



***ASPERGILLUS NIGER* LC3 İZOLATINDAN
ANTİBAKTERİYEL POLİPEPTİT İZOLASYONU**

Ayşe ÜSTÜN

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ**

2019

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***ASPERGILLUS NIGER* LC3 İZOLATINDAN ANTİBAKTERİYEL
POLİPEPTİT İZOLASYONU**

Ayşe ÜSTÜN

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

***ASPERGILLUS NIGER* LC3 İZOLATINDAN ANTİBAKTERİYEL POLİPEPTİT
İZOLASYONU**

Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ danışmanlığında, Ayşe ÜSTÜN tarafından hazırlanan bu çalışma 07 / 01 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile** kabul edilmiştir.

Başkan	:Prof. Dr. Mesut TAŞKIN	<i>İmza</i>	:
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ	<i>İmza</i>	:
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI	<i>İmza</i>	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç.Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

07 / 01 / 2019

Ayşe Üstün

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***ASPERGILLUS NIGER* LC3 İZOLATINDAN ANTİBAKTERİYEL POLİPEPTİT İZOLASYONU**

Ayşe ÜSTÜN

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ

Bakteriler, funguslar, virüsler ve parazitler halihazırda kullanılan en güçlü antibiyotiklere direnç geliştirmiş ya da geliştirmektedirler. Buna paralel olarak günümüzde antimikrobiyal ilaçlara dirençli enfeksiyonlarda artışlar rapor edilmektedir. Bu nedenlerden dolayı yeni antimikrobiyal ajanların keşfi, zorunlu ve aynı zamanda da süreklilik arz etmesi gereken bir durum halini almıştır. Antimikrobiyal ajanlar olarak; çeşitli mikroorganizmaların sekonder metabolitleri ve bazı bitkilerin organik ekstraktları ön plana çıkmaktadır. Ancak, son yıllarda araştırmacılar, mikroorganizmalarla mücadelede; daha spesifik ve daha etkili yeni bir antimikrobiyal grubu olan doğal polipeptitler (AMP'ler) üzerine odaklanmıştır. Bu tez çalışmasında, *Aspergillus* cinsine ait LC3 izolatından ekstraselüler proteinlerin izolasyonu yapılarak, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) patojenlerine karşı antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin protein kaynaklı olduğu tripsin/proteinaz K testi ile belirlenmiş ve bu proteinin jel kapatma testi ile 11 kDa'luk bir protein olduğu saptanmıştır. Ardından saflaştırılan bu proteinin *S. aureus*'a karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) değeri 8 µg/ µl, MRSA'ya karşı ise 32 µg/ µl olarak belirlemiş ve AMP molekülü olduğu doğrulanmıştır. LC3 izolatı yapılan ITS sekans analizi sonucu *Aspergillus niger* olarak tanımlanmış ve MK332597 erişim numarası ile GenBank'a kaydedilmiştir. Sonuç olarak saflaştırılan AMP molekülünün, *S. aureus*'dan kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

2019, 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus niger*, antimikrobiyal polipeptit, moleküler karakterizasyon

ABSTRACT

MS. Thesis

ISOLATION OF ANTIBACTERIAL POLYPEPTIDE FROM *ASPERGILLUS* *NIGER* LC3 ISOLATE

Ayşe ÜSTÜN

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Bacteria, fungi, viruses and parasites developed or have developed resistance to the most potent antibiotics available used. Parallel to this, increases in against antimicrobial drug resistant infections are now reported. Therefore, the discovery of new antimicrobial agents has become compulsory and at the same time a situation that should be continuous. As antimicrobial agents; secondary metabolites of various microorganisms and organic extracts of some plants come to the fore. However, in the last decade, researchers have been in the combat against microorganisms; more specifically and more effectively focused on natural peptides (AMPs), a new antimicrobial group. In this thesis, the extracellular proteins were isolated from isolate LC3 belonging to *Aspergillus* and then tested for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Antimicrobial activity was determined by the trypsin / proteinase K test, which was protein-related to, and it was determined that this protein was a protein of 11 kDa by gel overlay assay. Then minimum inhibitory concentration of purified AMP molecules against *S. aureus* and MRSA was 8 µg/µl and 32 µg/µl, respectively and the AMP molecule was confirmed. ITS sequence analysis showed that LC3 isolate was identified as *Aspergillus niger* and recorded in GenBank with access number MK332597. As a result, the purified AMP molecule has the potential to be used in infections caused by *S. aureus*.

2019, 56 pages

Keywords: *Aspergillus niger*, antimicrobial polypeptide, molecular characterization

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, yardım ve maddi/manevi desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÖRTÜCÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde bana hem uygulama kısmında hem de manevi olarak destek olan Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI'ya, Raquel Pino DONOSA'ya, desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmamda bana yardımcı olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyeleri ile çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Elanur TÜYSÜZ, Abdul Saltuk Buğra DAŞ, Büşra ALBAYRAK, Alpgiray TURGUT, Fatma BÖKE, Merve ŞİMŞEK ve Büşra YAZICILAR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında tüm destekleriyle her zaman yanımda olan, aileme ve kardeşlerime en içten saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

Ayşe ÜSTÜN

Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antimikrobiyal Polipeptitler ve Özellikleri	2
1.1.1. Ribozomal Olarak Sentez Edilen Polipeptitler (doğal peptitler).....	3
1.1.2. Non-ribozomal Olarak Sentez Edilen Polipeptitler	3
1.2. AMP'lerin Sekonder Yapıları	3
1.2.1. α -heliks Polipeptitler	4
1.2.2. β Tabaka İçeren Polipeptitler	4
1.2.3. Halka Yapısındaki Polipeptitler	5
1.2.4. Uzun Zincirli Polipeptitler	5
1.3. Antimikrobiyal Polipeptitlerin Etki Mekanizmaları	6
1.3.1. Membran Aktif AMP'ler	6
1.3.2. Hücre İçinde Etkili AMP'ler	9
1.4. Antimikrobiyal Polipeptitlere Direnç Mekanizması	9
1.5. Antimikrobiyal Polipeptitlerin Klinik Kullanımları	11
1.6. Terapötik Fungusların Tarihçesi	14
1.7. Filamentöz Fungus Kaynaklı Antimikrobiyal Polipeptitler.....	14
1.8. <i>Aspergillus niger</i> ' in Biyoteknolojik Önemi.....	15
1.9. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi.....	16
2.KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Cihazlar	23
3.1.2. Sarf Malzemeler	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Referans Suşlarının Geliştirilmesi.....	24

3.2.2. Fungusun Kültüre Edilmesi	25
3.2.3. Kültür Filtratlarının Hazırlanması ve LC3 İzolatının Antibakteriyel Polipeptit Üretiminin Doğrulanması	25
3.2.3.1. Agar Difüzyon Testi.....	25
3.2.3.2. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Testi	26
3.2.3.3. Çapraz Ekim Testi	26
3.2.3.4. Radyal İnhibisyon Testi	26
3.2.4. Ultrafiltrasyon	26
3.2.5. Protein İzolasyonu.....	27
3.2.6. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	27
3.2.7. SDS-PAGE.....	27
3.2.8. Jel Kapatma Testi.....	28
3.2.9. AMP'nin Saflaştırılması	28
3.2.10. AMP'nin Günlere Göre Üretiminin Değerlendirilmesi	28
3.2.11. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi	29
3.2.12. Antimikrobiyal Peptidin Sinerjik Etkilerinin Değerlendirilmesi	30
3.2.13. Filamentöz Fungusun Tanısı	30
3.2.13.1. Klasik Tanı	30
3.2.13.2. DNA İzolasyonu.....	31
3.2.13.3. ITS Bölgesinin PZR ile Çoğaltımı	31
3.2.13.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi	32
3.2.13.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Dizi Analizi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	34
4.1. LC3 İzolatının Kültür Filtratlarının Toplanması.....	34
4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	34
4.2.1. Agar Difüzyon Testi.....	34
4.2.2. Çapraz Ekim Testi	36
4.2.3. Radyal İnhibisyon Testi	37
4.3. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Testi	37
4.4. Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE	38
4.4.1. Jel Kapatma Testi	40
4.4.2. Polipeptidin Saflaştırılması	41

4.5. AMP'nin Günlere Göre Üretimini Değerlendirilmesi	41
4.6. MIC Değerinin Belirlenmesi	43
4.7. Sinerjik Etkileşimin Değerlendirilmesi.....	44
4.8. LC3 Kodlu Filamentöz Fungusun Tanısı	46
4.8.1. Klasik Tanı	46
4.8.2. Moleküler Tanı.....	46
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	49
EKLER.....	55
EK-1 ITS Sekans Analizi.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	56



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

aa	aminoasit
cm	santimetre
µg	mikrogram
µm	mikrometre
mm	milimetre
rpm	dakikadaki dönüş sayısı
ml	mililitre
µl	mikrolitre
kDa	kilodalton
nm	nanometre
v	volt

Kısaltmalar

ADP3	Antimikrobiyal Polipeptit Veritabanı
AMP	Antimikrobiyal Polipeptitler
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Trifosfat
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
ITS	Internal Transcribed Spacer
LPS	Lipopolisakkarit
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
rDNA	Ribozomal DNA
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	Trikloroasetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Antimikrobiyal Polipeptitlerin Sekonder Yapıları.....	5
Şekil 1.2 Antimikrobiyal Polipeptitlerin Membran Etkileşim Modelleri	8
Şekil 1.3 AMP'lerin Hücre İçindeki Etki Mekanizmaları	9
Şekil 1.4 A. <i>A.niger</i> 'in Petri Görüntüsü, B. Koniyofor ve konidiler.....	16
Şekil 3.1 Filamentöz Fungusun Geliştirildiği Fermentör Sistemi.....	29
Şekil 4.1 LC3 İzolatından Kültür Filtratının Elde Edilmesi	34
Şekil 4.2 Çapraz Ekim Testi Petri Görüntüleri	36
Şekil 4.3 Radyal İnhibisyon Testi Petri Görüntüleri.....	37
Şekil 4.4 LC3 İzolatının Agar Difüzyon Testi Görüntüsü	38
Şekil 4.5 BSA ile Hazırlanan Standart Grafik	39
Şekil 4.6 LC3 İzolatının Ekstrasellüler Proteinlerinin SDS-PAGE Profili	39
Şekil 4.7 A.Total Proteinlerin <i>S.aureus</i> 'a karşı Jel Kapatma Sonuçları B. MRSA'ya karşı jel kapatma sonuçları	40
Şekil 4.8 Antimikrobiyal Aktivite Gösteren Saf Protein Bandı.....	41
Şekil 4.9 A. Fermentör Kültüründe Geliştirilen İzolatın Total Proteinleri B. Agar Difüzyon Sonuçları.....	42
Şekil 4.10 Fermentör Kültürünün 5,6 ve 7. Günlerdeki Proteinlerinin <i>S.aureus</i> 'a Karşı Jel Kapatma Sonuçları	43
Şekil 4.11 LC3 İzolatının A. Koloni Görüntüsü B. Konidiafor ve Konidiler.....	46
Şekil 4.12 LC3 İzolatının ITS PZR'ının Agaroz Jel Görüntüsü	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Membran Aktif AMP'lerin Etki Mekanizmaları.	7
Çizelge 1.2 Bakteriyel Direnç Mekanizmaları.....	11
Çizelge 1.3 Klinik Çalışma Aşamasındaki AMP'ler	12
Çizelge 3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri	23
Çizelge 3.2 Kullanılan Mikroorganizmaların Gelişim Şartları	24
Çizelge 3.3 Fermentör Parametreleri	29
Çizelge 3.4 PZR Reaksiyonu	32
Çizelge 3.5 PZR Döngüsü.....	32
Çizelge 4.1 Zon Çaplarının Değerlendirilmesi (erlen kültürü)	35
Çizelge 4.1 Zon Çaplarının Değerlendirilmesi (fermentör kültürü)	35
Çizelge 4.2 Sinerjik Etkileşim Zonlarının Belirlenmesi	45

1. GİRİŞ

Çeşitli organizmalar tarafından üretilen doğal, yarı sentetik veya sentetik olarak elde edilmiş, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyen kimyasallara antibiyotik denir (Nester *et al.* 1978).

1929'da Alexander Fleming'in gözlemlediği ve 1940'da Chain ve Flarey'in *Penicillium notatum*'dan elde ettiği penisilin adlı maddenin mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkisi olduğunu keşfetmesiyle antibiyotikler tedavide yer almaya başlamıştır. Penisilin keşfiyle birlikte birçok hastalığın tedavisi mümkün olmakla beraber bundan sonraki yıllar içinde antibiyotiklere karşı gelişen direncin giderek artması yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine de sebep olmuştur (Apan 2004).

