. Özellikle hastanelerde dirençli patojenlerinden (MRSA, VRE gibi) ötürü ölüm oranları hızla artmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için yeni doğal ürün araştırmalarının yanına patojenlerde yeni hücresel hedeflerin tespit edilmesi veya dirençlilik mekanizmalarında rol oynayan metabolik yollar inhibisyon mekanizmalarının araştırılması da uygulanabilecek yaklaşımlardır. Bu yaklaşımlar hem yeni hücresel hedeflerin belirlenmesi hem de bilinen doğal ürünlerin farklı hedefler üzerinde etkisinin incelenmesi gerekmektedir.

MRSA'da dirençlilik mekanizmasında rol oyandığı bilinen yeni metabolik yollardan biri *staphyloxanthin* biyosentezidir. *Staphyloxanthin* MRSA patojenlerinde non mevalonat metabolik yoldan sentezlenen bir doğal üründür. Yapılan çalışmalar sonucunda *staphyloxanthin*'in MRSA'larda oksidatif hasarı engelleyici özelliğinden ötürü patojenin dirençliliğinde rol oynadığını bilinmektedir.

2012 yılında yapılan bir çalışmada *tetrangomycin*'in *staphyloxanthin* üretimini engellemesine bağlı olarak MRSA'ların büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Sakai ve

ark. 2012). *Tetrangomycin*'in MRSA inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmesine rağmen, literatürde bu inhibisyon mekanizması ile ilgili herhangi çalışma bulunmamaktadır. *Staphyloxanthin* biyosentez yolağı incelendiğinde, metabolit biyosentezinin ilk aşamasındaki geri dönüşümsüz reaksiyonun gerçekleşmesinde rol oynayan enzimin CrtM olduğu görülecektir. Bundan dolayı *staphyloxanthin* sentezi inhibisyonu için CrtM oldukça önemli hücrenel hedeftir. 'BRENDA' veri tabanında yapılan taramalar sonucunda *tetrangomycin*'in şimdiye dek CrtM inhibisyon ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Tüm bu veriler doğrultusunda *tetrangomycin*'in CrtM ile etkileşiminin incelenmesi için docking çalışmaları yapıldı. Docking çalışmaları sonucunda *tetrangomycin*'in pozitif kontrol 830 gibi enzimin aktif merkezi amino asitleri ile etkileşim içinde olduğu tespit edildi. Her iki ligandın non kovalent etkileşimleri incelendiğinde genel olarak *tetrangomycin*'in pozitif kontrole göre docking skorunun biraz daha düşük olduğu gözlemlendi. Bunun sebebinin pozitif kontrolün zincir yapısının *tetrangomycin*'e göre daha uzun olmasından ötürü Leu¹⁶⁴ ve Val¹³⁷ amino asitleri ile etkileşime girmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği üzere literatürde *tetrangomycin*'in bilinen birçok türevi bulunmaktadır. Bu türevlerin docking analizleri ile yapı aktivite ilişkisi (SAR) ile bağlantılı olarak daha etkili bileşiklerin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir. *Landomycin* örneğinde olduğu gibi yapıdaki şeker ünitesinin sayısına bağlı olarak farklı türevleri bulunmaktadır. Bu sebepten ekstradan şeker üniteli bileşiklerin CrtM etkileşimi bu açıdan dikkat çekici olabilir. Şeker ünitesindeki -OH ve -H gruplarının CrtM aktif merkezindeki aminoasitlerle hidrojen bağı oluşturma potansiyelindeki artışa bağlı olarak bağlanma enerjisinde de bir değişikliğe neden olabilir.

Araştırmacıların 2011 yılında yaptığı bir çalışmada bitki orjinli *genistein*, *orobol*, *resveratrol*, *gallic asit*, *carnosol*, *biochanin* ve *baicalein* gibi doğal ürünlerin MRSA dirençliliğinde rol oynadığı bilinen *penicillin* bağlanma protein 2A (PBP-2A) ile docking analizleri incelenmiştir. İncelemeler sonucunda 70,502 docking skoru ile en iyi etkileşimin *orobol* ile elde edildiği gözlemlenmiştir (Hariprasath 2011).

2013 yılında 38 farklı CrtM inhibitörü ile yapılan çalışmalarında yapı aktivite ilişkisine bağlı modelleme çalışmalarında sonucunda farmakofor grubu hidrofobik

karakterdeki bileşiklerin etkileşiminin hidrojen bağı alıcısı veya vericisi olma durumuna göre daha yüksek docking skoruna sahip olduğu bildirilmiştir (Peng ve ark. 2013).

İnsanlarda sterol biyosentezinden sorumlu squalen sentaz (SQS) enzimi CrtM ile aminoasit benzerliği açısından %36'ya yakın homoloji göstermektedir. Bu sebepten ötürü CrtM inhibitörlerinin aynı zamanda kolesterol sentezi inhibisyonuna neden olup olmadığının tespiti için ligandların SQS etkileşiminde incelenmektedir. Olası CrtM inhibitörleri aynı zamanda kolesterol düşürücü ajan olarak etki gösterebilmektedirler. Tersine durumda kolesterol inhibitörlerinin de CrtM inhibisyonuna neden olabileceği akla gelmektedir.

2010 yılında kolesterol düşürücü ajan olarak bilinen *lapaquistat acetate* ve *squalestatin* bileşiklerinin ligand olarak kullanılmasıyla, CrtM ile docking analizleri yapılmıştır. Araştırmalar sonuçları incelendiğinde ligandları CrtM'in His¹⁸, Arg⁴⁵, Asp⁴⁸, Asp⁵², Tyr¹²⁹, Gln¹⁶⁵, Asn¹⁶⁸ ve Asp¹⁷² ile non kovalent etkileşim bulunduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak her ligandın da CrtM inhibitörü olduğu tespit edilmiştir (Sharma 2010).

2012 yılında mantarlardan izole edilen *zaragoic asit* doğal ürününün ligand olarak hem CrtM hem de SQS ile etkileşimi docking analizleri ile incelenmiştir. Analiz sonucunda bileşiğin her SQS' un aktif merkezindeki Ser⁵³, Phe⁵⁴, Leu²¹¹, Met²⁹⁵ ve Ala²⁹⁶ ile hidrofobik etkileşimde olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde bileşiğin CrtM'nin Tyr²⁴⁸, Phe²², Leu¹⁶⁴'ü ile nonkovalent etkileşime girdiği rapor edilmiştir. Tüm veriler doğrultusunda araştırmacılar *zaragoic asit*'in her iki enzim inhibisyonunun rol oynadığını docking analizleri ile ortaya koymuştur (Liu ve ark. 2012).

Literatürde farklı metabolitlerin CrtM enzimi ile yapılan docking çalışmaları sonucunda hidrofobik grupta metabolitlerin enzimin hidrofobik paketi ile etkileşimi açısından önemli olduğunu göstermektedir. Bu açıdan *tetrangomycin*'in aromatik halka karbonlarının bu etkileşimde rol oynadığı görülmektedir. Enzimin aktif merkezindeki Arg⁴⁵ amino asiti ligandların bağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Amino asitin yapısında bulunan amin grubundaki hidrojen atomunun fosfat ve karbonil vb fonksiyonel gruplar ile hidrojen bağı ile etkileşime girmesi inhibisyon etkisi açısından oldukça önemli olduğu görülmektedir.

Mikroorganizmalar bulunmuş oldukları habitatlarda birbiri ile etkileşim halinde bulunmaktadır. Bu etkileşim agonistik, antagonistik, sinerjistik veya simbiyotik şeklinde olabilmektedir. Ayrıca yaşam alanlarındaki besin sıkıntısı vb. çeşitli çevresel stress koşullarında tüm canlılarda olduğu gibi mikroorganizmalarda da tür içi veya türler arasında canlılığın devamı için rekabet oluşmaktadır. Bu rekabet koşullarında canlılık açısından daha avatajlı hale gelmek için ortama en iyi derece adaptasyon sağlamaları gerekir. Bunun yanında tüm mikroorganizmalar habitatlarında izole halde değil de, birbiri ile etkileşim içinde topluluklar halinde yaşamaktadırlar. Bu durumda mikroorganizmaların kendi savunma sistemlerini oluşturmalarına neden olmaktadır. Mikrobiyal habitatın üyeleri tüm bu sorunların üstesinden gelebilmek için savunma, adaptasyon, haberleşme vb. durumlarında doğal ürünler sentezlemektedirler.

Antibiyotikler genel olarak hücrelerde peptidoglikan, protein, DNA sentezi gibi çeşitli metabolik olayları inhibe etmektedirler. Aşırı miktarda antibiyotik kullanımı ve yatay gen transferi sonucunda patojen mikroorganizmalar hücrel hedeflerde kimyasal modifikasyon, yeni reseptör ve hücrel makromolekül sentezi vb mekanizmalar ile dirençlilik kazanmaktadır. Bu da antibiyotikler için yeni hücrel hedef ve mekanizmaların ortaya çıkarılması gereğini ortaya çıkarmaktadır. Tetrangomycin'in CrtM ile etkileşimi hem yeni bir inhibisyon mekanizmasının ortaya çıkarılması hem de bilinen bir doğal ürünün yeni bir hücrel hedef ile etkileşimin ortaya çıkarması açısından da oldukça önemlidir.