AMP'ler ise, prokaryotlardan insanlara kadar birçok organizmada bulunan evrimsel olarak korunan moleküllerdir. İlk bildirilen insan antimikrobiyal proteini olan lizozim, 1922'de nazal mukustan Alexander Fleming tarafından tanımlanmıştır. Bu gözlem, 1928'de Fleming penisilini keşfettiğinde ve 1940'larda diğer antimikrobiyal maddelerin keşfiyle beraber gözardı edilmiştir. 1945 Nobel Tıp Ödülü penisilin terapötik kullanımına verilmiştir. Bu nedenle, 1940'larda "Altın Antibiyotik Çağı"nın başlangıcı, lizozim gibi doğal AMP'lerin terapötik potansiyelinde ilgi kaybına neden olmuştur. 1960'larda, çoklu ilaç direnci geliştiren mikrobiyal patojenlerin sayısındaki artışa bağlı olarak AMP'ler konukçu savunma molekülleri olarak araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Nizet *et al.* 2001). Enfeksiyon ajanları olarak kullanılacak AMP'ler çalışılan tüm yaşam formlarından tanımlanmıştır. 1981'de Hans Boman'ın bir dönüm noktası olan çalışması, *Cecropia* adlı ipek güvesinin bakteriyel enfeksiyona karşı güçlü bir etkinliği olan AMP üretmesi olup, bu proteinin keşfi heliks yapısındaki AMP'lerin ilk önemli raporudur (Hoffmann *et al.* 1981).

1987'de Zasloff ve arkadaşları, Afrika pençeli kurbağası *Xenopus laevis*'ten izole edilen AMP'leri magaininler olarak karakterize etmişlerdir (Zasloff 1987). Hoffmann'ın grubu, 1990'ların sonlarında AMP sentezinin genetik modifikasyonunun, meyve sineğini mantar enfeksiyonuna dirençli hale getirdiğini ve böylelikle AMP'lerin böcek konak savunmasında kritik rolünü ortaya koymuştur (Lemaitre *et al.* 1996). İlk AMP'lerin

keşfinden bu yana, bu aktiviteye sahip olan moleküller birçok organizmada kapsamlı bir şekilde tanımlanmış ve keşfedilmiştir (Verdu 2016). Ancak ökaryotik canlılar içerisinde filamentöz funguslardan bu moleküllerin çok azının keşfi yapılmıştır.

1.1. Antimikrobiyal Polipeptitler ve Özellikleri

AMP, doğal bağışıklık sisteminin önemli üyeleri olan ve çeşitli organizmalar tarafından sentezlenen 12-100 aminoasit içeren, genellikle geniş spektrumlu mikrobiyosidal aktiviteye sahip olan küçük polipeptitlerdir. Moleküler ağırlıkları ortalama ≤ 5 kDa'dır (Hancock and Diamond 2000).

Bakterilerde, böceklerde, bitkilerde ve omurgalılarda üretilen AMP'ler bakteri, virüs, mantar ve bazı parazitlere karşı koruma sağlar. Son zamanlarda, AMP'lerin endotoksin nötralizasyonu, immüno-modülasyon aktiviteleri, antianjiyogenezin indüklenmesi ve yara onarımı gibi yeni biyolojik etkileri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu moleküller, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bileşenleri ve yeni terapötik yaklaşımlar için çekici adaylardır (Guaní-Guerra *et al.* 2010).

AMP'ler yapılarındaki aa'lerin kompozisyonuna göre anyonik ve katyonik olarak ikiye ayrılmaktadır. Anyonik AMP'ler insan, sığır ve koyun akciğerlerinde bulunmakla birlikte 1992 yılında koyun akciğerinde bulunan yüzey proteinlerinin *Mannhemia haemolitica*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizmalarına karşı öldürücü etkisi olduğu saptanmıştır (Brogden *et al.* 2003).

Katyonik AMP'ler bitkiler, böcekler, omurgalı canlılar, daha az sayıda olmak üzere mikroorganizmalarda da mevcut olup doğal immun yanıtın anahtar bileşenleridir. Katyonik polipeptitler %50 oranında hidrofobik aa'e sahip olup yapılarındaki lizin ve arjinin aa'lerinden dolayı pozitif yüklüdürler. Pozitif yükleri genellikle +2 değerinde olmakla birlikte +3,+4 ve +5 de olabilmektedir (Tzeng *et al.* 2005).

İlk izole edilen AMP'ler olan nisin ve lizozimden sonra 1939 yılında René Dubos'un *Bacillus brevis*'den elde ettiği Gramicidin'in antimikrobiyal aktivite

göstermesi ile tanımlanan bileşikler bu konuda yapılan öncü çalışmalar olmuştur (Dubos 1939).

Günümüze kadar çok sayıda AMP molekülü tanımlanmış olmakla birlikte, bu polipeptitler sentez şekillerine göre ribozomal ve non-ribozomal olarak iki gruba ayrılırlar (Bondaryk *et al.* 2017).

1.1.1. Ribozomal Olarak Sentez Edilen Polipeptitler

Ribozomal yollarla sentezlenen AMP moleküllerinin yapıları birçok araştırmacı tarafından çalışılmış olup, bu doğal AMP'lerin yapıları net olarak ortaya konulmamıştır. AMP'lerin yapıları primer ve sekonder yapılar olarak da incelenebilir. Primer yapı AMP'lerin aa dizisi olup, sekonder yapısı ise içerdikleri disülfid bağlarından ya da bakteri membranıyla etkileşimlerinden dolayı kendi üzerlerine katlanarak üç boyutlu amfipatik yapıların oluşmasıyla meydana gelmektedir. AMP'ler pozitif yüklerinin etkisiyle, hidrofobik bir iç kısım ve negatif yüklü hidrofilik dış grupları bulunan bakteri hücre duvarıyla çok iyi etkileşim kurabilmektedir (Koczulla and Bals 2003).

1.1.2. Non-ribozomal Olarak Sentez Edilen Polipeptitler

Non-ribozomal AMP'ler peptid sentetaz enzimleri yoluyla enzimatik şekilde sentezlenirler ve genellikle kısa aa dizilerine sahiptirler. Bu polipeptitler çoğunlukla bakteriler ve funguslar tarafından bol miktarda üretilirler. Bunlara örnek olarak gramisidinler, polimiksinler, basitrasinler, glikopeptitler verilebilir. Ayrıca bu polipeptitler modifikasyon yoluyla yarı sentetik olarak da üretilebilmektedirler (Toke 2005).

1.2. AMP'lerin Sekonder Yapıları

Katyonic AMP'lerin konformasyonel yapıları, dağılımları türden türe değişmekle birlikte yapılarına göre α -heliks polipeptitler, β tabaka içeren polipeptitler, halka yapısındaki polipeptitler ve uzun zincirli polipeptitler olmak üzere 4'e ayrılır (Koczulla and Bals 2003).

1.2.1. α -heliks Polipeptitler

Bu polipeptitler, 20-40 aa uzunluğunda, sistein içermeyen lineer ve α -heliks yapısında olup, genellikle molekülün merkezinde zayıf bir kıvrıma sahiptirler (Şekil 1.1 A). α -heliks polipeptitler arasında mellitin, magainin, sekropin, katelisidin, buforin II ve LL-37 bulunur. Ayrıca insan, sığır, domuz, fare, tavşan ve koyun kan hücrelerinde 23-38 aa kalıntısı içeren kateline bağlı α -heliks polipeptitler bulunur (Brogden *et al.* 2003). Antimikrobiyal özelliklerine ek olarak, bu polipeptitlerin bazıları, bakteriyel lipopolisakaritlere (endotoksin) de bağlanır (Zanetti *et al.* 1995).

1.2.2. β Tabaka İçeren Polipeptitler

β tabaka içeren polipeptitler, 16-40 aa uzunluğunda olup yapılarında bolca sistein içerirler. Bu β tabakaları iki ya da daha fazla disülfid köprüsü ile birbirine bağlanmış olup (Şekil 1.1 E) bazen bu yapıya ek olarak küçük bir heliks kısım da içerebilirler (Şekil 1.1 C). β tabaka içeren AMP'ler birçok hayvan ve bitkide üretilir. Ayrıca bunların bazıları antifungal, antibakteriyel etki göstermekle birlikte protegrinler ve takiplesinler kan ve doku sıvıları gibi yüksek tuzlu ortamlarda etkinliğini korurlar (Harwig *et al.* 1996). Bu gruptaki polipeptitler arasında α ve β defensinler, protegrinler ve takiplesinler sayılabilir (Brogden *et al.* 2003).

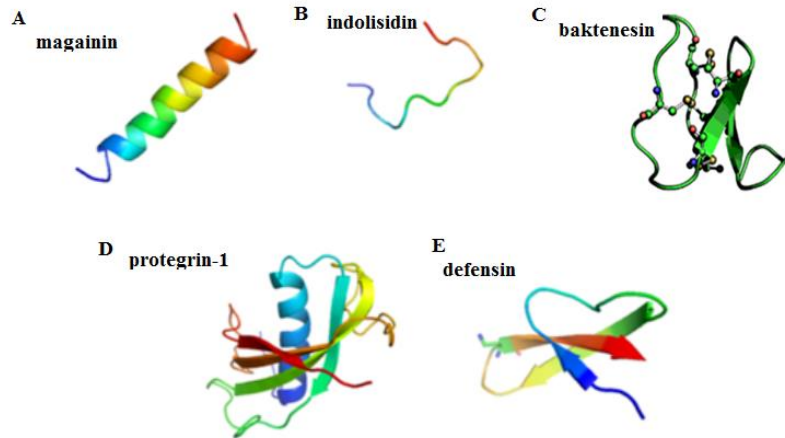
1.2.3. Halka Yapısındaki Polipeptitler

Halka yapısındaki polipeptitler yapılarında tek bir disülfit, amid ya da izopeptit bağı ile oluşmuş bir halka içerirler (Şekil 1.1 D). Halka yapısındaki polipeptitlere örnek olarak baktenesin ve tanatin verilebilir (Hancock and Lehrer 1998; Powers and Hancock 2003).

1.2.4. Uzun Zincirli Polipeptitler

Uzun zincirli polipeptitler yüksek oranda pirolin ya da glisin içerir ve yaklaşık 40-100 aminoaside sahiptirler. Bu peptitler sekonder yapısına membran lipidleri ile aralarında gerçekleşen etkileşim sonucu hidrojen ya da Van der Waals bağlarıyla ulaşır (Şekil 1.1 B).

Uzun zincirli polipeptitlere örnek olarak indolisidin, PR 39 ve profeninler verilebilir (Brogden *et al.* 2003). AMP'lerin sekonder yapılarından doğada en çok bulunanlar β tabaka ve α -heliks içeren AMP'lerdir. Bununla beraber bu bahsedilen grupların dışında da bazı AMP'ler bulunmaktadır. Bunlar laktoferrin, bakterisidal permeabilite arttırıcı protein (BPI) ve tavuk ovatransferrindir (Hancock and Lehrer 1998).



Şekil 1.1. Antimikrobiyal Polipeptitlerin Sekonder Yapıları: A. α heliks yapısındaki polipeptit, B. uzun zincirli polipeptit, C. α heliks- β tabaka yapısının karışımı polipeptit, D. halka yapısındaki polipeptit, E. β tabaka içeren polipeptit (D Fjell *et al.* 2010'dan uyarlanmıştır).

1.3. Antimikrobiyal Polipeptitlerin Etki Mekanizmaları

İlk olarak araştırmacılar tarafından antibakteriyel polipeptitlerin sadece bakteriyel hücre zarının geçirgenliğini azaltarak etki ettiği tespit edilmiştir. Ancak son yapılan çalışmalara göre aslında bu polipeptitlerin birden çok bakteriyel hücre hedefi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Yazıcı *et al.* 2018).

Genellikle katyonik yapıda olan AMP'ler hidrofobik yapılarının da etkisiyle bakteri zarıyla etkileşebildiğinden herhangi aracı bir moleküle ihtiyaç duymadan aktivitelerini gösterebilirler. Üzerinde en çok çalışma yapılan AMP'ler bakterilerin çift tabakalı membranını parçalayan katyonik polipeptitlerdir. Bu polipeptitler amfipatik karakterde olduğundan hücre zarının hidrofilik ve hidrofobik kısımlarına bağlanma yeteneğine sahiptirler (Jenssen *et al.* 2006).

AMP'lerin düşük konsantrasyonlarda membran yapısına zarar vermeden de mikroorganizmalara etki edebildiği saptanmıştır. Bu da AMP'lerin tek bir antimikrobiyal hedefinin olmadığını göstermiştir. Bu türdeki AMP'ler hücre zarı ile ilişki kurmadan direk DNA replikasyonuna ya da protein sentezine etki ederler (Brogden 2005). Bu polipeptitlere örnek olarak hücre zarından difüzyon yoluyla geçip DNA ve RNA ya bağlanan Buforin II verilebilir (Park *et al.* 1998).

Genel olarak AMP'lerin etki mekanizmaları, hücrenin membran bütünlüğünü bozmaları ve belirli hücre içi hedeflerle etkileşime girmeleri olarak ikiye ayrılmaktadır (Macfarlane *et al.* 2000).