4.2.3. *Salinispora* İzolatlarının Doğal Ürün Biyosentez Gen Kümelerinin Biyoinformatik Programlarda İncelenmesi

Çeşitli canlı gruplarının genom dizilim projeleri her geçen gün artmaktadır. Özellikle son on yıl içinde mikrobiyal genom projelerinin sayısının logaritmik oranda artmıştır. 2015 yılı ile birlikte NCBI gen bankası veritabanında 300.000'in üzerinde kayıtlı nükleotit dizilimi mevcuttur (Benson ve ark. 2015). Klasik laboratuvar şartlarında kültüre edilemeyen mikroorganizmaların metagenom analizlerinin gerçekleştirilmesi bu artışın en temel nedenlerinden biridir. 2008 yılında başlatılan insan mikrobiom projesi (HMP) kapsamında insan vücudunun belli kısımlarındaki mikroorganizmaların metagenomik temelli araştırılmasını amaçlamaktadır (www.human-microbiome.org). Bir taraftan NCBI

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

gibi veritabanlarında DNA dizilimlerinin birikimi, bu dizilimlerin analiz için gerekli programların geliştirilmesine neden olmaktadır. Hem biyoloji hem kimya alanındaki informatik gelişmeler doğal ürün araştırmalarını bu açıdan etkilemektedir. Doğal ürün tarama paradigması DNA dizilim maliyetlerinin azalması sonucunda klasik yöntemler uygulanmaksızın genomların biyoinformatik programlar ile taranması sonucunda değişmiştir.

Doğal ürün araştırmalarında biyoinformatik temelli çeşitli mikroorganizma genomlarının taranması yeni bileşiklerin keşfi ve bu mikroorganizmaların genetiksel potansiyellerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Bu yöntemin en önemli avantajı doğal ürün temelli araştırmalarda dereplikasyon sorununu çözmesidir.

‘NapDOS’ ve ‘antiSMASH’ mikrobiyal genomlarda doğal ürün gen kümelerinin taranmasında kullanılan en önemli biyoinformatik programlardır (Boddy 2014). Bu sebepten *Salinispora* izolatlarının doğal ürün gen kümelerinin taranmasında bu iki biyoinformatik program kullanıldı. İzolatların ‘antiSMASH’ analizleri incelendiğinde, genel olarak *S. arenicola* izolatlarında tespit edilen toplam gen kümesi sayısının *S. pacifica* ve *S. tropica*’ya göre daha fazla olduğu görüldü. *S. arenicola* genomlarının cinsin diğer iki üyesinden yaklaşık 300 kb uzun olduğu düşünüldüğünde genom büyüklüğüne bağlı olarak sayımında artması söz konusudur. ‘antiSMASH’ analizlerinin dikkat çeken bir diğer sonucu ise NRPS ve PKS ilişkili yolakların sayıca oranın %50’ye yakın olmasıdır. ‘antiSMASH’ özellikle NRPS ve PKS gen kümelerinin tespitini %99 doğruluk oranında gerçekleştirmektedir. Bunun temel nedeni hem NRPS hem de PKS’de korunmuş bölgelerin programca analizi kolay şekilde gerçekleştirilmesidir. Fakat terpen sentezinden sorumlu enzimleri kodlayan genlerin NRPS ve PKS gibi fazlca korunmuş bölgeye sahip olmayıp değişkenlik göstermesinden ötürü bu gen kümelerinin analizini zorlaştırmaktadır. Program tarafından NRPS ve PKS’lerin sayı ve doğruluk açısından yüksek oranlarda tespiti bu açıdanda değerlendirilmelidir.

‘NapDOS’ sonuçları incelendiğinde özellikle *S. pacifica* CNY666 izolatının NRPS ve PKS domain çeşitliliği *S. arenicola* ve *S. tropica*’ya göre çok fazla olduğu görülmektedir. Biyoinformatik incelemeler *S. pacifica* türlerinde doğal ürün çeşitliliğinin en

fazla olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde 2013 yılında yapılan bir çalışmada genom dizilimi bilinen 75 farklı *Salinispora* izolatı genomunun ‘NapDOS’ analizleri sonucunda *S. pacifica* izolatların doğal NRPS ve PKS gen kümelerinin cinsin diğer iki üyesine göre daha fazla çeşitlilik gösterdiği ortaya koyulmuştur (Ziemert ve ark. 2014).

‘NapDOS’ ve ‘antiSMASH’ temelde doğal ürün gen kümelerinin taranmasında kullanılsa bile, kullanım amaçları birbirinden farklıdır. ‘antiSMASH’ gen kümesindeki hem biyosentez hem de bunun dışındaki regulasyon, modifikasyon, taşıma, dirençlilik gibi genlerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Fakat ‘NapDOS’ sadece NRPS ve PKS gen kümelerinin kodensasyon ve ketosentaz domainlerinin analizinde kullanılmaktadır. ‘antiSMASH’ ve ‘NapDOS’ analizleri incelendiğinde tespit edilen NRPS ve PKS gen kümesi sayıları birbiri ile uyum içinde olduğu görülecektir. Bu veri her iki programında yüksek doğrulukta genlerin tespit edildiğini göstermektedir.

4.2.4. *Salinispora* İzolatlarının ‘GNPS’ Dereplikasyon ve Network Analizleri

Son yıllarda yeni doğal ürün keşfi oranlarının azalmasının temel nedeni geleneksel yöntemlere dayalı doğal ürün araştırmalarında dereplikasyon problemin ortaya çıkmasıdır. Örneğin 1960-1980 yılları arasında *streptomyces* cinsinin üyelerinden her yıl 75 yeni antibiyotik keşfedildiği, bu oranın 1980-2000 yılları arasında ise 20’ye düştüğü rapor edilmiştir (Baltz 2006). Dereplikasyon probleminin üstesinde gelmek için son yıllarda genom temelli bioinformatik programların kullanılmasını ek olarak kimyasal verilerin de bu amaçla değerlendirilmesine yönelik inforatik veritabanları geliştirilmektedir. GNPS veri tabanı bu tip inforatik programların en yenilerinden biridir. Bilinen bileşiklerin daha ekstrakt halinde hızlıca tespit edilmesi açısından oldukça önemli bir yaklaşımdır.

Bu sebepten ötürü tüm *Salinispora* izolatlarının dereplikasyon analizleri GNPS programı ile gerçekleştirildi. Analiz sonucunda 30 izolatın 9’unun ham ekstraktında bilinen bileşiklere rastlanmadı. Bu izolatlardan birinin *S. pacifica* CNY666 olduğu tespit edildi. Bu izolatın ‘NapDOS’ analizleri incelendiğinde *rifamycin*, *salinilactam* ve *cyanosporaside* gibi bilinen doğal ürünlerin biyosentez genlerine sahip olmasına rağmen dereplikasyon analizlerinde bilinen bileşiklerin tespit edilmemesi oldukça dikkat çekicidir. Benzer şekilde

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

S. pacifica CNS860 ve *S. tropica* CNT250'nin genetiksel olarak salinosporamide A sentezi potansiyeli olmasına rağmen bu izolatların dereplikasyon analizlerinde bu bileşiğe rastlanmadı. Bu çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir. Bilindiği üzere doğal ürün biyosentezi sekonder metabolizma sonucu gerçekleşmektedir. Doğal ürün sentezi için gerekli monomerler primer metabolizma sonucu oluşan ara metabolitlerden sentezlenmektedir. Bu sebepten primer ve sekonder metabolizma birbiri ile ilişkilidir. Literatür de belirtildiği üzere bu ilişkiden dolayı doğal ürün biyosentezi mikroorganizmanın büyüme ortamının bileşenleri ile yakından ilişkilidir (Özakın 2010). Genetik potansiyeli olmasına rağmen dereplikasyon analizlerinde bu bileşiklerin tespit edilememesinin nedenlerinden biri kullanılan besiyerinin ilgili doğal ürünün sentezi için uygun olmadığı düşünülebilir. İkinci bir neden ise ekstrakt içindeki madde miktarının konsantrasyonun çok düşük olmasından kaynaklanabilir. Son olarak gen kümesinin kriptik karakterde olmasından ötürü gerçekleşmiş olabilir. Özellikle NapDOS analizleri incelendiğinde izolatların sahip olduğu NRPS ve PKS genlerinin çoğunun ürünü bilinmemektedir. Bu sonuçta bu gen kümelerinin bir kısmının kriptik özellikte olduğunu göstermektedir.

Tüm izolatların etilasetat ekstraktlarının MS/MS spektrumların toplanması sonucunda GNPS network analizleri gerçekleştirildi. Networkta öncelikle spesifik moleküler iyonlar analiz edildi. Networkta 'A' olarak adlandırılan kümenin menekşe renkli dördümlü alt kümesinin bu açıdan oldukça dikkat çekici olduğu gözlemlendi. Bilindiği üzere bu alt küme *S. pacifica* CNY703 izolatın ekstraktından elde edilen MS/MS verilerden elde edilirken, her bir kutucuktaki moleküler iyonların 324.168, 338.183, 366,214 ve 380.23 olduğu tespit edildi. 'A' kümesi dikkatlice incelendiğinde 366,214 moleküler iyonunun *staurosporine*'in moleküler iyonu olan 467.182 ile MS/MS spektrumlarının benzerliğinden dolayı etkileşim içinde olduğu gözlemlendi. Bu sebepten *S. pacifica* CNY703 biyoinformatik analizleri gözden geçirildi ve indol biyosentez gen kümesine sahip olduğu görüldü. Fakat izolatın dereplikasyon analiziyle izolattan elde edilen ekstrakta *staurosporine* ve 7-OH *staurosporine* bulunmadığı tespit edildi. Ayrıca 366,214 moleküler iyonunun MS/MS fragmentasyonun hem *staurosporine* hem de 7-OH *staurosporine* MS/MS fragmentasyondan farklılık gösterdiği belirlendi. Bu nedenlerden dolayı networkta *staurosporine* moleküler iyonu ile etkileşimde olan dördümlü alt kümedeki iyonların farklı bir

bileşiğe ait olduğu düşünöldü. Bir diğer önemli veri ise 366,214 MS/MS fragmentasyonun spesifik şeker B ve Y iyonlarını içermesidir. Bu da ilgili bileşiğin *staurosporine* de olduğu gibi şeker grubuna sahip olduğunu göstermektedir. *S. pacifica* CNY703'ün biyoinformatik incelemeleri kontrol edildiğinde indol gen kümesinde olduğu gibi spesifik şeker biyosentez genlerinin bulunduğu NRPS-PKS gen kümesine sahip olduğu belirlendi. *Staurosporine* gen kümesinde bulunan *staD* geni ile benzer homolojiye sahip ferritin benzeri genin yine NRPS-PKS gen kümesinde bulunduğu gözlemlendi. Bu sebepten ötürü ilgili bileşiğin NRPS-PKS ürünü olduğu düşünöldü.