1.3.1. Membran Aktif AMP'ler

AMP'ler birçoğunun pozitif yüke sahip olmasından dolayı direk bakteri membranına bağlanarak etki edebilirler. AMP molekülleri hem gram negatif bakterilerin zarında bulunan lipopolisakkarit (LPS) hem de gram pozitif bakterilerde bulunan lipoteikoik asit varlığı AMP lerin bağlanması için gerekli yüke sahiptir. Buna ek olarak bakterilerin fosfolipit membranının da negatif yüklü olmasından kaynaklı antimikrobiyal etki daha kolay olmaktadır (Hancock 1997). Yaygın kullanılan birkaç AMP'nin insan

1. GİRİŞ

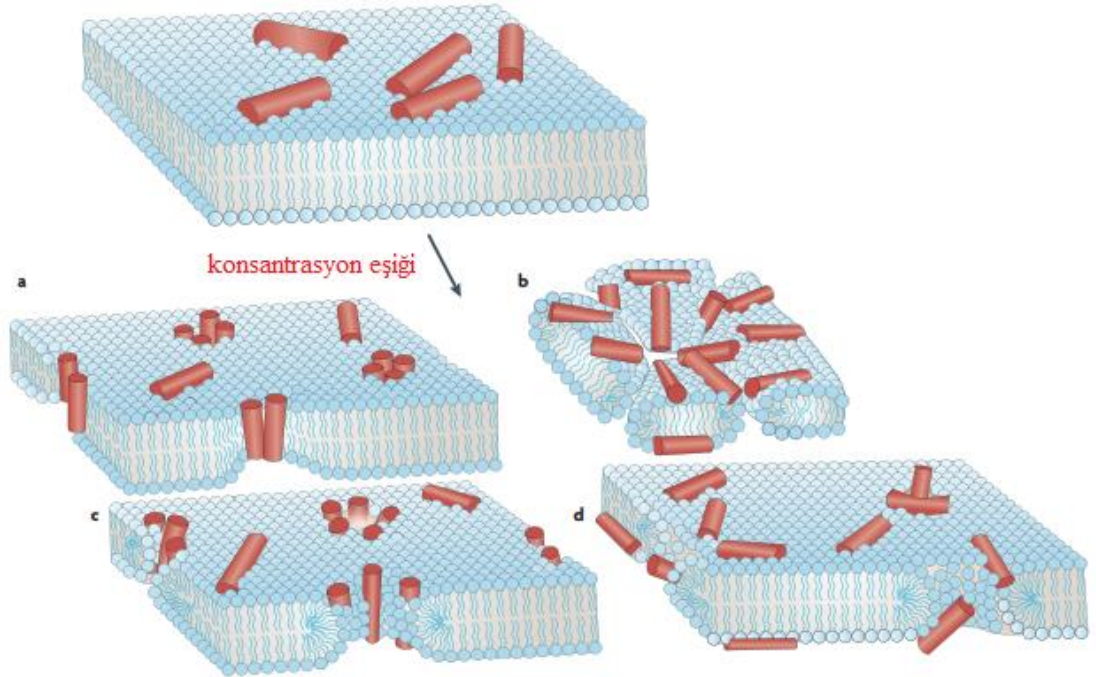
hücrelerine olan toksiteleri incelenmiş ve genel olarak AMP'lerin ökaryotik hücre membranlarına karşı zararlı etkileri olmadıkları tespit edilmiştir (Forde *et al.* 2016). AMP'lerin membran etkileşim modelleri Çizelge 1.1 ve Şekil 1.2 'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Membran Aktif AMP'lerin Etki Mekanizmaları (Ataman 2016)

Etkileşim modeli	Mekanizması	Referans
Kilim modeli	AMP molekülleri çift katmana paralel olarak adsorbe olur ve bir deterjan görevi görerek membranın parçalanmasına sebep olur.	(Bechinger 2005)
Membran incilmesi	AMP'ler bakteri membranının bir tarafına yerleşerek bu bölgede bulunan lipid molekülleri arasında bir boşluk oluştururlar. Oluşan bu boşluk, bir kuvvet oluşturur ve bu kuvvet boşluğu doldurmak için komşu lipid moleküllerini kendilerine yönelterek membran tabakasında incelmeye sebep olur.	(Mecke <i>et al.</i> 2005)
Misel agregat modeli	Farklı yapılardaki polipeptit molekülleri tarafından oluşturulan bu modelde, polipeptitlerin bulunma miktarlarından ve sitoplazma zarının mevcut elektrik potansiyelinden dolayı membran bozular. Bu polipeptitler stoplazma zarında misellere benzeyen bölgesel agregasyonlar meydana getirirler. Bu agregasyonlar, iyonların geçişi için normalde membranda bulunmayan kanalların açılmasına sebep olarak membran yapısına zarar verir.	(Wu <i>et al.</i> 1999)

Çizelge 1.1. Membran Aktif AMP'lerin Etki Mekanizmaları (Devamı)

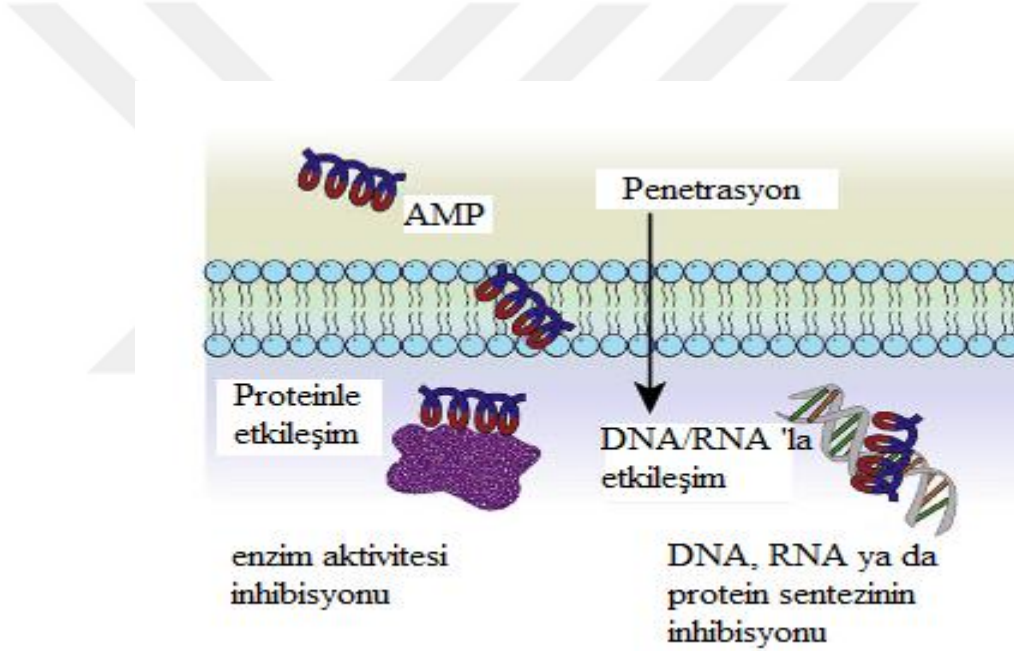
Toroidal model	Toroidal modelde AMP'ler lipit membran içinde dikey olarak bulunurlar. Hidrofobik bölgeleri membranın polar grupları ile yer değiştirirerek membranın hidrofobik bölgelerinde yarıklar meydana getirirler.	(Brogden 2005)
Fıçı tahtası modeli	Polipeptitler çift katmana dik olarak yerleşerek gözenekler oluşturur. Polipeptitler, gözenek lümenini, çift tabakalı düzleme dik duran fosfolipid zincirlerine göre paralel bir doğrultuda hizalar.	(Zhang <i>et al.</i> 2001)

**Şekil 1.2.** AMP'lerin membran etkileşim modelleri A. Fıçı Tahtası Modeli B.Kilim Modeli C. Toroidal Model D. Misel Agregat Modeli (Melo *et al.* 2009' dan uyarlanmıştır).

1.3.2. Hücre İçinde Etkili AMP'ler

AMP'ler direk hücre membranına etki ettiği gibi hücre membranını hiç bozmadan direk hücre içine girerek hücrel faaliyetleri etkileyebilirler (Otvos Jr 2005).

Bir bakteri hücreesindeki proteinlerin üçte birlik kısmı görev olarak hücre zarı ile ilgilidir. Bu proteinler, besin maddelerinin alışverişi, hücrel solunum, ATP üretimi ve hücre içi sinyal gibi hücre için çok önemli olan bazı işlevlere sahiptir (Zhang and Rock 2009). Hücrenin AMP'lere maruz kalmasıyla birlikte hücrel işlevlerde bozulmalar meydana gelir (Bondaryk *et al.* 2017). AMP'lerin hücre içindeki etki mekanizmaları Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. AMP'lerin Hücre İçindeki Etki Mekanizmaları (Li *et al.* 2018'den uyarlanmıştır.)

1.4. Antimikrobiyal Polipeptitlere Direnç Mekanizmaları

AMP'lerin antibiyotiklere kıyasla hücre zarına özgü olmasından ve spesifik protein hedeflerine etkilerinden dolayı, yaygın bir dirence neden olamayacağı düşünülmektedir. Var olan direnç de genetik modifikasyonlar sonucu bakteriler tarafından kazanılmaktadır (Zasloff 2002).

1. GİRİŞ

Konak hücrenin mevcut bakteriyel savunma mekanizmaları da terapötik AMP'lere karşı koruyabilir (Koprivnjak and Peschel 2011; Cole and Nizet 2016). Bakterilerin oluşturduğu bu savunma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması AMP'lerin terapötik antimikrobiyaller olarak daha fazla geliştirilmesi için kritik önem taşımaktadır (J Afacan *et al.* 2012).

AMP'lerin spesifik etkilerine rağmen yine de bazı mikroorganizmalar doğal olarak dirençlidirler. Bunlara örnek olarak *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* ve *Burkholderia* türleri verilebilir. AMP'lerin potansiyel klinik kullanımlarını ve etki mekanizmalarını sınırlayabilecek en önemli faktör, bunların vücutta bulunan proteinazlar tarafından parçalanma durumu sonucu dirençli mutantların meydana gelmesidir (Macfarlane *et al.* 2000). Genel olarak bakteriyel direnç mekanizmaları Çizelge 1.2' de belirtilmiştir.

Çizelge 1.2. Bakteriyel Direnç Mekanizmaları

Direnç mekanizması	Etki şekli	Referans
Hücre içine girişin engellenmesi	Katyonic polipeptitlerin LPS'ye bağlanması ve onu tanınması engellenerek, LPS varlığı ortadan kaldırılarak sağlanabilir. Buna örnek olarak bakteresine dirençli <i>Borrelia burgdorferi</i> verilebilir.	(Scocchi <i>et al.</i> 1993)
Polipeptitlerin proteolizi	AMP'lerin proteolitik işlenmesi, bakteriler tarafından salgılanan birçok proteaz tarafından kolayca gerçekleştirilir. Bir AMP içindeki bazı veya bütün amino asitlerin D-amino asitlerle ikame edilmesi, DJK-5, DJK-6, M33 ve GL13K dahil olmak üzere AMP'lerin proteolitik bozulmasına karşı direnci arttırmak için kullanılmıştır.	(Olsen and Potempa 2014)
Polipeptitlerin hücre dışına pompalanması	Antimikrobiyal etkili katyonic polipeptitlerin hücre içinde aktivitesini göstermeden direk hücre dışına pompalanmasını sağlayan sistemler mevcuttur.	(Olsen and Potempa 2014)
Hücre içindeki hedeflerin değişikliğe uğraması	AMP'lerin hedefe spesifik etki mekanizmalarını engelleyerek öldürücü özellikleri ortadan kaldırılabilir. Örneğin, <i>E. coli</i> 'deki gyrB geninde meydana gelen bir mutasyon, mikrosin B17'nin hedef aldığı DNA giraz enziminde değişiklik yaparak bakterinin bu maddeye karşı duyarlılığının azalmasına sebep olur.	(del Castillo <i>et al.</i> 2001)

1.5. Antimikrobiyal Polipeptitlerin Klinik Kullanımları

AMP'ler genel olarak bakteriler, mantarlar, bazı parazitler ve virüsleri de içine alan mikroorganizmalara karşı çok geniş bir etki aralığına sahiptir. Ayrıca bu mikroorganizmaların AMP'lere karşı direnç gelişme potansiyeli düşük olmakla birlikte, AMP'ler, hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığı düzenleyici etkileri bulunan

1. GİRİŞ

maddelerdir. Tüm bu özellikleri sayesinde özellikle antibiyotik direnciyle savaşın çok zor olduğu bu dönemlerde, AMP'lerin terapötik etkisinden yararlanmak için çeşitli stratejiler denenmektedir (J Afacan *et al.* 2012).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için yeni antimikrobiyal madde arayışında olan birçok ilaç şirketi, keşfedilen AMP'leri bir an önce piyasaya sürmek istemektedir. Son araştırmalarda, doğal AMP'lerin biyolojik olarak etkili olan kısımlarını içeren, küçük molekül ağırlığına sahip ve aynı zamanda uygun maliyetli yarı sentetik moleküller üzerinde durulmaktadır (Ortucu *et al.* 2018). Çizelge 1.3' de klinik çalışma aşamasındaki AMP'ler ve kullanım amaçları özetlenmiştir.