Staurosporine biyosentezi incelendiğinde iki triptofan amino asidinden sentezlenmektedir. 467.182 ve 366,214'ün MS/MS spektrumlarının 'GNPS' analizleri sonucunda benzerlik gösterdiği verisinden yola çıkıldığında *staurosporine* ve ilgili bileşiğin ana iskeletinin benzerlik göstermesi gerektiği düşünöldü. 'antiSMASH' analizleri sonucunda NRPS-PKS gen kümesindeki adenilasyon domainlerinden birinin substrat olarak triptofanı seçtiği tespit edildi. Böylece her iki bileşiğin iskelet kısmında benzerlik olabileceği kimyasal ve biyoinformatik verilerle desteklenmiş oldu. Bileşiğin UV spektrumu veri tabanında incelendiğinde ilk sırada *staurosporine* ile benzerlik göstermesi yine iskelet yapıda benzerlik olduğuna dair başka işaretler. Bir diğer veri ise UV spektrumunun veri tabanında kinon halkalı bileşikler işaret etmesiydi. NRPS-PKS gen kümesi ürünün yapısında triptofan, glisin, lösin veya izölösün aminoasitlerinin bulunduğu biyoinformatik analizlerle belirlendi. İkili ve üçlü peptitlerin bazı durumlarda halkasal bir yapı oluşturarak diketopiperazine halkası oluşturmaktadırlar (Xu ve ark. 2014). Kimyasal yapı olarak diketopiperazin halkası kinon fonksiyonel grubuna benzemektedir. UV analizlerinin kinon halkasını işaret etmesi ilgili bileşiğin yapısında diketopiperazine halkası olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca 366.124 ve 683 iyonlarının UV spektrum analizlerinin benzer olduğu tespit edildi.

Dereplikasyon analizleri sonucunda ilgilenebilecek bileşiğin *staurosporine* olmadığı tespit edilmiştir. NRPS-PKS gen kümesinin kondensasyon ve ketosentaz domainlerinin 'NapDOS' analizleri incelendiğinde gen kümesi ürünün bilinmediği tespit edildi. Sonuç olarak MS verisinden yola çıkarak ilgili gen kümesine ulaşmaya çalışıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

İndol ve NRPS-PKS gen kümeleri incelendiğinde her iki gen kümesinin benzer şeker biyosentez genleri içerdiği tespit edildi. Bu genlerden 2,3 dehidrataz, aminotransferaz ve O-metil transferaz spesifik, geri kalan diğer genler ise yaygın şeker biyosentez genleridir (Kersten ve ark. 2013).

Deniz aktinomiseti *Streptomyces* sp. SPB74 ve *S. arenicola* CNB-527 genomlarında glikolize doğal ürün biyosentez gen kümeleri ve bu gen kümelerine dahil spesifik şeker biyosentez genleri glikogenomik yöntemle taranmıştır. Yapılan taramalar sonucunda *Streptomyces* sp. SPB74 in antitümör etkili cinerubin B, diğer izolatan ise yeni bir antibiyotik olan *arenimycin* B'yi sentezledikleri tespit edilmiştir (Kersten ve ark. 2013).

Salinispora türleri doğal ürün araştırmalarında kullanılan model deniz aktinomisetlerindedir. Bu sebepten ötürü 35 farklı *Salinispora* izolatu ekstraktlarında 'GNPS' dereplikasyon analizleriyle *rifamycin*, *cyclomarin*, *staurosporine*, *saliniketal*, *cyanosporaside* ve desferrioxamine gibi metabolitler tespit edilmiştir. Ayrıca GNPS verilerinin biyoinformatik analizleri ile karşılaştırılması sonucunda peptid yapıdaki retimycin A metabolitinin biyosentez gen kümesine ulaşılmıştır (Duncan ve ark. 2015).

5. SONUÇLAR

1) Endemik bitki kök bölgesi *Streptomyces* izolatlarının NRPS ve PKS genleri açısından çeşitlilik gösterdiği tespit edildi.

2) Altmış beş *Streptomyces* izolatının tümünde bir çift dejerene primerle ile NRPS geni adenilasyon domaini PCR ile amplifiye edildi. İzolatların 51'inde ise ayrıca PKS geni ketosentaz domaini amplifikasyonu gerçekleştirildi.

3) Adenilasyon ve ketosentaz domainlerine sahip klonların BLAST X analizleri sonucunda elde edilen domainlerin çoğunun şimdiye kadar bulunmuş olanlarla düşük homoloji gösterdiği tespit edildi.

4) İzolatlara ait adenilasyon domain dizilimleri, substrat tahmini yapan veri tabanında incelendiğinde, bu domainlerin %25'inin substratının program tarafından tahmininin yapılamadığı görüldü.

5) *Streptomyces* CAH29 izolatının kültür ortamından *tetrangomycin* bileşiği saflaştırıldı. Biyolojik aktivite testleri sonucunda bileşiğin antibakteriyel ve antifungal aktivitesi tespit edildi. İzolatın ham ekstraktının güçlü DPPH radikali söndürme etkisi gözlenirken, *tetrangomycinin* etkisinin ham ekstrakt ve pozitif kontrollere göre düşük olduğu görüldü. Ayrıca *tetrangomycinin* LNCaP ve A549 kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi tespit edildi.

6) Docking incelemeleri sonucunda *tetrangomycin*'in CrtM'in aktif merkez aminoasitleri ile nonkovalent etkileşimleri olduğu tespit edildi. *Tetrangomycinin* enzime bağlanma enerjisinin ise pozitif kontrol olarak kullanılan inhibitöre yakın olduğu belirlendi.

7) Farklı tropik ve subtropik okyanus sediment örneklerinden izole edilmiş 30 *Salinispora* izolatı genomlarının biyoinformatik programlarda incelenmesi sonucunda bu izolatların genomlarında bulunan doğal ürün biyosentez gen kümeleri belirlendi. Bunun sonucunda *Salinispora* cinsinin doğal ürün sentezleme potansiyelinin genetiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi.

5. SONUÇLAR

8) *Salinispora* izolatu ekstraktlarının MS/MS verilerinin GNPS programında incelenmesi sonucunda dereplikasyon analizleri gerçekleştirildi. Bunun sonucunda izolat ekstraktlarında *staurosporine*, *saliniketal*, *rifamycin*, *lomaiviticin* ve *cyanosporaside* bileşikleri tespit edildi.

9) Dereplikasyon ve biyoinformatik analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda *Salinispora pacifica*, CNY666'nın olduğu gibi izolatların kriptik doğal ürün gen kümelerine sahip olduğu görüldü.

10) *Salinispora* moleküler network analizleri sonucunda izolata spesifik MS/MS spektrumları belirlendi. Bu veriler doğrultusunda MS tabanlı genom taramaları gerçekleştirildi.

11) MS tabanlı genom taramaları sonucunda *Salinispora pacifica* CNY703 izolatu genomunda spesifik şeker biyosentez genlerine sahip NRPS-PKS gen kümesi tespit edildi.

6. KAYNAKLAR

- Abdelfattah, M.S., Kharel, M.K., Hitron, J.A., Baig, I., Rohr, J. 2008. Moromycins A and B: Isolation and Structure Elucidation of C-Glycosylangucycline Type Antibiotics from *Streptomyces* sp. KY002. *J Nat Prod*, 7: 1659-1573.
- Abdelmohsen, U.R., Yang, C., Horn, H., Hajjar, D., Ravasi, T., Hentschel, U. 2014. Actinomycete from Red Sea Sponges: Sources for Chemical and Phylogenetic Diversity. *Mar. Drugs*, 12: 2771-2789.
- Adegboya, M.F., Babalola, O.O. 2015. Evolution of Antibiotic Biosynthetic Potential of Actinomycete Isolates to Produce Antimicrobial Agents. *British Microbiol. Res.* 7: 243-254.
- Ayuso-Sacido, A., Genilloud, O. 2005. New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. *Microb Ecol*, 49: 10-24.
- Ayuso, A., Clark, D., Gonzalez, I., Salazar, O., Anderson, A., Genilloud, O. 2005. A Novel Actinomycetes Strain de-replication Approach Based on the Diversity of Polyketide Synthase and Nonribosomal Peptide Synthetase Biosynthetic Pathways. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67: 795-806.
- Baltz, R.H. 2008. Renaissance in Antibacterial Discovery from Actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol*, 8: 557-563.
- Bartlett, J.G., Gilbert, D.N., Spellberg, B. 2013. Seven Ways Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 56: 1445-1450.
- Barrios-Lierena, M.E., Burja, A.M., Wright, P.C. 2007. Genetic Analysis of Polyketide Synthase and Peptide Synthetase Genes in Cyanobacteria as a Mining Tool for Secondary Metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34: 443-456.
- Bernier, S.P., Surette, M.G., 2013. Concentration Dependent Activity of Antibiotics in Natural Environments. *Front. Microbiol.*, 4:20-27.
- Bertin, M.J., Schwartz, S.L., Lee, J., Korobeynikov, A., Dorrestein, P.C., Gerwick, L., Gerwick, W.H. 2015. Spongiosine Production by a *Vibrio harveyi* strain Associated with the Sponge *Tectitethya crypta*. *J. Nat. Prod.*, 78: 493-499.
- Benson, D.A., Clark, K., Mizrachi, I.K., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. 2015. GenBank. *N.A.R* 43: 30-35.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J.,

Hopwood, D.A. 2002. Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417: 141-147.