Çizelge 1.3. Klinik Çalışma Aşamasındaki AMP'ler (Yoneyama and Katsumata 2006)

Polipeptit adı	Tanımı	Kullanım amacı	Faz çalışması	Şirketi
Omiganan	İndolisidin'in sentetik analogu	Kateter enfeksiyonlarının, şiddetli akne ve çeşitli cilt hastalıklarının önlenmesinde topikal antiseptik	III/II	Migenix/BioWest therapeutics Cutanea Life Sciences
Pexiganan	Maganin 2'nin sentetik analogu	Topikal antibiyotik / diabetik ülserlerde	III	MacroChem
Iseganan	Protegrin 1 türevi	Oral mukozitten korunmada	III	Ardea Biosciences
LTX-109	Peptidomimetik	Topikal antibiyotik Kolonize olmuş nazal MRSA	I/II	Lytic Biofarma

1. GİRİŞ

Çizelge 1.3. Klinik Çalışma Aşamasındaki AMP'ler (Devamı)

hLF1-11	Lactoferrin türevi	Bakteriyemi ve mantar enfeksiyonlarında	I/II	AM Pharma
OP-145	LL-37 türevi	Kronik orta kulak tedavisinde	II	Octoplus
Novexatin - NP213	Siklik arginin bazlı heptamer	Fungusidal	II	Novabiotics
NVB302	B sınıfı lantibiotik	<i>Clostridium difficile</i>	I	Novacta
MU1140	Lantibiyotik	Gram pozitif bakteriler (<i>Clostridium difficile</i> , MRSA)	Klinik öncesi	Orogenics
Arenicin	21 aa arjinin ve hidrofobik aa'lerce zengin	Çoklu dirençli Gram pozitif bakteriler	Klinik öncesi	Adenium Biotech
Avidocin ve purocin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'dan modifiye edilmiş R-tipi bakteriyosinler	Dar spektrumlu antibiyotik	Klinik öncesi	AvidBiotics
IMX 924	Sentetik 5-aa peptidi	Gram pozitif ve negatif bakteriler	Klinik öncesi	Iminex

1.6. Terapotik Fungusların Tarihçesi

Tarihte ilk uygarlıklardan beri başta Asyalılar ve Mısırlılar olmak üzere fungusların iyileştirici özelliklerine ithafen onları yaşamın iksiri olarak tanımlıyorlardı (Mizuno *et al.* 1995).

Bilim ilerledikçe fungusların iyileştirici özellikleri tespit edilmiş ve yeni keşfedilen türlerle birlikte onların biyoaktif birçok bileşiğin de kaynağı olduğu görülmeye başlanmıştır (Schultes *et al.* 2001; Hobbs 1995). Medikal anlamda yapılan araştırmalar funguslar tarafından üretilen bileşiklerin yaklaşık 126 farklı tedavi amaçlı fonksiyonunun olduğunu göstermiştir (Wasser 2011). Basidiomisetler ve askomisetler bu fungus çeşitliliğinin büyük çoğunluğunu oluşturmakla beraber anti-bakteriyel, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuar, antitümör ve immün modülasyon etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Blackwell 2011).

İkincil (sekonder) metabolitler canlının normal büyüme, gelişme ve üremesinde doğrudan ilişkisi olmayan organik bileşik türleri olup funguslarda sekonder metabolit açısından zengindir (Mizuno *et al.* 1995a; Zjawiony 2004). Keşiflerinden bu yana, ikincil metabolitler, antitümör aktivite de olmak üzere bakteriler, mantarlar, protozoa, parazitler ve virüslere karşı antimikrobiyal aktivite de dahil bir biyolojik aktivite sergilemiştir (Zjawiony 2004).

1.7. Filamentöz Fungus Kaynaklı Antimikrobiyal Polipeptitler

Filamentöz fungusların dış ortama salgıladıkları antimikrobiyal özellikteki polipeptitler, asidik izoelektrik noktalı proteinlerdir. Bu polipeptitlerin arasında, serin proteazları sıklıkla bulunur. Genler tarafından kodlanan bu polipeptitlerin primer dizileri glisin, sistein, histidin, prolin, tirozin, arjinin, lizin ve serin amino asitlerini yüksek oranda taşırlar. Genellikle küçük molekül ağırlıklıdır (5-8 kDa) (De Oliveira *et al.* 2011).

AMP'ler özellikle immün sistem hücreleri tarafından patojen mikroorganizmalara karşı üretilmektedir. Bu nedenle enfeksiyonların tedavisinde etkin kullanım potansiyeline

sahiptir. Bu yaklaşım yeni tedavi stratejilerinin önünü açmakta ve antibiyotik kullanımına alternatif bir yol sunmaktadır (Di Luca *et al.* 2012).

Yukarıda da bahsedildiği gibi doğada bulunan filamentöz fungus türleri, toksin ve antibiyotikler gibi endüstriyel ve tıbbi öneme sahip sekonder metabolitlerin üretimini yapmaktadır. Fungal sekonder metabolitlerden olan antimikrobiyal ajanlar bakteriyel enfeksiyonların kontrol altına alınmasını sağlamakta ve çeşitli farmasötik süreçlerde kullanılmaktadır (Turner 1971).

Günümüzde, bakteriler arasında meydana gelen horizontal gen transferleri ve mutasyonlar sonucu, antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizmaların (süper mikroorganizma) gelişimi enfeksiyonlar da büyük bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle yeni antimikrobiyal ajanların keşfi, zorunlu ve aynı zamanda da süreklilik arz etmesi gereken bir durum haline almıştır (Shen *et al.* 2018). Son yıllarda araştırmacılar, mikroorganizmalarla mücadelede; daha spesifik ve daha etkili yeni bir antimikrobiyal grubu olan doğal polipeptitler (AMP'ler) üzerine odaklanmıştır.

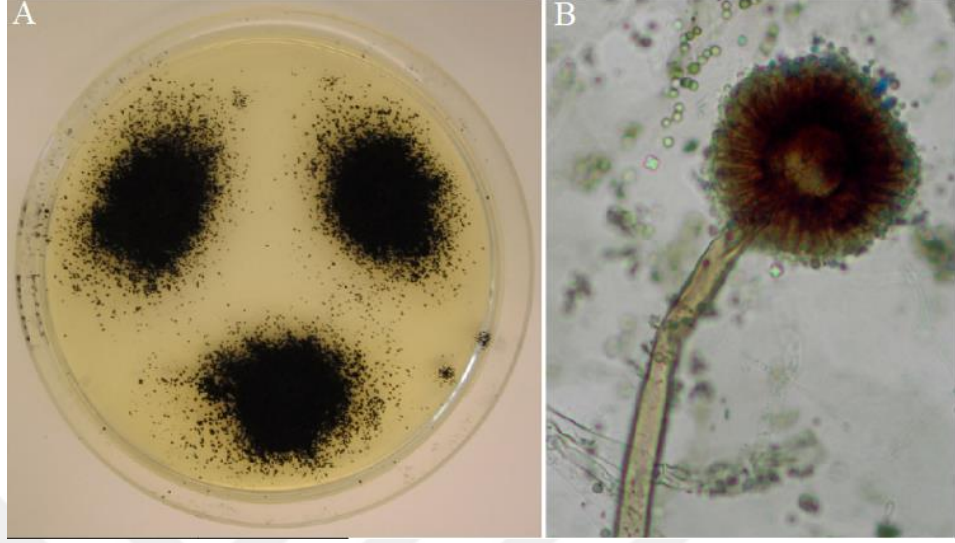
1.8. *Aspergillus niger*' in Biyoteknolojik Önemi

A. niger, endüstriyel amaçlı kullanılan ve oldukça zengin bir metabolizmaya sahip fungus türüdür (Schuster *et al.* 2002). 1923'ten beri *A. niger*, ticari olarak sitrik asit üretimi ve çoğunlukla gıda, kozmetik, farmasötik preparatlar için kullanılmıştır (Blumenthal 2004). Ayrıca bu fungus, 1960'lardan bu yana gıda endüstrisinde kullanım amacıyla α -amilaz, selülaz ve pektinaz üretimleri için muazzam bir enzim kaynağı olmuştur (Schuster *et al.* 2002). Bunlara ek olarak *A. niger*, geleneksel konak organizmalarda eksprese edilmesi zor olan proteinleri doğru şekilde işleyebilen post-translasyonel mekanizmalara da sahiptir. Sonuç olarak, proteinlerin rekombinant üretimi amacıyla da potansiyel bir kaynak oluşturmaktadır (Blumenthal 2004).

A. niger'in gelişimi boyunca koloniler zamanla soluk sarıya bürünmeye başlar ancak sonrasında siyah konidi yapıları oluştururlar. Biseriat, ağır şartlarda genellikle metula ve fiyalidlerini gizler. Konidiler küresel ve pürüzlü yüzeye sahiptir. (Samson *et*

1. GİRİŞ

al. 2002). Şekil 1.4 A'da *A. niger*'in koloni görüntüsü Şekil 1.4 B'de ışık mikroskobu altındaki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 1.4. A. *A. niger*'in Petri Görüntüsü, B. Koniyofor ve Konidiler (Svanström 2013)

1.9. Tez Çalışmasının Amacı ve Önemi

Son yıllarda araştırmacılar, antibiyotiklere karşı artan dirençten dolayı bakteriyel enfeksiyonlara karşı yeni ajanların keşfine yönelmişlerdir. Bu yeni ajanlar için antibiyotiklerden önce keşfedilen ve antibiyotikler kadar direnç geliştirilemeyen AMP'ler üzerine odaklanmışlardır. Antimikrobiyal Polipeptit Veritabanı'nda (ADP3) bugüne kadar toplam 3051 adet antimikrobiyal protein tanımlanmıştır. 2000'nin üzerinde polipeptit memeliler ve bitkilere ait olup bunu bakteriler takip etmektedir. Ancak funguslara ait toplamda 18 kayıt bulunmaktadır (Wang *et al.* 2015). Bunlardan yalnızca iki tanesinin *Aspergillus* cinsine ait olması, bu filamentöz fungusun antibakteriyel polipeptit üreticisi türleri kapsadığını; ancak çalışmaların yetersizliğinden dolayı henüz tamamının ortaya çıkarılmadığını göstermektedir.

1999'da Gun Lee ve arkadaşları tarafından *A. niger*'in kültür süpernatantından antifungal bir polipeptit izole edilmiştir. Anafp olarak adlandırılan bu polipeptit 'in bütün amino asit dizisi belirlenmiş ve peptidin, altı sistein kalıntısı dahil 58 amino asit içeren tek bir polipeptit zincirinden oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca anafp, maya suşlarına ve filamentli funguslara karşı 4 ila 15 mM aralığında güçlü inhibitör aktiviteler sergilemiştir.

1. GİRİŞ

Buna karşılık, Anafp, 50 mM'de bile *E. coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir (Lee, Shin *et al.* 1999).

Yazıcı tarafından 2018' de yapılan çalışmada filamentöz funguslardan antibiyofilm aktivitesine sahip ekstrasellüler polipeptitlerin izolasyonu amaçlanmış olup *Aspergillus tubingensis* olarak tanılanan türün *S. aureus* ve MRSA suşlarına karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Yazıcı 2018). Tüm bu bulgular sonucunda *Aspergillus* cinsi fungusların antimikrobiyal özellikleri mevcut olmakla birlikte bu konuda yapılan çalışmalar oldukça azdır. ADP3'ye kayıtlı veriler *Aspergillus* cinsi fungusların antibakteriyel polipeptit keşfi için potansiyel bir kaynak olduğunu göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı AMP keşfi için, ökaryotik organizmalar grubundan *Aspergillus* cinsine ait LC3 izolatu AMP üreticisi fungus olarak seçilmiştir. Ayrıca bu cinse ait funguslar biyoteknolojik üretim proseslerine olan yatkınlıklarından dolayı da ekstra bir avantaj sağlamaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gun Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (1999) antifungal bir polipeptit olan anafp, *A. niger*'in kültür süpernatantından izole edilmiştir. Anafp'in bütün aa dizisi belirlenmiş ve peptidin, altı sistein kalıntısı dahil 58 aa içeren tek bir polipeptit zincirinden oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca anafp, maya suşlarına ve filamentli funguslara karşı 4 ila 15 mM aralığında güçlü inhibitör aktiviteler sergilemiştir. Buna karşılık, Anafp, 50 mM'de bile *E. coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir (Gun Lee *et al.* 1999).

Mygind ve arkadaşları (2005) tarafından saprofit bir canlı olan *Pseudoplectania nigrella*' dan ilk kez defensin protein grubuna ait olan plektasin tanımlanmıştır. Tanımlanan bu protein defensin grubu proteinlerdeki gibi birincil, ikincil ve üçüncül yapılara sahiptir. Rekombinant olarak üretilen bu protein çok yüksek verim ve saflıkla üretilmiştir. Ayrıca plektasinin *Streptococcus pneumoniae*'a karşı öldürücü etkisi olmakla birlikte farelere karşı yapılan in vivo testlerle çok düşük toksitesine olduğu bulunmuştur (Mygind *et al.* 2005).

Park ve arkadaşları (2008) *Aspergillus oryzae* türünden 17 kDa'lık olan bir exAP-AO17 proteinini izole etmişlerdir. Bu AMP *Fusarium moniliform* ve *Colletotrichum coccodes* gibi patojenik funguslara, *E. coli* O157 ve *S. aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra exAP-AO17'nin üretiminin fizyolojik koşullar tarafından çok fazla değişkenlik gösterdiğini rapor etmişlerdir (Park *et al.* 2008).