Blin, K. Medema, M.H. Kazempour, D., Fischbach, M.A. Breitling, R., Takano, E., Weber, T. 2013. AntiSMASH 2.0-a Versatile Platform for Genome Mining of Secondary Metabolite Producers. *Nucleic Acids Res*, 41: 204-212.

Boddy, C.N. 2014. Bioinformatics Tools for Genome Mining of Polyketide and Non Ribosomal Peptides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41: 443-450.

Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Laatsch, H., 2007. AntiMarin Database; University of Canterbury: Christchurch, New Zealand; University of Göttingen: Göttingen, Germany.

Buchanan, G.O., Williams, P.G., Feling, R.H., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2005. Sporolides A and B: Structurally Unprecedented Halogenated Macrolides from Marine Actinomycete *Salinispora tropica*. *Org Lett*, 7: 2731-2734.

Bull, A.T., Stach, E.M. 2010. Marine actinobacteria: New Opportunities for Natural Product Search and Discovery. *Trends Microbiol*, 15, 491-499.

Burkhardt, K., Fiedler, H.P., Grabley, S., Zeeck, A. 1996. New Cineromycin and Musacins Obtained by Metabolite Pattern Analysis of *Streptomyces griseoviridis* FH-S 1832 I. Taxonomy Fermentation Isolation and Biological Activity. *J. Antibiot.* 49: 432-437.

Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Kutter, E., Lerner, S.A., Lewis, K., Watson, J.D., Wright, G. 2011. Tackling Antibiotic Resistance. *Nat. Microbiol.*, 9: 894-896.

Bülent BALI. 2011. Karasal Ortamlardan İzole Edilen *Streptomyces* Türlerinin Sekonder Metabolit Biyosentez Genlerinin Taranması. . Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 1-72.

Caboche, S., Pupin, M., Leclere, V., Fontaine, A., Jacques, P., Kucherov, G. 2008. Norine: Database of Non-Ribosomal Peptides. *Nucleic Acids Res*, 36: 326-331.

Cannell, R.J.P. 1998. How to Approach the Isolation of a Natural Product, Humana Press, Totowa, 1-51.

Challis, G.L. 2008. Genome Mining for Novel Natural Product Discovery. *J. Med. Chem.*,51: 2618-2628.

Chen, C.F., Hwang, J.M., Lee, W., Chiang, H.C., Lin, J.C., Chen, H.Y. 1988. Search for Antitumor Agent for Chinese Herbs I. Antitumor Screening Method. *Chin Med J*, 41: 177-184.

Cheng, Y.B., Jensen, P.R., Fenical, W. 2013. Cytotoxic and Antimicrobial Napyradiomycin from Two Marine Derived *Streptomyces* strains. *Eur J Org Chem*, 10: 3751-3757.

Choi, Y., Jermihov, K., Nam, S.J., Sturdy, M., Maloney, K., Qiu, X., Chadwick, L.R., Main, M., Chen, S.N., Mesecart, A.D., Farnsworth, N.R., Pauli, G.F., Fenical, W., Pezzuto, J.M., Breemen, R.B.V. 2011. Screening Natural Products for Inhibitors of Quinone Reductase-2 Using Ultrafiltration Lc-MS. *Anal. Chem.* 83: 1048-1052.

Coates, A., Hu, Y., Bax, R., Page, C. 2002. The Future Challenges Facing the Development of New Antimicrobial Drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 1:895-910.

Cortes, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D.J., Leadlay, P.F., 1990. An Unusually Large Multifunctional Polypeptide in the Erythromycin-Producing Polyketide Synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature*, 348: 176-178.

Cortina, N.S., Krug, D., Plaza, A., Revermann, O., Muller, R. 2012. Myxoprincomide: A Natural Product from *Myxococcus Xanthus* Discovered by Comprehensive Analysis of the Secondary Metabolome. *Angew Chem Int Ed*, 51: 811-816.

Cui, Q, Lewis, I.A., Hegeman, A.D., Anderson, M.E., Li, J., Schulte, C.F., Westler, W.M., Eghbalian, H.R., Sussman, M.R., Markley, J.L. 2008. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol*, 26(2):162–164.

Custido, A.N.B., Alcantara, E.P., Zulaybar, T.O. 2014. Draft Genome Sequence of Insecticidal *Streptomyces* sp. Strain PCS3-D2 Isolated from Mangrove Soil in Philippines. *Genome Announc.*, 2: 1-3.

Daniel, R. 2004. The Soil Metagenome-a Rich Resource for the Discovery of Novel Natural Products. *Curr Opin Biotechnol*, 15: 199-204.

Dann, M., Lefemine, D.V., Barbatschi, F., Shu, P., Kunstmann, M.P., Mitscher, L.A., Bohonos, N. 1965. Tetrangomycin, a New Quinone Antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*, 5: 832-835.

Davo, A.P., Fenical, W., Jensen, P. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aqu. Microbiol. Ecology*, 52:1-11.

Demain, A.L. 2009. Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health. *Med Res Rev*, 29: 821-842.

Dewar, M.J.S., Zoebisch, E.G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P. 1985. Development and Use of Quantum Mechanical Molecular models. 76. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J Am Chem Soc*, 107: 3902-3909.

Donadino, S. 2000. Multiple Peptide Synthetase Gene Cluster in Actinomycetes. *Mol Gen Genet*, 264: 213-221.

Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M., Puglia, A.M. 2002. Microbial Technologies for the Discovery of Novel Bioactive Metabolites. *J Biotechnol*, 99: 187-198.

Donadio, S., Monciardini, P., Sosio, M. 2007. Polyketide Synthase and Non-Ribosomal Peptide Synthetases, The Emerging View from Bacterial Genomics. *Nat Prod Rep*, 24: 1073-1109.

Duncan, K.R., Crüsemann, M., Lechner, A., Sarkar, A., Li, Ji., Ziemert, N., Wang, M., Bandeira, N., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Jensen, P.R. 2015. Molecular Networking and Pattern Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species. *Cell*, 22: 460-471.

Ehrenreich, I.M., Waterbury, J.B., Webb, E.A. 2005. Distribution and Diversity of Natural Product Genes in Marine Freshwater Cyanobacterial Cultures and Genomes. *Appl Environ Microbiol*, 71: 7401-7413.

Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a Highly Cytotoxic Proteasome Inhibitor from a Novel Microbial Source a Marine Bacterium of the New Genus *Salinispora*. *Angew Chem Int Ed*, 42, 355-357.

Fenical, W., Jensen, P.R. 2006. Developing a New Resource for Drug Discovery: Marine Actinomycete Bacteria. *Nat Chem Biol*, 2, 666-673.

Finking, R., Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of Nonribosomal Peptides *Annu. Rev. Microbiol.*, 58:453-488.

Fischbach, M.A., Walsh, C.T. 2006. Assembly-Line Enzymology for Polyketides and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery and Mechanisms. *Chem Rev*, 106: 3468-3496.

Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M. 2005. The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270: 175-190.

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery, J.A., Vreven, T., Kudin, K.N., Burant, J.C., Millam, J.M., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J.E., Hratchian, H.P., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Ayala, P.Y., Morokuma, K., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Zakrzewski, V.G, Dapprich, S., Daniels, A.D., Strain, M.C., Farkas, O., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cui, Q., Baboul, A.G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Gonzalez, C., Pople, J.A. 2004. Gaussian 03, Revision C.02, *Gaussian Inc.*, Wallingford CT.

Galm, U., Schimana, J., Fiedler, H.S., Schmidt, J., Shu, M.L., Heide, L.2002. Cloning and Analysis of the Simocyclinone Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Arch Microbiol*, 178: 102-114.

Geran, R.I, Greenberg, N.H, Macdonald, M.M, Schumacher, A.M, Abbott, B.J. 1972. Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems. *Cancer Chemother Rep*, 3: 51-61.

Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. 2007. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol*, 73(10): 3272-3282.