Sheikh ve arkadaşları (2016) WR12 ve D-İK8 adlı sentetik AMP moleküllerinin *S. aureus*' a karşı olan antimikrobiyal etkilerini saptamışlardır. Buna ek olarak MRSA (metisilin dirençli *S. aureus*) ve VRSA (vankomisin dirençli *S. aureus*) suşlarının klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkili olan bu polipeptitler, ayrıca biyofilm üzerine de etkili sonuçlar vermiştir. Son olarak araştırmacılar, klinik çalışmalarda kullanmak için bu polipeptitlerin karakterizasyonunu yapmışlardır (Sheikh 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hajji ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları çalışmada AcAMP olarak adlandırılan *Aspergillus clavatus* ES1 suşundan 6 kDa'luk bir AMP izole edilmiştir. AcAMP, antimikrobiyal aktivitesi olan küçük, sistein açısından zengin, temel proteinler grubuna ait proteolitik enzimlere duyarlı, pH 5,0 ve 10,0 arasında stabil ve ısıya dayanıklıdır. Bu çalışmada AcAMP'nin rekombinant olarak elde edilmesi amaçlanmıştır. Ortaya çıkarılan amino asit dizisi ise diğer askomiset antifungal polipeptitlerle yüksek bir benzerlik göstermiştir. Antifungal aktivitesine ek olarak, AcAMP, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite sergileyen ilk fungal peptiddir. Bu özelliklerine dayanarak AcAMP'nin bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde ve gıdaların korunmasında potansiyel uygulamalarda kullanılabileceği saptanmıştır (Hajji *et al.* 2010).

Boon Lim ve arkadaşları (2016) AMP üreten bakteri taraması için topraktan izolasyon yapmışlar ve izole ettikleri *Basillus amyloliquefaciens*'ten geniş spektruma sahip yeni bir bakteriyosin tanımlamışlardır. Özellikle gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes*'e karşı bakterisidal aktivitesinden dolayı, izole ettikleri bakteriyosinin gıda endüstrisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir (Lim *et al.* 2016).

Sun ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada antibakteriyel bir polipeptit olan SP-1, Sephadex G-25 ve Superdex 7510 kolonlarıyla kromatografik olarak ayrılmış ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile de karakterize edilmiştir. Bu polipeptit, bir dizi kromatografik yöntemle *Spirulina platensis*'in alkalik proteazı ve papain hidrolizatından izole edilmiştir. aa dizisi, sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS / MS) ile belirlenerek 1878.97 Da moleküler kütlesi ile 18 amino asit kalıntısı (KLVDASHRLATGDVAVRA) içerdiği bulunmuştur. SP-1'in minimum inhibitör konsantrasyonu, *E. coli* için 8 mg/mL ve *S. aureus* için 16 mg/mL olduğu bulunmuştur. Hemoliz testi sonucu peptidin toksik olmadığı belirlenmiş olup bu polipeptitlerin bu özelliklerinden dolayı antimikrobiyal ajanlar olarak ümit vadettiği vurgulanmıştır (Sun *et al.* 2016).

Regmi ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları çalışmaya göre antimikrobiyal bir polipeptit olan CSpK14'nın antibakteriyel aktivitesi VRSA ve vankomisine dirençli *Enterococci* (VRE)'ye karşı, antibiyotiklerle olan sinerjik etkileri ise β -laktamlarla

2. KAYNAK ÖZETLERİ

değerlendirme yapılmıştır. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* fermente gıdalardan (kimchi) izole edilmiştir. CSpK14, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yoluyla saflaştırılmıştır. Ardından Sepharose Cl-6B ve Sephadex G-25 kolonları kullanılarak kromatografik yöntemle ayrılmışlardır. CSpK14 ve Tricine SDS-PAGE ile yaklaşık 4,6 kDa'lık bir protein olduğu saptanmıştır. CSpK14, β -laktamların minimum inhibitör konsantrasyonlarını (MIC) önemli ölçüde azaltmıştır. VRSA ve VRE'ye karşı non-laktamlar üzerinde hiçbir etki göstermemiştir. Ayrıca VRSA ve VRE tarafından oluşturulan biyofilmlerin tamamen azaltıldığı saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda CSpK14'ün saflaştırılması basit, moleküler kütlesi düşük, geniş bir pH aralığında stabil, geniş spektrumlu ve antibiyofilm özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. CSpK14, β -laktamların etkinliğini sinerjistik olarak artırdığı için sonuç olarak kombine tedaviye uygun olduğu tespit edilmiştir (Regmi *et al.* 2017).

Zheng ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmaya göre *Aedes aegypti* cecropin A'dan türetilen 36 aa kalıntısına sahip katyonik bir polipeptit olan cecropin A2'nin antimikrobiyal etkinliği ve bakterisidal mekanizması *P. aeruginosa* patojenine karşı çalışılmıştır. Bu polipeptit, memeli hücrelerine karşı çok az hemolitik aktivite ve toksisite göstermiştir. MIC değerleri, klinik *P. aeruginosa* izolatlarının çoğuna karşı 32 ila 64 $\mu\text{g/ml}$ ve diğer Gram-negatif bakterilere karşı 2 ila 32 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Önemli olarak, cecropin A2, tetrasiklin ile kombine edildiğinde *P. aeruginosa*'ya karşı sinerjik aktivite göstermiş olup her iki ajanın MIC değerlerini 8 kat azaltmıştır. Kombinasyon ayrıca *P. aeruginosa* / *Galleria mellonella* modelinde in vivo olarak etkili olmuştur ($P < 0.001$). Bu çalışmada, cecropin A2'nin *P. aeruginosa* lipopolisakkaritlerine bağlandığını, membranı permeabilize ettiğini ve bakteriyel genomik DNA ile etkileştiğini, böylelikle tetrasiklinin sitoplazmaya translokasyonunu kolaylaştıracağı bulunmuştur. Sonuç olarak, cecropin A2 ve tetrasiklin kombinasyonu, *P. aeruginosa*'ya karşı in vitro ve in vivo olarak sinerjik antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu bulgular, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif bir yaklaşım sunmaktadır (Zheng *et al.* 2017).

Mishra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2018), *Ganoderma lucidum*'un gövdesinden (GLF) ve miselyum (GLM) 'den antibakteriyel polipeptit izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Peptit kütle parmak izi ve HPLC, AMP'lerin ana yapısal

2. KAYNAK ÖZETLERİ

özellikleri olduğu bilinen peptit fraksiyonlarında katyonik ve hidrofobik aa'lerin varlığını doğrulanmıştır. Elde edilen fraksiyonlar kayda değer antioksidan potansiyeli sergilemiştir. Bunlar ayrıca, *E. coli* ve *Salmonella typhi*'ye karşı önemli bir antibakteriyel aktiviteye sahiptirler; burada, reaktif oksijen türlerinin oluşmasının ve hücre içi protein sızıntısının indüksiyonunun, inhibitör etkinin olası mekanizmaları olduğu gözlemlenmiştir (Mishra *et al.* 2018).

Doğal katyonik bir AMP olan Cecropin A (CeA), Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivitesi olması onu antimikrobiyal ajanlar açısından çekici hale getirmektedir. Wang ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada, afinite etiketi (His-tag) -füzyon protein ekspresyon sistemi (AT-HIS sistemi), hücre dışı bir protein ekspresyon sistemi (CF sistemi) ve kendiliğinden toplanan polipeptit (ELK16) -füzyonu protein ekspresyon sistemi (SA-ELK16 sistemi) olmak üzere üç farklı yöntemle peptit üretilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, antibakteriyel polipeptit CeA'nın üretimi için uygun bir ekspresyon sistemi (SA-ELK16 sistemi) tasarlanmış ve diğer iki protein ekspresyon sistemi ile karşılaştırılmıştır. SA-ELK16 sistemi ile yüksek saflıkta yüksek bir CeA peptidi verimi elde edilmekle birlikte zaman ve maliyeti büyük ölçüde azaltmıştır (Wang *et al.* 2018).

AMP'ler gelecekteki antibiyotiklerin gelişimi için umut verici adaylardır. Irazazabal ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmaya göre tedavi amaçlı kullanılan AMP'lerin etkinliğini artırmak amacıyla PaDBS1R1 adında yeni bir polipeptit tasarlanmıştır. PaDBS1R1, karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (6.25 mM MIC) ve metisiline dirençli olmak üzere Gram-negatif (1.5 mM MIC) ve Gram-pozitif (3 mM MIC) bakterilere karşı düşük mikromolar derecede geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu çalışma, PaDBS1R1'in antibiyotik tedavisinde potansiyel uygulamaya sahip olduğunu ortaya koymuştur (Irazazabal *et al.* 2018).

Candida türleri, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda yüksek ölüm oranına sahip kutanöz ve sistemik enfeksiyonlara neden olan canlılardır. En yaygın antifungal ilaçlara karşı direncin ortaya çıkması, ayrıca biyofilm oluşumu nedeniyle, alternatif antifungal ajanların gelişmesini gerektirir. Roscetto ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada bir arke denizden izole edilen AMP VLL-28, 10 klinik *Candida* spp. izolatına

2. KAYNAK ÖZETLERİ

karşı benzer antifungal aktivite göstermektedir. Bu peptidin florese edilmiş bir türevini kullanarak, VLL-28'in planktonik hücrelerin yüzeyine bağlandığı bulunmuştur. Bu gözlem, hücre duvarına zarar vererek antifungal aktivite gösterebileceğini ileri sürmektedir. Ek olarak, konfokal mikroskopisi ile biyofilmler üzerinde yapılan analizler, VLL-28'in test edilen tüm suşlardan, *C. albicans* ve *C. Parapsilosis*'e karşı daha fazla aktivite gösterdiği saptanmıştır (Roschetto *et al.* 2018).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında (YÜTAM) yapılmıştır. Kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri

Cihaz Adı	Model
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™ MP
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™ ve Mini Protean Tetra Cell
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Elisa Plak Okuyucu	Biotek EPOCH
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
PZR Cihazı	SensoQuest Thermocyclers
Işık Mikroskobu	ZEISS, Primo Star
Otoklav	JSR, JSAC-60
pH Metre	OHAUS ST 3100F
Magnetik Isıtıcı	Daihan, shr
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Hassas Terazı	Shimadzu ATX 224
Fermentör	Fermac 320

3.1.2. Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Sigma Aldrich (USA) ve Merck A.S. (USA) firmalarından temin edilmiştir. Besiyerleri, Oxoid A.S. (UK) firmasından temin edilmiştir.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Referans Suşlarının Geliştirilmesi

Referans suşlar olan *S.aureus* ve MRSA bakterileri aşağıdaki şartlara uygun olarak yetiştirilmiştir. Mikroorganizmaların gelişim şartları Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan Mikroorganizmaların Gelişim Şartları

	Sıcaklık	Katı besiyeri	Sıvı besiyeri	Süre
<i>S.aureus</i>	37 °C	LB (Luria-Bertani) agar	MHB (Mueller-Hinton sıvı besiyeri)	16-24 sa
MRSA	37 °C	LB (Luria-Bertani) agar	MHB (Mueller-Hinton sıvı besiyeri)	16-24 sa

3.2.2. Fungusun Kültüre Edilmesi

LC3 kodlu filamentöz fungus yedi gün boyunca PDA (Patates dekstroz agar) besiyerinde 25 °C'de geliştirildikten sonra 100 ml'lik 1:2:1 oranında hazırlanan YPG (yeast-pepton-glikoz) besiyerine 6 mm'lik mantar deliciler ile toplam 10 disk atılarak sıvı kültür başlatılmıştır. Bu sıvı kültürde 25 °C, 150 rpm' de 7 gün boyunca çalkamalı inkübatörde fungus geliştirilmiştir.

3.2.3. Kültür Filtratlarının Hazırlanması ve LC3 İzolatının Antibakteriyel Protein Üretiminin Doğrulanması

Antibakteriyel özelliği test edilecek LC3 izolatının agar difüzyon, tripsin/proteinaz K parçalama ve protein izolasyonu deneylerinde kullanılmak üzere kültür filtratları elde edilmiştir. YPG besiyerinde yetiştirilen filamentöz fungus, hücresel kısımlarından ayrılarak süzme ve 10 dakika 9000 rpm'de yapılan santrifüjleme ile kültür filtratları elde edilmiştir. Süpernatant 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir.

3.2.3.1. Agar Difüzyon Testi

Filamentöz fungusun antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için agar difüzyon testi kullanılmıştır. Agar difüzyon testinde, %0,8 agar katılarak hazırlanan soft MHB besiyeri ile dökme plak yöntemi uygulanır. Bu petriler içinde, 6 mm mantar delici ile kuyular açılarak, bu kuyulara kültür filtratları eklenmiştir. Sonra petriler düz bir şekilde 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda inhibisyon zon çapları belirlenmiştir (Wiegand *et al.* 2008). Bu deney 3 kez tekrar edilmiştir.