- Gontang, E.A., Gaudencio, S.P., Fenical, W., Jensen, P.R. 2010. Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 76(8): 2487-2499.
- Gonzales, I., Angel-Ayuso, S., Anderson, A., Genilloud, O.2005. Actinomycetes Isolated from lichens: Evaluation of Their Diversity and Detection of Biosynthetic Gene Sequences. *FEMS Microbiol Ecol*, 54:b401-415.
- Gonzalez, D.J., Xu, Y., Yang, Y.L., Edlund, A., Duong, T., Du, L., Gerwick, W.H., Jensen, P.R., Nizet, V., Dorrestein P.C., 2012. Observing the Visible Through Imaging Mass Spectrometry a Window into the Metabolic Exchange Patterns of Microbes. *J. Proteo.*, 16: 5069-5076.
- Gross, H. 2007. Strategies to Unravel the Function of Orphan Biosynthesis pathways: Recent Examples and Future Prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75: 267-277.
- Gross, H., Stockwell, V.O., Henckels, M.D., Nowak, T.B., Loper, J.E., Gerwick, W.H. 2007. The Genomisotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Cluster. *Chem Biol*, 14: 53-63.
- Grüning, B.A., Erxleben, A., Hahnlein, A., Günther, S. 2013. Draft Genome sequence of *Streptomyces viridochromogenes* strain Tu57, producer Avilmaycin. *Genome Announc.* 1: 1-13.
- Hakvag, S., Fjaervik, E., Josefsen, K.D., Ian, E., Ellingsen, T.E., Zotchev, S.B. 2008. Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from the Sea Surface Microlayer in the Trondheim Fjord Norway. *Mar Drugs*, 6: 620-635.
- Hariprasath, B. 2011. Molecular Docking Studies of Plant Derived Compounds. *A. J. Pharma. Cli. Res.* 5: 86-88.
- Harrison, J., Studholme, D.J. 2014. Recently published *Streptomyces* genome sequences. *Microbiol. Biotech*, 7: 373-380.
- Hodges, T.V., Slattery, M., Olson, J.B. 2012. Unique Actinomycete from Marine Caves and Coral Reef Sediments Provide Novel PKS and NRPS Biosynthetic Gene Clusters. *Mar. Biotechnol.*, 14:270-280.
- Hopwood, D.A. 1999. Forty Years of Genetics with *Streptomyces*: from *In Vivo* Through *In Vitro* in silico. *Microbiol UK*, 9: 2183-2202.
- Hopwood, D.A. 2007. *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. *Oxford University Press*.
- Hong, S.T., Carney, J.R., Gould, S.J. 1997. Cloning and Heterologous Expression of the Entire Gen Clusters for PD116740 from *Streptomyces* strain WP 4669 and Tetrangulol and Tetrangomycin from *Streptomyces rimosus* NRRL 3016. *J. Bacteriol.* 2: 470-476.
- Hosaka, T., Ochi K. 2013. New Strategies for Drug Discovery: Activation of Silent or Weakly Expressed Microbial Gene Cluster. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 87-98.

6.KAYNAKLAR

Hwang, K.S., Kim, H.U., Charusanti, P., Palsson, B.Q., Lee, S.Y. 2014. System biology and biotechnology of *Streptomyces* species for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 32: 255-268.

İsmail ACER. 2011. Endemik Bitki Rizosferlerinden İzole Edilen Lokal Aktinomisetlerde Mikrobiyal Sekonder Metabolitlerin Sentezinden Sorumlu Genlerin Taranması. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 1-80.

Ichikawa, N., Sasagawa, M., Yamamoto, M., Komaki, H., Yoshida, Y., ,S., Fujita, N. 2013. DoBISCUIT: A Database of Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters D414. *Nucleic Acids Res*, 41: 408-414.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Omura, S. 2003. Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*, 21: 526-531.

İknur PORSUK. 2011. Endemik Bitki Rizosferlerinden İzole Edilen Sekonder Metabolit Üreticisi Aktinomisetlerin Ribozomal Olmayan Peptid Sentetaz (NRSP) ve Poliketid Sentaz (PKS-I) Genlerinin Taranması. . Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 1-77.

Jang, K.H., Nam, S.J., Locke, J.B., Kauffman, C.A., Beatty, D.S., Paul, L.A., Fenical, W. 2013. Anthracimycin, a Potent Anthrax Antibiotic from a Marine-Derived Actinomycete. *Angew Chem Int Ed*, 52: 7822-7824.

Janso, J.E., Carter, G.T. 2010. Biosynthetic Potential of Phylogenetically Unique Endophytic Actinomycetes from Tropical Plants, *Appl Environ Microbiol*, 76(13):4377-4386.

Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K. J., Li, X. 2007. Diversity of Culturable Actinobacteria Isolated from Marine Sponge *Haliclona* sp. *Anton Leeuwenhoek*, 92: 405-416.

Jiang, S., Li X., Zhang, L., Sun, W., Dai, S., Xie, L., Liu, Y., Lee, K.J. 2008. Culturable Actinobacteria Isolated from Marine Sponge *Iotrochota* sp. *Mar Biol*, 153: 945-952.

Jenke, K., Sandman, A., Müller, R. 2005. Evolutionary Implications of Bacterial polyketides synthases. *Mol. Biol. Evol.* 10: 2027-2039.

Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J., Fenical, W. 2005. Culturable Marine Actinomycete Diversity from Tropical Pacific Ocean Sediments. *Environ Microbiol*, 7(7): 1039-1048.

Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., Fenical, W. 2005. Marine Actinomycete Diversity and Natural Product Discovery. *Anton Leeuwenhoek*, 87: 43-48.

Jensen P.R., Mafnas C. 2006. Biogeography of the Marine Actinomycete of the genus *Salinispora*. *Environ Microbiol*, 8:1881-1888.

Jensen P.R., Moore, B.S., Fenical, W. 2015. The marine actinomycete genus *Salinispora*: model organism for secondary metabolite discovery. *Nat. Prod. Rep*, 32: 738-751.

Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J.P., Lockhart, D.J., Milanov, Z.V., Morrison, M.J., Pallares, G., Patel, H.K., Pritchard, S., Wodicka, L.M., Zarrinkar, P.P. 2008. A Quantitative Analysis of Kinase Inhibitor Selectivity. *Nat Biotechnol*, 26(1): 127-132.

Kaysser, L., Bernhardt, P., Nam, S.J., Loesgen, S., Ruby, J.G., Cox, P.S., Jensen, P.R., Fenical, W., Moore, B.S. 2012. Merochlorins A-D Cyclic Meroterpenoid Antibiotics Biosynthesized in Divergent Pathways with Vanadium Dependent Chloroperoxidases. *J Am Chem Soc*, 134:11988-11991.

Keiser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation, Norwich, England.

Kersten, R.D., Yang, Y.L., Xu, Y., Cimermancic, P., Nam, S.J., Fenical, W., Fischbach, M.A., Moore, B.S., Dorrestein, P.C. 2011. A Mass Spectrometry-Guided Genome Mining Approach for Natural Product Peptidogenomics. *Nat Chem Biol*, 7: 794-802.

Kersten, R.D., Lane, A.L., Nett, M., Taylor, K.S., Richter, S., Duggan, B.M., Dorrestein, P.C., Moore, B.S. 2013. Bioactivity-Guided Genome Mining Reveals the Lomaiviticin Biosynthetic Gene Cluster in *Salinispora tropica*. *Chem Bio Chem*, 14: 955-962.

Kersten, R.D., Ziemert, N., Gonzalez, D.J., Duggan, B.M., Nizet, V., Dorrestein, P.C., Moore, B.S. 2013. Glycogenomics As a Mass Spectrometry-Guided Genome-Mining Method for Microbial Glycosylated Molecules. *Proc Natl Acad Sci*, 110: 4407-4416.

Kharel, M.K., Rohr, J. 2012. Delineation of Gilvarcin Jadomycin and Landomycin Pathways Through Combinatorial Biosynthetic Enzymology. *Curr. Chem. Biol.* 16: 150-161.

Klevens, R.M., Morrison, M.A., Petit, S., Gershman, K., Harrison, L.H., Dumyati, G., Craig, A.S., Fridkin, S.K. 2007. Invasive Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *J.A.M.A.*, 298: 1763-1771.

Koch, E., Löffler, I. 2008. Partial Characterization of Antimicrobial Activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. *J Phytopathol*, 157: 235-242.

Komaki, H., Fudou, R., Lizuka, T., Nakajima D., Okazaki K., Shibata D., Ojika M., Harayama, S. 2008. PCR Detection of Type I Polyketide Synthase Genes in Myxobacteria, Applied and Environmental Microbiology. 74(17): 5571-5574.

Komaki, H., Izumikawa, M., Ueda, J., Nakashima, T., Khan, S.T., Takagi, M. 2009. Discovery of Pimaricin Analog JBIR-13, from *Streptomyces bicolor* NBRC 12746 as Predicted by Sequence Analysis of Type I Polyketide Synthase Gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83: 127-133.

Lane, L.A., Nam, S.J., Fukuda, T., Yamanka, K., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W., Moore, B.S. 2013. Structures and Comparative Characterization of Biosynthetic Gene Clusters for Cyanosporasides Eneiyne Derived Natural Products from Marine Actinomycetes. *J Am Chem Soc*, 135: 4171-4174.

Last, R.L., Jones, A.D., Shachar-Hill, Y. 2007. Towards the Plant metabolome and Beyond. *Nat RevMol Cell Biol*, 8: 167-174.

Law, V., Knox, C., Jewison, T., Guo, A.C., Liu, Y., Arndt, D., Wilson, M., Neveu, V., Tang, A., Gabriel, G., Ly, C., Wishart, D.S. 2013. Drugbank 4.0: Shedding New Light on Drug Metabolism. *N.A.R.*, 42: 1091-1097.

Lei, L., Deng, W., Song, J., Ding, W. 2007. Characterization of the Saframycin A Gene Cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL Revealing a Nonribosomal Peptide Synthetase System for Assembling the Unusual Tetrapeptidyl Skeleton in a Iterative Manner. *J Bacteriol*, 190: 251.

Li, M.H.T., Ung, P.M.U., Zajkowski, J., Tsodikova, S.G., Sherman, D.H. 2009. Automated Genome Mining for Natural Product. *BMC. Bioinfo*. 10: 185-195.

Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Hughes, D.E., Epstein S., Jones, M., Lazarides, M., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., Lewis, K. 2015. A new Antibiotic Kills Pathogens without detectable resistance. *Nat.*, 517: 455-459.

Liu, W.T., Kersten, R.D., Yang, Y.L., Moore, B.S., Dorrestein, P.C. 2011. Imaging Mass Spectrometry and Genome Mining via Short Sequence Tagging Identified the Anti Infective Agent Arylomycin in *Streptomyces roseoporus*. *J. Am. Chem. Soc.*, 133: 18010-18013.

Liu, C., Jeng, W.Y., Chang, W.J., Ko, T.P., Wang, A.H.J. 2012. Binding Modes of Zaragozic Acid A to Human Squalene Synthase and Staphylococcal Dehydrosqualene Synthase. *J. Bio. Chem.* 22: 18750-18757.

Liu, W.T., Lamsa, A., Wrong, W.R., Boudreau, P.D., Kersten, R.D., Peng, Y., Moore, W.J., Duggan, B.M., Moore, B.S., Gerwick, W.H., Linington, R.G., Pogliano, K., Dorrestein, P.C. 2014. MS/MS Based Networking and Peptidogenomics Guided Genome Mining Revealed Stenothricin Gene Cluster in *Streptomyces roseosporus*. *J. Antibiot.* 67: 99-104.

Lipmann, F. 1971. Attempts to Map a Process Evolution of Peptide Biosynthesis. *Science*, 173: 875-84.

Lombo, F., Brana, A.F., Salas, J.A., Mendez, C. 2004. Genetic Organization of the Biosynthetic Gene Cluster for the Antitumor Angucycline Oviedomycin in *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891. *Chem.Bio.Chem* 5: 1181-1187.

Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Mincer, T.J., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M. 2005. *Salinispora arenicola* gen.nov., sp. nov and *Salinispora tropica* sp. nov., Obligate Marine Actinomycetes Belonging to the Family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55: 1759-1766.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K. 2014. Pharmaceutically Active Secondary Metabolites of Marine Actinobacteria. *Med. Ext. Microbiol.* 169: 262-278.

Maruna, M., Sturdikova, M., Liptaj, T., Godany, A., Muckova, M., Certik, M., Pronayova, N., Proksa, B. 2010. Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity of Angucycline Antibiotics from Epiphytic Yew *Streptomyces*. *J. Basic Microbiol.* 50: 135-142.

Maier, A., Maul, C., Zerlin, M., Grabley, S., Thiericke, R. 1999. A Novel Screening Approach for the Discovery of Biologically Active Secondary Metabolites II. Application Studies with Pure Metabolites. *J. Antibiot.* 52: 952-959.

Marahiel, M.A. 1997. Protein Templates for the Biosynthesis of Antibiotics. *Chem Biol*, 4: 561-567.

Martin, G.D.A., Tan, L.T., Jensen, P.R., Dimayuga, R.E., Fairchild, C.R. 2007. Marmycin A and B, Cytotoxic Pentacycline C-Glycosides from a Marine Sediment Derived Actinomycete Related to the Genus *Streptomyces*, *J Nat Prod*, 70: 1406-1409.

Mcalpine, J.B., Banskota, A.H., Charan, R.D. 2008. Biosynthesis of diazepinomicin/ECO-4601, a Micromonospora secondary metabolite with a novel ring system. *J. Nat. Prod.*, 71: 1585-1590.

Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M., Weber, T., Takano, E., Breitling, R. 2011. antiSMASH: Rapid Identification Annotation and Analysis of Secondary Metabolite Biosynthesis Gene Clusters in Bacterial and Fungal Genome Sequences. *N.A.R.*, 39: 339-346.

Medema, M.H., Takano, E., R. 2013. Detecting Sequence Homology at the Gene Cluster Level with MultiGeneBlast. *Mol Biol Evol*, 30: 1218-1223.

Mehdi, R.B.A., Sioud, S., Fguira, L.F.B., Bejar, S., Mellouli, L. 2006. Purification and Structure Determination of Four Bioactive Molecules From a Newly Isolated *Streptomyces* sp. TN97 Strain. *Process Biochem*, 41: 1506-1513.

Mercado, I.E.S., Davo, A.P., Jensen, P.R., Fenical, W. 2005. Antibiotic Terpenoid Chloro Dihydroquinones from a New Marine Actinomycete. *J Nat Prod*, 68: 904-910.

Mico, X.A., Jensen, P.R., Fenical, W., Chambers, H. 2013. Chlorizidine a Cytotoxic 5H-Pyrrolo[2,1-a] Isoindol-5-one Containing Alkaloid from a Marine *Streptomyces* sp., *Org Lett*, 15: 988-991.

Mo, X., Wang, Z., Wang, B., Ma, J., Huang, H., Tian, X., Zhang, S., Zhang, C., Ju, J. 2011. Cloning and Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster of the Bacterial RNA Polymerase Inhibitor Tirandamycin from Marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO1666. *Biochem Biophys Res Commun*, 406(3): 341-347.

Moffit, M. C., Neilan, A.B. 2002. Evolutionary Affiliations within the Superfamily of Ketosynthases Reflect Complex Pathway Associations, *J Mol Evol*, 56: 446-457.

Mohimani, H., Liu, W.T., Kersten, R.D., Moore, B.S., Dorrstein, P.C., Pevzner, P.A. 2014. NRPquest: Coupling Mass Spectrometry and Genome Mining for Non Ribosomal Peptide Discovery. *J. Nat. Prod.*, 77: 1902-1909.

Mootz, H.D., Marahiel, M.A. 1999. Design and Application of Multimodular Peptide Synthetases, *Curr Opin Biotechnol*, 10: 341-348.

Morlock, G.P., Metchock, B., Sikes, D., Crawford, J.T., Cooksey, R.C. 2003. ethA, inhA and katG Loci Ethionamide Resistance Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *A.S.M.*, 47: 3799-3805.

Moss, S. J., Martin, C.J., Wilkinson, B. 2004. Loss of Co-Linearity by Modular Polyketide Synthases: a Mechanism for the Evolution of Chemical Diversity. *Nat Prod Rep*, 21:575-593.

Mulvey, M.R., Grant, J.M., Plewes, K., Roscoe, D., Boyd, D.A. 2011. New Delhi Metallo- β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Canada. *Emerg. Infect. Dis.*, 17: 103-106.

Myronovskyy, M.L., Ostash, B.E., Fedorenko, V.A. 2010. Diversity of Genes Encoding Nonribosomal Peptide Synthetases in the *Streptomyces sioyaensis* Genome. *Rus J Gen*, 46 (7): 794-800.

Nachtigall, J., Schulz, D., Beil, W., Süssmuth, R.D., Fiedler, H.P. 2010. Aranciamycin Anhydride, a New Anthracycline-type Antibiotic Isolated from *Streptomyces* sp. Tü 6384, *J Antibiot*, 63: 397-399.

White House. 2014. Natinaol Strategy for Combating Antibiotic Resistant Bacteria Report.

Nett, M., Ikeda, H., Moore, B.S. 2009. Genomic Basis for Natural Product Biosynthetic Diversity in the Actinomycetes. *Nat Prod Rep*, 26(11): 1362-1384.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2003. Natural Products as Source of New Drugs Over the Period 1981-2002. *J Nat Prod*, 66: 1022-1037.

Nguyen, D.D., Wu, C.H., Moree, W.J., Lamsa, A., Medema, M.H., Zhao, X.L., Gavilan, R.G., Aparicio, M., Atencio, L., Jackson, C., Ballesteros, J., Sanchez, J., Watrous, J.D., Phelan, V.V., van de Wiel, C., Kersten, R.D., Mehnaz, S., De Mot, R., Shank, E.A., Charusanti, P., Nagarajan, H., Duggan, B.M., Moore, B.S., Bandeira, N., Palsson, B.O., Pogliano, K., Gutierrez, M., P Dorrestein, C. 2013. MS/MS Networking Guided Analysis of Molecule and Gene Cluster Families. *Proc, Natl, Acad, Sci*, 110: 2611-2620.

Nikolouli, K., Mossialos, D. 2012. Bioactive Compounds Synthesized by Non-ribosomal Peptide Synthetases and Type-I Polyketide Synthases Discovered Through Genome-Mining and Metagenomics. *Biotechnol Lett*, 34: 1393-1403.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. 2001. Genome Sequence of an Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the Ability of Producing Secondary Metabolites. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 12215-12220.

Oskay, M., Tamer, A. 2009. *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü ve Yarını. *J N World Sci Acad*, 4: 48-60.

Ostash, B.E, Ogonyan, S.V., Luzhetskyy, A.N., Bechthold, A., Fedorenko, V.A. 2005. The Use of PCR for Detecting Genes That Encode type I Polyketide Synthases in Genomes of Actinomycetes, *Russ J Genet*, 41: 473-478.

Ozakin, S., Porsuk, I., Acer, I., Bali, B., Ince, E. 2014. Diversity of Non Ribosomal Peptide Synthetases Genes in Terrestrial Streptomyces. *Mol Gen Mic and Vir*, 29(3): 144-153.

Ozakin, S., Davis, D.W., Umile, T.P., Pirinccioğlu, N., Kizil, M., Celik, G., Sen, A., Minbiole, K.P.C., Ince, E. 2015. The Isolation of tetrangomycin from terrestrial *Streptomyces* sp. CAH29: evaluation of antioxidant, anticancer and anti-MRSA activity. *Med. Chem. Res.*, (Değerlendirilme aşamasında).