3.2.3.2. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Yöntemi

Antimikrobiyal aktivitenin protein kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılan bu yöntemde, hücresiz kültür filtratlarının pH'sı 7'ye ayarlanarak proteazların çalışmasına uygun hale getirilmiştir. Hücresiz kültür filtratı 10 mg/ml tripsin ve 10 mg/ml proteinaz K ile 37 °C'de 6 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda 100 °C'de 5 dakika bekletilerek, proteazlar inaktive edilmiştir. Ardından tripsin/proteinaz K ile muamele edilmiş, 100 °C'de bekletilmiş ve hiçbir müdahale yapılmamış kültür filtratı olmak üzere 3 deney grubu dökme plak yöntemiyle hazırlanan soft MHB besiyerine yerleştirilen disklerin üzerine son konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde emdirilmiştir (Dusane *et al.* 2013). Bu deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.3.3. Çapraz Ekim Testi

7 günlük katı PDA besiyerinde geliştirilen filamentöz fungusdan 6 mm mantar delici ile disk alınıp, bu diskler önce 25°C'de 7 gün süreyle YPG agar besiyerinde geliştirilmiştir. 7. gün referans bakteri suşları fungus gelişim bölgesine 1 cm kalacak şekilde çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. 8. günde bakterilerin gelişimleri değerlendirilmiştir (Lertcanawanichakul and Sawangnop 2011). Bu deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.3.4. Radyal İnhibisyon Testi

Filamentöz funguslardan 6 mm mantar delici ile disk alınarak, ters bir şekilde 25°C'de 7 gün boyunca YPG agar besiyerinde geliştirilmiştir. Süre sonunda referans bakteri suşları dökme plak yöntemiyle fungus kültürünün üzerine inokule edilmiştir. 1 gün sonra, inhibisyon zon miktarları değerlendirilmiştir (Lee *et al.* 2004). Bu deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.4. Ultrafiltrasyon

Filamentöz fungusun sıvı kültüründen elde edilen kültür filtratlarının yoğunlaştırılması için ultrafiltrasyon yöntemi uygulanmıştır. Filamentöz fungusun hücresiz kültür filtratlarından 60 ml alınıp, ultrafiltrasyon tüplerine (3 kDa MWCO)

eklenmiş ve 6000 rpm'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından kolonun üst kısmında kalan yoğunlaşmış kültür filtratı protein izolasyonu ve antimikrobiyal testler için yeni tüplere alınmıştır (Dusane *et al.* 2013). Filtrasyon işlemi protein izolasyonu ve antimikrobiyal test için 7 gün boyunca her gün tekrarlanmış olup aynı işlemler erlen skalasında geliştirilen kültür için de tekrarlanmıştır.

3.2.5. Protein İzolasyonu

Kültür filtratlarından alınıp filtrasyon işlemine tabi tutulan örneklerden protein izolasyonu yapılmıştır. Bunun için eşit hacimde %20 TCA (trikloro asetik asit) ile pipetaj yardımı ile karıştırılıp, -20 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda, 13500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. 3 kez %70'lik etanol ile yıkanarak 13500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak, aseton ile yapılan yıkama sonucunda, oda sıcaklığında pellet kurutularak -20 °C'de saklanmıştır (Chen 2005).

3.2.6. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde önceden hazırlanan 1X Bradford solüsyonundan 96 kuyulu plaklara 90 µl alınmıştır ve üzerine 10 µl protein örneğinden eklenmiştir. 10 dakikalık inkübasyon sonucu, 590 nm'de ölçüm alınarak sığır serum albümini (BSA) ile hazırlanan standart grafiğin formülüyle protein konsantrasyonu belirlenmiştir (Bradford 1976).

3.2.7. SDS-PAGE

SDS-PAGE yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrılmaları temeline dayanan elektroforez tekniği ile proteinlerin analizinde ve ayrılmasında geniş çapta kullanılmıştır. 1-100 kDa proteinleri görünür hale getirmek için %15'lik akrilamid jel hazırlanmıştır.

Protein örnekleri, 4X yükleme boyası ile karıştırılarak 1X konsantrasyonu halinde 95 °C'de 5 dakika kaynatılmıştır. Süre sonunda yeniden oluşabilecek sekonder yapıların oluşmasını engellemek için buza alınmıştır. Örnekler hazırlanmış olan SDS-PAGE jeline

yüklenmiştir. Protein örnekleri 80 V'da 3 saat yürütülmüştür. Yürütme tamamlandığında jel kasetten alınarak, Coomassie R-250 boyası ile 20 dakika boyunca boyanmıştır. Proteinlerin görüntülenmesi için yıkama solüsyonunda 1 saat bırakılmıştır. Görüntülenmeye hazır hale getirilen jel, Bio-Rad jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır (Schägger 2006).

3.2.8. Jel Kapatma Testi

Bu yöntem proteinlerin kromatografik yöntemlerle ayırtırmadan önce yapılan ve hangi proteinlerin antimikrobiyal etki taşıdığını gösteren bir çalışmadır. Antibakteriyel aktivite taşıyan proteinlerin karışımı SDS-PAGE ile birbirinden ayrılmıştır. Jel kapatma testi yapılacak olan jelle boyama yapılmamış olup önce 1X PBS solüsyonuyla sonra saf suyla 20 dakika boyunca yıkanmıştır. Ardından SDS-PAGE jeli kesilerek, soft MHB besiyeriyle dökme plak yapılan bakteriler üzerine yerleştirilmiştir. 1 gecelik inkübasyon sonucu gelişmenin olmadığı zon bölgesine denk gelen proteinin antibakteriyel aktiviteden sorumlu olduğu bulunmuştur (Liu *et al.* 2012). Bu deney 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.9. AMP'nin Saflaştırılması

Jel kapatma deneyinin sonuçlarına göre antimikrobiyal aktivitesi belirlenen banttaki protein, uygun filtrasyon tüpleri (30 kDa'luk) kullanılarak 13500 rpm'de 10-15 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından filtrasyon tüplerindeki kolonlardan alınan protein örneği, MIC belirleme ve sinerjik etkinin belirlenmesi deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.10. AMP'nin Günlere Göre Üretiminin Değerlendirilmesi

Antibakteriyel aktiviteden sorumlu olduğu belirlenen proteinin günlere göre üretim grafiğinin belirlenmesi için erlen skalasından sonra fermentörde üretim gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 7 gün boyunca hergün kültür filtratı örnekleri alınarak protein izolasyonu yapılmıştır. 7 günlük YPG besiyerinde büyütülen referans kültürden 10 ml kadar inokülasyon yapılarak 3 litrelik hazırlanan fermentörde (Şekil 3.1) funguslar aşağıdaki parametrelere göre geliştirilmiştir.



Şekil 3.1. Filamentöz Fungusun Geliştirildiği Fermentör Sistemi

Çizelge 3.3. Fermentör Parametreleri

PH	6,2
SICAKLIK	25 °C
KARIŞTIRMA HIZI	300 rpm
ÇÖZÜNMÜŞ OKSİJEN SEVİYESİ	%10±2

7 günlük fermantasyon boyunca her gün antibakteriyel özellikteki peptitlerin ön seleksiyonu için YPG besiyerinde yetiştirilen filamentöz funguslar hücresel kısımlarından ayrılarak süzme ve 10 dakika 9000 rpm’de yapılan santrifüjleme ile kültür filtratları elde edilmiştir. Süpernatant 0,22 µm’lik filtreden geçirilmiştir.

3.2.11. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MIC) Belirlenmesi

Filamentöz fungustan izole edilen polipeptidin MIC değerinin belirlenmesi için, “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST)’dan alınan protokoller uygulanmıştır (<http://www.eucast.org/>). MIC mikroorganizmaların gelişimini

engelleyen en küçük madde konsantrasyon miktarıdır. Bu miktarı tespit etmek için sıvı dilüsyon metodu uygulanmıştır. Özetle, 96 kuyulu plaklara 0,5 McFarland konsantrasyonunda bakteri hücrelerinden 100 µl ve belirli konsantrasyonlarda (0,25;0,5;1;2;4;8;16;32;64;128 µg/µl) izole edilen protein eklenmiştir. Total hacim 200 µl'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak içinde sadece besiyeri içeren grup, pozitif kontrol olarak da içinde bakteri hücresi ve besiyeri olan grup kullanılmıştır. 30 °C'de, 24 saatlik inkübasyon sonucunda kuyulardan 100 µl örnek alınarak MHA besiyerine yayma plak olarak ekim yapılmıştır. Bu petrilerin, 30 °C'de, 24 saatlik inkübasyon sonucu koloni gelişimi gözlenmeyen kuyudaki konsantrasyon değeri MIC değeri olarak tespit edilmiştir. Bu deney 3 kez tekrar edilmiştir.

3.2.12. Antimikrobiyal Peptidin Sinerjik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Filamentöz fungusdan izole edilen polipeptidin antibiyotiklerle ortak etkisini belirlemek için, disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada antibiyotik olarak kloramfenikol ve ampisilin kullanılmıştır. Tüm örneklerden 1 µg/ml konsantrasyon olacak şekilde steril disklere emdirilmiştir. 30°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda zon miktarları belirlenmiştir (Balke *et al.* 2006). Bu deney 3 kez tekrar edilmiştir.

3.2.13. Filamentöz Fungusun Tanısı

3.2.13.1. Klasik Tanı

Fungus izolatından alınan kesitler laktofenol pamuk mavisi damlatılarak boyanmıştır. Daha sonra boyanın iyice dağılması için bir miktar alkol damlatılmıştır. Kesitin hazırlandığı lamın üzerine lamel kapatılarak besiyerinin erimesi amacıyla hafifçe alevden geçirilmiştir. Elde edilen preparat ışık mikroskobu altında incelenmiştir. İncelenen preparatlar, koloni morfolojileri ve mikroskobik özellikleri bakımından değerlendirilerek cins bazında tanımlanmıştır (Samson 2010).

3.2.13.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu 7 günlük PDA kültüründen manuel olarak yapılmıştır. 2 ml'lik ependorf tüplerine alınan bir öze dolusu miselyum örneği üzerine 1 ml liziz tamponu eklenmiştir. 30 dakika, maksimum hızda homojenizatörde parçalanmıştır. 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjün ardından, üst kısım yeni tüpe alınmış ve 2 µl RNase A eklenmiştir. 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Üzerine 1 hacim fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklenmiştir. Vorteks yapılarak, 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısım yeni tüpe alınmıştır ve -20 °C'de 1 saat %100 alkol ile DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrası oluşan pellet % 70'lik etanol ile üç kez yıkanarak havada kurutulmuş ve 50 µl TE tamponunda çözülmüştür (Ausubel *et al.* 1995).

3.2.13.3. ITS Bölgesinin PZR ile Çoğaltımı

PZR, fungus DNA'sında korunmuş bölgeleri çoğaltmak ve moleküler tanı yapmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.5'de PZR reaksiyonu ve Çizelge 3.6'da PZR cihazında kullanılan program verilmiştir. 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S bölgesinin çoğaltılması için ITS 1 primeri (5' TCC GTT GGT GAA CCA GCG G 3') ve ITS 4 primeri (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. PZR Reaksiyonu

PZR Reaksiyonu	Miktar
dH ₂ O	37,2 µl
10X PZR Tamponu	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP	0,7 µl
Forward Primer	0,8 µl
Reverse Primer	0,8 µl
DNA	2 µl
Taq polimeraz (250 U)	0,5 µl
Toplam = 50 µl	

Çizelge 3.6. PZR Döngüsü

95°C	2 dakika	1 döngü
94 °C	45 saniye	35 döngü
55 °C	45 saniye	
72 °C	1 dakika	
72 °C	10 dakika	1 döngü
4 °C	α	

3.2.13.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi

PZR ürünleri % 1'lik agaroz jel hazırlanarak görüntülenmiştir. 1 g agaroz, 100 ml TAE(Tris-asetat-EDTA) tamponu ile karıştırılarak agaroz tamamen çözününceye kadar kaynatılıp, üzerine 4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklenmiştir. Ardından donan jele PZR ürünlerinin yüklemesi yapılmış ve 90V'da 50 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.13.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması ve DNA Dizi Analizi

PZR ürünlerinden tuzların, primerlerin ve polimeraz enziminin uzaklaştırılması için ticari olarak satılan PZR pürifikasyon kiti (Invitrogen) ile saflaştırılma yapılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

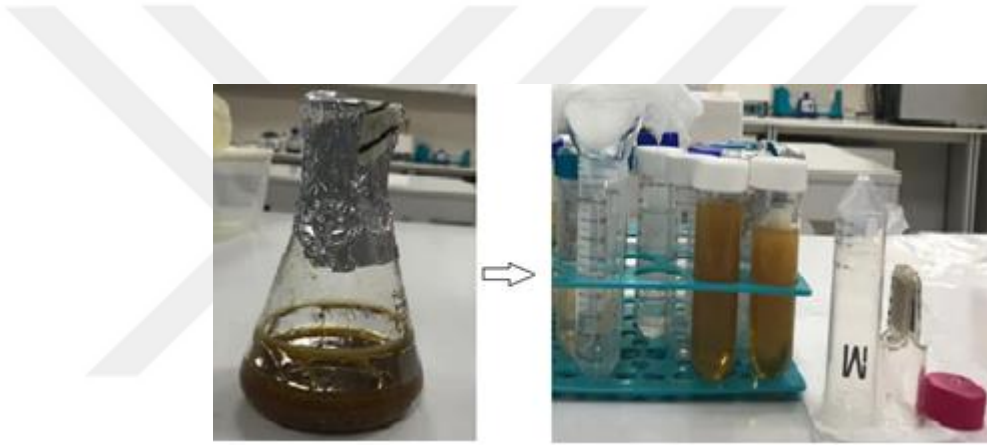
Saflaştırılan örnek ticari bir firma aracılığıyla (Oligomer Biyoteknoloji, Türkiye) her iki primer ile DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen sekans verileri Bioedit software programında birleştirilerek, BLASTN 2.8.1+ kullanılarak analiz edilmiştir (Zhang *et al.* 2000).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. LC3 İzolatının Kültür Filtratlarının Toplanması

LC3 izolatının 25°C’de gelişen 7 günlük katı kültüründen alınan diskler, YPG besiyerinde geliştirilmiştir. 7 günlük gelişimin ardından YPG besiyerinden alınan 10 ml kadar sıvı kültür, fermentör sisteminin içine inoküle edilmiştir. Bu örnekler, 25°C’de 300 rpm’de 7 gün inkübasyona tabi tutulmuştur ve kültür filtratları 7 gün boyunca elde edilmiştir. Şekil 4.1’de kültür filtratı elde etme aşamalarının görüntüsü verilmiştir. Aynı işlemler 7 günlük erlende geliştirilen kültüre de uygulanmıştır.