Palomo, S., Gonzales, I., Cruz, M.L., Martin, J., Tormo, J.R., Anderson, M., Hill, R.T., Vicente, F., Reyes, F., Genilloud, O. 2013. Sponge Derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. As Sources of the New Thiazolyl Peptide Antibiotic Kocurin. *Mar. Drugs*, 11: 1071-1086.

Park, S.W., Casalena, D.E., Wilson, D.J., Dai, R., Nag, P.P., Boyce, J.P., Bittker, J.A., Finzel, B.C., Aldrich, C.C. 2015. Target Based Identification of Whole Cell Active Inhibitors of Biotin Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 22: 76-86.

Pathom, A.W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M. 2006. Diversity of Actinomycetes Isolated from Challenger Deep Sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10: 181-189.

Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G. 2012. Innovation: Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4): 263-269.

Peng, F., Peng, A., Luo, Y., Huang, W., Han, B., Yang, X., Wang, W., Yang, T., Xiang, M., Peng, C., He, G. 2013. Combined Structure-Based Pharmacophore, Virtual Screening and 3D-QSAR Studies of Structural Diverse Dehydrosqualene Synthase Inhibitors. *Med. Chem. Res.* 22: 4858-4866.

Perry, N.B., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Thompson, A.M. 1990. Antiviral and Antitumor Agents from A New Zealand Sponge, *Mycale* sp. 2. Structures and Solution Conformations of Mycalamides A and B. *J Org Chem*, 55: 223-227.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20: 133-163.

Pots, B.C., Ling, T., Macherla, V.R. 2010. Concise Formal Synthesis of (-) Salinosporamide A (Marizomib) Using a Regio and Stereoselective Epoxidation and Reductive Oxirane Ring Opening Strategy. *J. Org. Chem*, 11: 3882-3885.

Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W., Huson, D.H. 2005. Specificity Prediction of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases (NRPS) Using Transductive Support Vector Machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res*, 33: 5799-5808.

Riedlinger, J., Schrey, S.D., Tarkka, M.T., Hampp, R., Kapur, M., Fiedler, H.P., 2006. Auxofuran, a Novel Metabolite That Stimulates the Growth of Fly Agaric, is Produced by the

Mycorrhiza helper Bacterium *Streptomyces* Strain AcH 505. *Appl. Environ Microbiol*, 72: 3550-3557.

Rondon, M.R. 2000. Cloning the Soil Metagenome a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Cultured Microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2541-2547.

Röttig, M., Medema, M.H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. 2011. Kohlbacher, O., NRSPredictor2-a Web Server for Predicting NRPS Adenylation Domain Specificity. *Nucleic Acids Res*, 39: 362-7.

Rückert, C., Kalinowski, J., Heide, L. Apel, A.K. 2014. Draft Genome sequence of *Streptomyces roseochromogenes* subsp. *oscitans* DS.12.976 producer of aminocoumarine antibiotic clorobicin. *Am. Soc. Microbiol.*, 2: 1147-1152.

Sakai, K., Koyama, N., Fukuda, T., Mori, Y., Onaka, H., Tomoda, H. 2012. Search Method for Inhibitors of Staphyloxanthin Production by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*, 35: 48-53.

Sakaulas, G., Nam, S.J., Loesgen, S., Fenical, W., Jensen, P.R., Nizet, V., Hensler, M. 2012. Novel Bacterial Metabolite Merochlorin A Demonstrates in vitro Activity Against Multi Drug Resistant Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Ploes one*, 7: 1-6.

Savic, M., Vasiljevic, B. 2006. Targeting Polyketide Synthase Gene Pool within Actinomycetes: New Degenerate Primers. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33: 423-430.

Schulz, D., Nachtigall, N., Riedlinger, J., Schneider, K., Poralla, K., Imhoff, J.F., Beil, W., Nicholson, G., Fiedler, H.P., Süßmuth, R.D. 2009. Piceamycin and its N-acetylcysteine Adduct is Produced by *Streptomyces* sp. GB 4-2. *J Antibiot*, 62: 513-518.

Shaaban, K.A, Srinivasan, S., Kumar, R., Damodaran, C., Rohr, J. 2011 Landomycins P-W, Cytotoxic Angucyclines from *Streptomyces cyanogenus* S-136. *J Nat Prod*, 74: 2-11.

Shen, B., Lanen, S.G.V. 2006. Microbial Genomics for the Improvement of Natural Product Discovery, *Curr Opin Microbiol*. 9: 252-260.

Shimida, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthane on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. *J Agric Food Chem*, 40: 945-548.

Shoda, M. 2000. Bacterial Cont. Plant. Dis. *J Biosci Bioeng*, 89: 515-521.

Silakowski, B., Kunze, B., Müller, R. 2001. Multiple Hybrid Poliketide Synthase/Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in the Myxobacterium *Stigmatella aurantica*. *Gene*, 275: 233-240.

Sharma, A., Roy, S., Kahlon, A.K. 2010. Molecular Docking Studies to Map the Binding Site of Squalene Synthase Inhibitor on Dehydro-squalene Synthase of *Staphylococcus aureus*. *J. Biomol., Struct.*, 28: 201-210.

Shong, J.K., Oh, T.J., Lee, J.J., Kim, C.G. 1997. Identification of a Gene Cluster of Biosynthetic Genes of Rubradirin Substructures in *S. achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061. *Mol. Cell.* 7: 674-681.

Smith, C.A., O'Maille, G., Want, E.J., Qin, C., Trauger, S.A., Brandon, T.R., Custodio, D.E., Abagyan, R., Siuzdak, G. 2005. METLIN-A Metabolite Mass Spectral Database. *Ther Drug Monit*, 27: 747-751.

Sobolevskaya, M.P., Fotso, S., Havash, U., Denisenko, V.A., Helmke, E., Laatsch, H., Elyakov, G.B., 2004. Metabolites of the Sea Isolate of Bacteria. *Chem Na Comp*, 40: 282-285.

Sohrab, Hossain. 2005. Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from Endophytic Fungi and the Plant *Prismatomeris tetrandra* and Synthesis of (+)-Ochromycinone. Nat. Bangladesh.

Song, L., Barona, G.F., Corre, C., Xiang, L., Udvary, D.W., Austin, M.B., Nole, J.P., Moore, B.S., Challis, G.L. 2006. Type III Polyketide Synthase β - Ketoacyl-ACP Starter Unit and Ethylmalonyl-CoA Extender Unit Selectivity Discovered by *Streptomyces coelicolor* Genome Mining. *J Am Chem Soc*, 128: 14754-14755.

Song, Y., Liu, C., Lin, F.Y., No, J.H., Hesner, M., Liu, Y.L., Jeng, W.Y., Low, J., Liu, G.Y., Nizet, V., Wang, A.H.J., Oldfield, E. 2009. Inhibition of Staphyloxanthin Virulence Factor Biosynthesis in *Staphylococcus aureus* In Vitro in Vivo and Crystallographic Results. *J. Med.Chem.*, 52: 3869-3880.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. 1999. The Specificity-Confering Code of Adenylation Domains in Non-Ribosomal Peptide Synthetases. *Chem Biol*, 6: 493-505.

Staunton, J., Weissman, K.J. 2001. Polyketide Biosynthesis: Millennium Review. *Nat Prod Rep*, 18: 380-416.

Stein, T., Morris, H.R. 1996. The Multiple Carrier Model of Non-Ribosomal Peptide Biosynthesis at Modular Multi Enzymatic Templates. *J Biol Chem*, 271:15428-15435.

Stenico, M.E.S., Silva, C.S.P., Lorenzi, A.S., Shishido, T.K., Lira, S.P., Etchegaray, A., Moraes, L.A.B., Fiore, M.F. 2011. Non ribosomal Peptides Produced by Brazilian Cyanobacterial Isolates with Antimicrobial Activity. *Microbiol Res*, 3: 161-175.

Stephan, J.K., Katz, L., Stassi, D. 1997. Identification and Characterization of the Niddamycin Polyketide Synthase Genes from *Streptomyces caelestis*. *J Bacteriol*, 23: 7515-7522.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural Product from Endophytic Microorganism. *J NatProd*, 67: 257-268.

Strohl, W. R. 1997. Industrial Antibiotics: Today and the Future. *M Biotechnol Antibiot*, 1-43. New York, USA.

Süleyman ÖZAKIN, Ebru İNCE YILMAZ, Murat KIZIL. 2010. Lokal *Streptomyces* İzolatlarının Biyoaktif Sekonder Metabolitlerinin Kimyasal Olarak Taranması. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 1-119.

Supong, K., Thawai, C., Suwanborirux, K., Choowong, W., Supothina, S., Pittayakhajonwut, P. 2013. Anti malarial and Anti tubercular C-glycosylated benz[α] Anthraquinones from the Marine Derived *Streptomyces* sp. BCC45596. *Phytochem Lett*, 410: 1-6.

Tingting, H., Wang, Y., Yin, J., Du, Y., Tao, M., Xu, J., Chen, W., Lin, S., Deng, Z. 2011. Identification and Characterization of the Pyridomycin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517. *J Bio Chem*, 286: 20648-20657.

Thaker, M.N., Wang, W., Spanogiannopoulos, P., Waglechner, N., King, A.M., Medina, R., Wright, G.D. 2013. Identifying Producers of Antibacterial Compound by Screening for Antibiotic Resistance. *Nat. Biotechnol.* 31: 922-927.

Udwary, D.W., Zeigler, L., Asolkar, R.N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P.R., Moore, B.S. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proc Nat Acad Sci*, 25: 10376-10381.

Vivian, M., Brost, R., Baltz, R.H. 2006. The Lipopeptide Antibiotic A54145 Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33:129-140.