Şekil 4.1. LC3 izolatından kültür filtratının elde edilmesi

4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

4.2.1. Agar Difüzyon Testi

Elde edilen kültür filtratları, patojen türlerin dökme plak yöntemleri ile hazırlanan soft MHB besiyeri içeren petrilerde 4 mm’lik mantar delici ile açılan kuyulara 100 µl, 6 mm’lik açılan kuyulara ise 200 µl olacak şekilde eklenmiştir. Petriler, 24 saat 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon zonları ölçülüp, ardından zon oluşturan kültür filtratları belirlenmiştir. LC3 izolatı *S. aureus* (ATCC 25923) ve MRSA (Klinik izolat) ya karşı pozitif sonuç vermiştir. Erlen kültüründen ve fermentör kültüründen alınan kültür filtratlarının agar difüzyon test sonuçları sırasıyla

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Erlen kültüründe geliştirilen fungus 4. günden itibaren antimikrobiyal aktivite gösterirken; fermentör sisteminde geliştirilen fungus 6. günden itibaren aktivite göstermeye başlamıştır. Deney grupları arasındaki bu farklar muhtemelen üretim koşullarındaki pH, sıcaklık ve çözülmüş oksijen seviyesi gibi değişkenlerden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.1. Agar Difüzyon Testi Sonuçları (fermentör kültürü)*

İndikatör suş	6.gün	7.gün
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	++	++
MRSA (Klinik izolat)	++	++

*+; 10 mm’den küçük zon, ++; 10-20 mm arası zon , +++; 20 mm’den büyük zon çaplarını temsil etmektedir.

Çizelge 4.2. Zon Çaplarının Değerlendirilmesi (erlen kültürü)*

İndikatör suş	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+++	+++	+++	+++	+++
MRSA (Klinik izolat)	+++	+++	+++	+++	+++

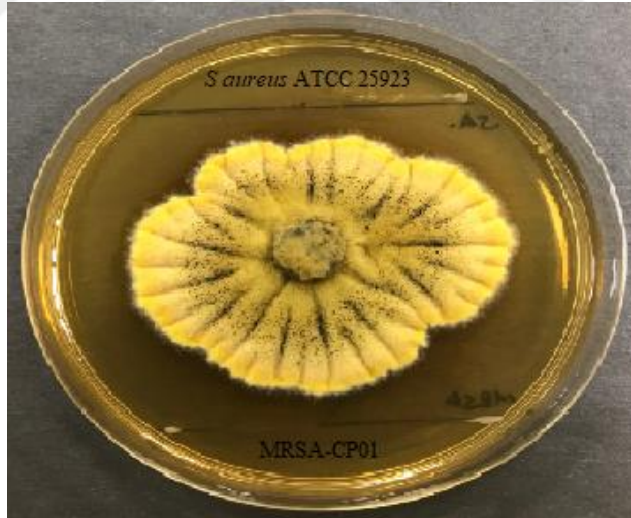
*+; 10 mm’den küçük zon, ++; 10-20 mm arası zon , +++; 20 mm’den büyük zon çaplarını temsil etmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre filamentöz fungus hem *S. aureus*’a hem de MRSA’ a karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Yazıcı (2018)’nın yaptığı çalışmaya göre *A. tubingensis* olarak tanılanan fungus, *S.aureus* ve MRSA’ya karşı 20 mm’den büyük zon göstermiştir (Yazıcı 2018). Erlen kültüründe yaptığımız çalışmaya göre değerler benzerlik göstermektedir. Kalyani ve Hemalatha (2017)’nin yaptığı çalışmaya göre *A. niger*’in kültür filtratının çeşitli bakteri ve mantar türlerine karşı antimikrobiyal etkinliği saptanmış ve *S.aureus* için inhibisyon zon değeri 12 mm bulunmuştur. Agar difüzyon

testimizde bu deęer fermentörde geliŐtirilen filamentöz fungusun verdięi zon deęerlerine benzemekte olup erlende geliŐtirilen kùltürün verdięi inhibisyon zon deęerinden çok daha dűŐüktür (Kalyani and Hemalatha 2017). Bu çalıŐmaya dayanarak gerekli fizyolojik koŐulları optimum tuttuęumuz takdirde LC3 izolatu daha stabil ve etkili bir antimikrobiyal etki gűsterecektir.

4.2.2. Çapraz Ekim Testi

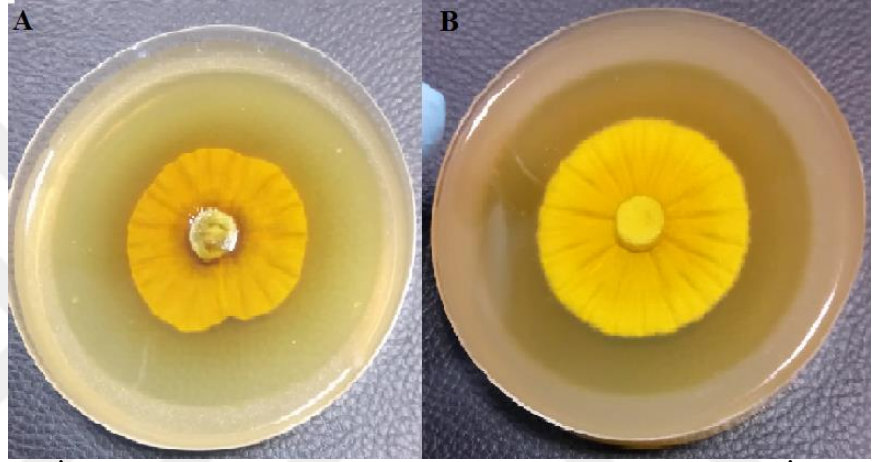
Çapraz ekim yűntemi mikroorganizmaların antagonistik etkisinin tespit için kullanılan oldukça iyi bir yűntemdir (Lertcanawanichakul and Sawangnop 2011). LC3 izolatu ile *S. aureus* ve MRSA bakterilerinin YPG agar besiyerinde ikili kùltürleri yapılarak 7 gűnlük LC3 izolatının yanına bakteriler çizgi ekim yűntemi ile ekilmiŐtir. 1 gűnlük inkübasyonun ardından *S. aureus* ve MRSA'da üremenin engellendięi gűr÷lmüŐtür. Őekil 4.2'de çapraz ekim testine ait petri gűr÷ntüsü verilmiŐtir.



Őekil 4.2. Çapraz Ekim Testi Petri Gűr÷ntüsü

4.2.3. Radyal İnhibisyon Testi

Radyal inhibisyon yönteminde, filamentöz fungusun *S. aureus* ve MRSA bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisini tespit etmek için dökme plak ile hazırlanan kültürler YPG agar besiyerinde gelişen 7 günlük LC3 izolatının üzerine eklenmiştir. 1 günlük inkübasyon sonucunda patojen bakterilerin gelişimleri değerlendirilmiştir. *S. aureus* ve MRSA, LC3 izolatının çevresinde sırasıyla 45 ve 48 mm'lik zon oluşturmuştur. Şekil 4.3'te radyal inhibisyon testine ait petri görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.3. Radyal İnhibisyon Testi. **A.** *S. aureus* **B.** MRSA' a karşı Oluşan İnhibisyon Zonları

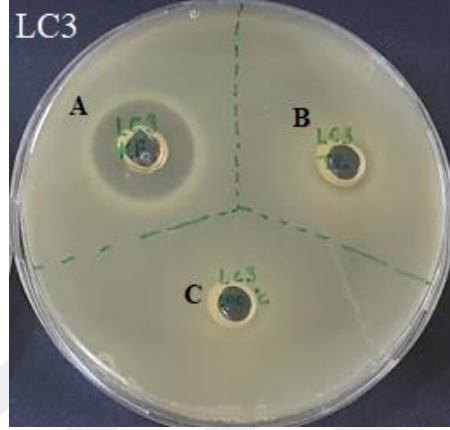
Yazıcı (2018)'in yaptığı çalışmada *A. tubingensis* olarak belirlenen türün *S. aureus*'a ve MRSA'ya karşı verdiği zonlar sırasıyla 35 ve 30 mm'dir (Yazıcı 2018). Bu değerlerle karşılaştırma yaptığımız zaman *Aspergillus* cinsine ait LC3 kodlu fungus çok daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemiştir.

4.3. Tripsin/ Proteinaz K Parçalama Yöntemi

Agar difüzyon testinde oluşan zonların protein kaynaklı olup olmadıklarını anlamak için LC3 izolatının kültür filtratı 37°C'de 6 saat tripsin/proteinaz K enzimleri ile inkübasyona maruz bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu kültür filtratlarının oluşturduğu zonlar agar difüzyon testi ile belirlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda, kültür filtratının pozitif zon vermesi, proteazlarla muamele edilen kültür filtratlarının ise negatif zon vermesi, aktivitenin protein kaynaklı olduğu

sonucunu doğrulamaktadır (Dusane *et al.* 2013). Proteaz muamelesine ek olarak, 100°C’de yapılan kaynatma işleminin de proteinlerin yapısını bozacağından kültür filtratları 100°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu örneklerde de zon oluşumu gözlenmemiştir. Şekil 4.4’te *Aspergillus* cinsine ait LC3 izolatının agar difüzyon testine ait petri görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.4. LC3 İzolatının Agar Difüzyon Testi Görüntüsü. A. Kültür Filtratı B. Proteazlarla Muamele Edilmiş Kültür Filtratı C. 100°C’de İnkübasyona Bırakılmış Kültür Filtratı.

4.4. Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE

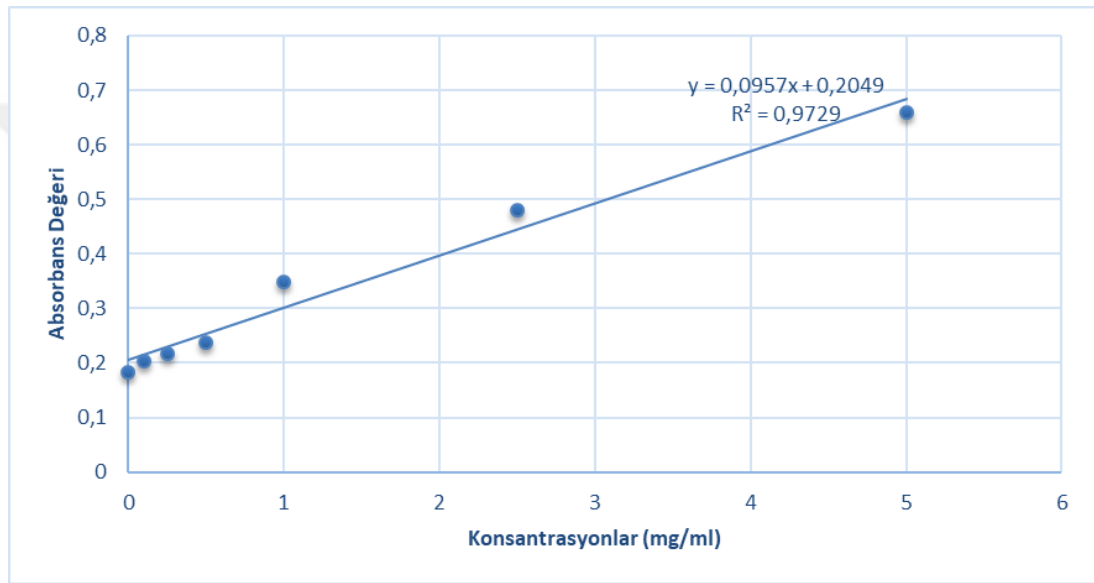
LC3 izolatının kültür filtratı protein izolasyonu yapılmadan önce 3 kDa MWCO ultrafiltrasyon kolonlarıyla yoğunlaştırma yapılmış olup TCA (triklorasetik asit) yöntemi ile fungusun total proteinleri izole edilmiştir. Bu yöntemde proteinlerin, TCA anyonları ile bağlanarak suda çözünmeyen tuzlar oluşturmaları sonucu proteinlerin çökme yöntemi ile eldesini sağlar. TCA, metil karbonun üç hidrojen atomunun klorin atomları ile değiştirildiği bir asetik asit analogudur. TCA zayıf bir asit olmakla birlikte, aa’ler arasındaki polipeptit bağlarını hidrolize edemez ve suyu asidik bir pH’da tutar. TCA’nın çözelti içindeki proteinlere eklenmesi, proteini çevreleyen hidrojen bağlı su moleküllerini uzaklaştırır. Bu protein molekülleri çözünürlüklerini kaybeder ve santrifüjleme ile çöktürülebilir. Bununla birlikte, TCA hidrojen bağı bozduğundan, proteinler ikincil yapılarını da kaybedecek ve denatüre olacaktır (Jiang *et al.* 2004).