Wang, H. 2014. Genome Based Natural Product Biosynthetic Gene Clusters from Sequencing to Mining. Division of Microbiology and Biotechnology, University of Helsinki.

Walsh, C.T. 2008. The Chemical Versatility of Natural-Product Assembly Lines. *Acc Chem Res*, 41:4-10.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. 2001. How many Antibiotics are Produced by the Genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, 176: 386-390.

Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B.S., Yang, J.Y., Kersten, R.D., Voort, M.V.D., Pogliano, K., Gross, H., Raajimakers, J.M., Moore, B.S., Laskin, J., Bandeira, N., Dorrestein, P.C. 2012. Mass Spectral Molecular Networking of Living Microbial Colonies. *P.N.A.S.* 109: 1743-1752.

Weber, T., Marahiel, M.A. 2001. Exploring the Domain Structure of Modular Non-Ribosomal Peptide Synthetases. *Structure*, 9:3-9.

Weber, T., Wenzel, K., Pelzer, S., Vente, A., Wohlleben, W. 2003. Exploiting the Genetic Potential of Polyketide Producing *Streptomyces*. *J Biotechnol*, 106: 221-232.

Westrichl, D.S., Faust, B., Bedford, D., Hopwood, D.A., Becthold, A. 1999. Cloning and Characterization of Gene Cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 Probably Involved in Landomycin Biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, 170: 381-387.

Wietz, M., Duncan, K., Patin, N.V., Jensen, P.R. 2013. Antagonistic interaction mediated by Marine Bacteria: The role of small molecules. *J.Chem.Ecol.*, 39: 879-891.

Williams, P.G., Asolkar, R.N., Kondratyuk, T., Pezzutto, J.M., Jensen, P.R., Fenical, W. 2007. Saliniketals A and B Bicyclic Polyketides from the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Nat Prod*, 70: 83-88.

Wishart, D.S., Law, V., Knox, C., Jewison, T., Guo, A.C., Liu, Y., Arndt, D., Wilson, M., Neveu, V., Tang, A., Gabriel, G., Ly, C., Scalbert, A. 2012. HMDB 3.0 The Human Metabolome Database in 2013. *N.A.R.*, 12: 1-7.

Wright, S.A., Zumoff, C.H., Schneider, L., Beer, S.V. 2001. *Pantoea agglomerans* Strain EH318 Produces Two Antibiotics That Inhibit *Erwinia amylovora* *In vitro*. *Appl Environ Microbiol*, 67: 284-292.

Wright, G.D. 2010. Antibiotic resistance in environment: a link to the clinic. *Curr. Opin. Microbiol.*, 13:589-594.

Woo, C.M., Beizer, N.E., Jnaso, J.E. Herzon, S.B. 2012. Isolation of Lomaiviticins C-E Transformation of Lomaiviticin C to Lomaiviticin A, Complete Structure Elucidation Lomaiviticin A, and Structure-Activity Analyses. *J.A.C.S.*, 134: 15285-15288.

Wu, C., Zacchetti, B., Ram, A.F.J., Wezel, G.P.V. 2015. Expanding the Chemical Space for Natural Products by *Aspergillus-Streptomyces* Co-Cultivation and Biotransformation. *Infect. Dis. Microbiol Ecol.* 5: 1-10.

Xihou, Y., Zabriskie, M. 2006. The Enduracidin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces fungicidicus*. *J Med Microbiol*, 152: 2969-2983.

Xin, Y., Kanagasabhapathy, M., Janussen, D., Xue, S., Zhang, W. 2011. Phylogenetic Diversity of Gram-positive Bacteria Cultured from Antarctic Deep-sea sponges. *Polar Biol*, 34: 1501-1512.

Xiong, Z.Q., Liu, Q.X., Pan, Z.L., Zhao, N., Feng, Z.X., Wang, Y. 2014. Diversity and Bioprospecting of Culturable Actinomycetes from Marine Sediment of Yellow Sea, China. *Arch. Microbiol.* 197: 299-309.

Yang, W., Chen, Y., Yin, X. 2011. Molecular Cloning and Identification of the Laspartomycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces viridochromogenes*. *Gene*, 483: 11-21.

Yang, C.Y., Sanchez, L.M., Rath, C.M., Liu, X., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., Zhang, L., Gerwick, W.H., Dorrestein, P.C. 2013. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod.* 76: 1686-1699.

Yi, Q.C., Tang, G.L., Shen, B. 2002. Identification and Localization of the Gene Cluster Encoding Biosynthesis of the Antitumor Macrolactam Leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J Bacteriol*, 184: 24.

Yılmaz, E.İ., Kızıl, M., Yavuz, M. 2008. Molecular Characterization of Rhizospheric Soil *Streptomyces* Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their Antimicrobial Activity. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 1461-1470.

Zazopoulos, E., Huang, K., Staffa, A., Liu, W., Bachmann, B.O., Nonaka, K., Ahlert, J., Thorson, J.S., Shen, B., Farnet, C.M. 2003. A Genomics-Guided Approach for Discovering and Expressing Cryptic Metabolic Pathways. *Nat Biotechnol*, 21:187-190.

Zerikly, M., Challis, G.L. 2009. Strategies for the Discovery of Natural Products by Genome Mining. *Chem Bio Chem*, 10: 625-633.

Zhao, X.Q. 2011. Genome Based Studies of Marine Microorganisms to Maximize the Diversity of Natural Products Discovery for Medical Treatments, *Compl Alt Med*, 10: 1-11.

Zhang, W., Li, Z., Miao, X., Zhang F. 2009. The Screening of Antimicrobial Bacteria with Diverse Novel Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) Genes from South China sea Sponges. *Mar. Biotechnol*, 11, 346-355.

Zhang, H., Wang, H., Wang, Y., Cui, H., Xie, Z., Pu, Y., Pei, S., Li, F., Qin, S. 2012. Genomic Sequence Based Discovery of Novel Angucyclinone Antibiotics from Marine *Streptomyces* sp. W007. *Microbiol Lett*, 332:105-112.

Zhao, J., Yang, N., Zeng, R. 2008. Phylogenetic Analysis of Type I Polyketide Synthase and Nonribosomal Peptide Synthetase Genes in Antarctic Sediment, *Extremophiles*, 12: 97-105.

Zhao, K., Penttinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., Lindström, K., Zhang, L., Zhang, X., Strobel, G. A. 2011. The Diversity and Anti-microbial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau. *Curr Microbiol*, 62: 182-190.

Zhang, W., Li, Z., Miao, X., Zhang, F. 2009. The Screening of Antimicrobial Bacteria with Diverse Novel Nonribosomal Peptide Synthetase (NRPS) Genes from South China sea Sponges. *Mar Biotechnol*, 11: 346-355.

Zhu, L., Ostash, B., Rix, U., Nure-Alam, M., Mayers, A., Luzhetskyy, A., Mendez, C., Salas, J.A., Bechthold, V.F., Rohr, J. 2005. Identification of Function of Gene lndM2 Encoding a Bifunctional Oxygenase-Reductase Involved in the Biosynthesis of the Antitumor Antibiotic Landomycin E by *Streptomyces globisporus* 1912 Support the Originally Assigned Structure for Landomycinone. *J Org Chem*, 70: 631-638.

Zhang, H., Wang, H., Wang, Y., Cui, H., Xie, Z., Pu, Y., Pei, S., Li, F., Qin, S. 2012. Genomic Sequence Based Discovery of Novel Angucyclinone Antibiotics from Marine *Streptomyces* sp. W007. *Microbiol Lett*, 332:105-112.

Ziemert, N., Podell, S., Penn, K., Badger, J.H., Allen, E. 2012. The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A Phylogeny Based Bioinformatic Tool to Classify Secondary Metabolite Gene Diversity. *Plos One*, 7(3): 1-9.

Ziemert, N., Lechner, A., Wietz, M., Aguinaga, N.M., Chavarria, K., Jensen, P.R. 2014. Diversity and Evolution of Secondary Metabolism in the Marine Actinomycete Genus *Salinispora*. *P.N.A.S.*, 111: 1130-1139.

Zucko, J., Starcević A., Diminic J., Elbakali, M. 2010. From DNA Sequences to Chemical Structures-Methods for Mining Microbial Genomic and Metagenomic Data Sets for New Natural Products. *Food Techno Biotechnol*, 48: 234-242.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Süleyman ÖZAKIN
Doğum Tarihi: 24.10.1984
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri : Merkez/DİYARBAKIR
Medeni Hali : Bekar
Adres : Dicle Üniversitesi
Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
21280 Diyarbakır
Telefon :
E-Mail: ozakinsuleyman@gmail.com

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1991-Haziran 2003

İlkokul öğrenimimi ve ortaokulu Şehit Polis Mehmet Erçin İlkokulunda, Lise Eğitimimi Fatih Lisesinde (süper lise) tamamladım.

Eylül 2004-Temmuz 2008

Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü bitirdim.

Eylül 2008-Temmuz 2010

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında '**Lokal Streptomyces İzolatlarının Biyoaktif Sekonder Metabolitlerinin Kimyasal Olarak Taranması**' adlı yüksek lisans tezini Doç. Dr. Ebru İNCE danışmanlığında bitirdim.

Mayıs 2014-Mayıs 2015

TÜBİTAK 2214/A BİDEB bursu ile doktora çalışmalarımın bir kısmını Amerika Birleşik Devletlerinde bulunan Kaliforniya Üniversitesi, Scripps Okyanus Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyotıp Merkezinde 1 yıl süre ile gerçekleştirdim.