Medina ve arkadaşları (2008) ile Lankshman ve arkadaşları (2008)’nin yaptıkları çalışmalara göre filamentöz funguslardan ekstrasellüler proteinlerin izolasyonu için en

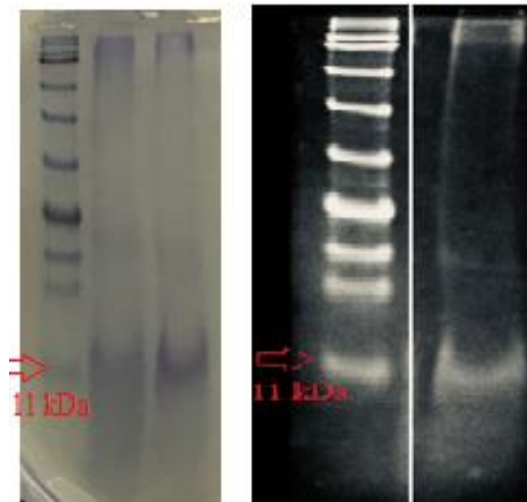
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

iyi yöntemin TCA çöktürmesi olduğundan bu tez çalışmasında bu yöntem kullanılmıştır (Medina *et al.* 2008 and Lakshman *et al.* 2008).

Elde edilen total proteinlerin miktar tayini Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Protein miktar tayini için genellikle tercih edilen bu test, protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Lowry yöntemiyle karşılaştırıldığında çok daha hassas ve güvenilirdir (Kruger 2002). Bradford testi için standart grafik BSA proteini ile hazırlanmıştır. Şekil 4.5’de Bradford standart grafiği verilmiştir.



Şekil 4.5. BSA ile Hazırlanan Standart Grafik

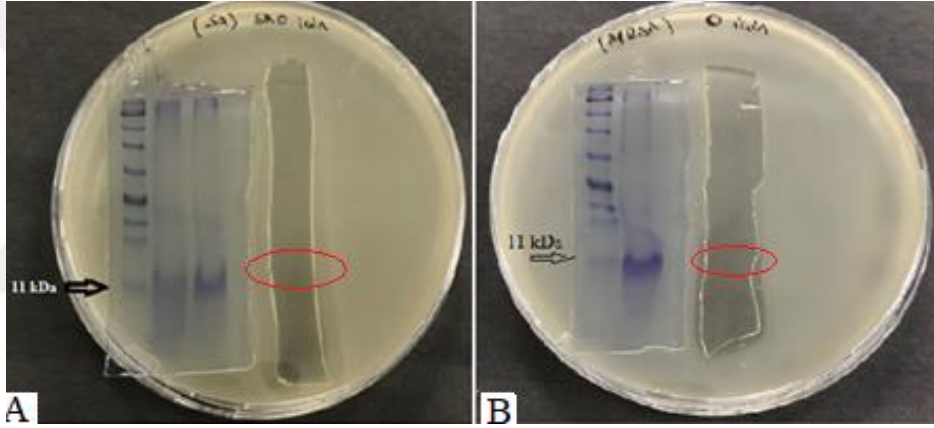


Şekil 4.6. LC3 İzolatının Ekstrasellüler Proteinlerinin SDS-PAGE Profili

Şekil 4.6’da verilen sonuçlara göre erlen kültüründe geliştirilen fungusun total proteinleri, yaklaşık 11 kDa’luk bölgede en yoğun bandı vermiştir.

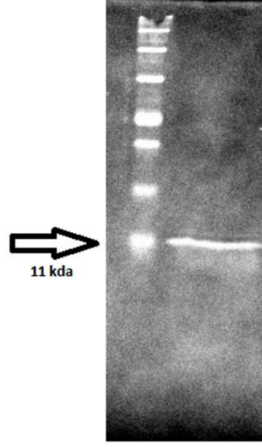
4.4.1. Jel Kapatma Testi

Jel kapatma testinde Şekil 4.7’teki bant profillerine göre 11 kDa’luk bölgeden başlamak üzere *S. aureus* ve MRSA’ya karşı inhibisyon zonları görülmekte olup daha aşağılarda olan bantların daha az yoğun olan protein bantlarından kaynaklandığı saptanmıştır. Bu sonuçlara göre antibakteriyel aktivite gösteren bandın 11 kDa’luk bir protein olduğu görülmektedir. Bu tek bant Şekil 4.6’deki erlen kültüründen izole edilen total proteinlerden 30 kDa’luk filtre kullanılarak saflaştırılmıştır.



Şekil 4.7. A. Total Proteinlerin *S. aureus*'a Karşı Jel Kapatma Sonuçları B. MRSA'ya Karşı Jel Kapatma Sonuçları

4.4.2. Polipeptidin Saflaştırılması

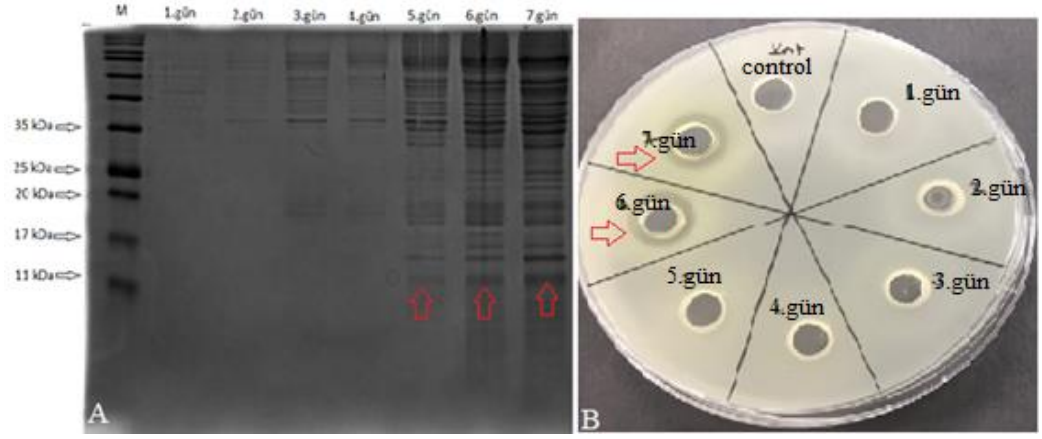


Şekil 4.8. Antimikrobiyal Aktivite G6steren Saf Protein Bandı

SDS-PAGE ve jel kapatma deneylerine dayanarak belirlenen antimikrobiyal polipeptit 30 kDa'lık MWCO membran filtre ile saflaştırılmıştır. Şekil 4.8'de saflaştırılan proteinin SDS-PAGE g6r6nt6s6 verilmiştir. G6r6nt6deki 1. kuyular marker proteine ait olup 2. kuyudaki tek bant ise antimikrobiyal aktivite g6steren saf protein bandıdır. Saflaştırılan bu polipeptit MIC değerinin belirlenmesi ve sinerjik etkileşim değerlendirmesi i6in kullanılmıştır.

4.5. AMP'nin G6nlere G6re 6retiminin Değerlendirilmesi

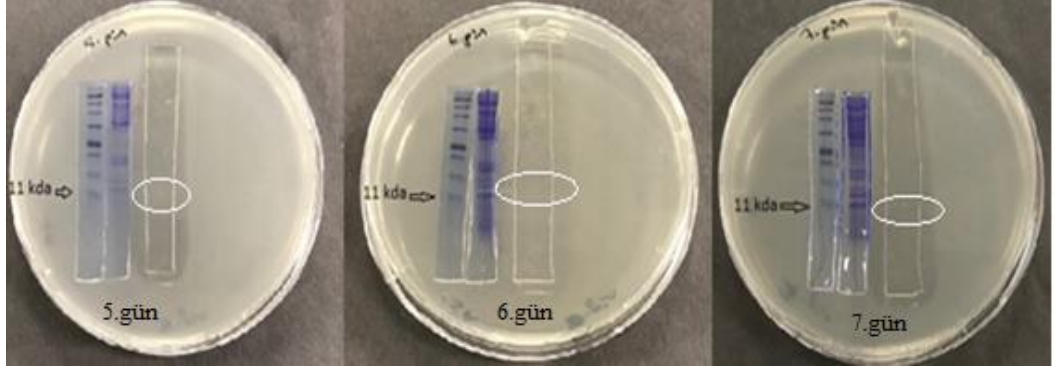
Ferment6r k6lt6r6nde geliştirilen fungusun g6nlere g6re total protein 6t6rimi, k6lt6r filtratlarının antimikrobiyal aktivitesi ve hangi proteinin bu aktiviteden sorumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9. A. Fermentör Kültüründe Geliştirilen İzolatın Total Proteinleri B. Agar Difüzyon Sonuçları

Şekil 4.9 A'daki protein bant profiline göre filamentöz fungusun total proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsünde 5. günden itibaren bant yoğunluklarının arttığı saptanmıştır. Fermentör kültürünün günlere göre antimikrobiyal etkinliği Şekil 4.9 B'de gösterilmiştir. Yaklaşık 11 kDa olan, Şekil 4.7 A'da belirlendiği gibi antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan protein bandı 5. günden itibaren ortaya çıkmaya başlamış ancak agar difüzyon testinde antimikrobiyal etkinlik Şekil 4.9 B'de gösterildiği gibi 6. günde ortaya çıkmıştır. 5. günde bu aktivitenin ortaya çıkmaması Şekil 4.9 A'daki sonuçlara bakıldığı zaman 5.gündeki antimikrobiyal aktiviteden sorumlu 11 kDa'luk bandın diğer günlere göre daha az yoğun olmasından kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Erlen kültüründe geliştirilen LC3 izolatının jel kapatma sonuçlarının fermentör kültürüyle karşılaştırılması için bu test günlere göre tekrarlanmıştır. Şekil 4.10'daki jel kapatma testi sonuçlarına göre antimikrobiyal aktivitenin 5. Günden itibaren ortaya çıktığı saptanmış olup bu aktiviteden sorumlu olan bandın Şekil 4.7'deki gibi 11 kDa'luk protein olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. Fermentör Kültürünün 5,6 ve 7. Günlerdeki Proteinlerinin Jel Kapatma Sonuçları

Sonuç olarak hem erlen skalasında üretilen kültürden hem de fermentörde üretilen kültürden izole edilen proteinlerin SDS-PAGE ve jel kapatma sonuçlarına göre 11 kDa üzerinde görülen tek bantın AMP özelliği taşıdığı sonucuna varılmıştır.

Park ve arkadaşları (2008)'nin yapmış oldukları çalışmada da geliştirdikleri bakteri kültürünün pH değişimine bağlı olarak farklı ölçeklerde ve fizyolojik şartlarda üretiminin antimikrobiyal aktiviteyi değiştirdiğini göstermişlerdir (Park *et al.* 2008). Liu ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada *Lactobacillus paracasei*'den üretilen Laparaxin adlı AMP'nin antimikrobiyal etkinliğine bakılmış ve pH'ın 6 olarak sabitlendiği fermentörden elde edilen bu polipeptidin, pH kontrolü yapılmayan fermentörden elde edilen polipeptide kıyasla daha az antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Liu *et al.* 2012). Yapılan bu çalışmalara dayanarak erlende geliştirilen kültürün SDS-bant profili ve jel kapatma deneylerinin, fermentörde geliştirilen kültürdeki sonuçlardan farklı olmasının sebebi buldukları farklı fizyolojik koşullara dayandırılabilir.

4.6. MIC Değerinin Belirlenmesi

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) mikroorganizmaları öldüren en küçük konsantrasyon miktarı olarak tanımlanır. MIC belirleme işlemi EUCAST protokolleri (Eucast Discussion Document E. Dis 5.1) ile yapılmıştır. Sıvı dilüsyon metodu ile yapılan deneylerde *S. aureus* ve MRSA patojenleri kullanılmıştır. İzole edilen polipeptit, *S. aureus*'a 8 µg/µl, MRSA'ya 32 µg/µl, MIC değerini vermiştir.

Bu değerler literatürde kayıtlı olan bazı AMP'lerin MIC değerleri ile karŐılaŐtırıldıęı zaman ceftaxidime, kloramfenikol, sub5-NH gibi antibiyotiklerle benzer sonuçlar vermiŐlerdir. Bu bulgular LC3 izolatından elde edilen bu polipeptidin güçlü bir AMP olduğunu gösterir (Ebbensgaard *et al.* 2015).

Mataraci ve Dosler'in yaptığı çalışmaya göre (2012) indolicidin, CAMA ve nisin katyonik polipeptitleri MRSA'ya karşı sırasıyla 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ MIC değerlerini vermiştir. Saflaştırdığımız AMP, MRSA'ya karşı 32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ değerini vermiŐ olup bu sonuçlarla karŐılaŐtırıldıęı zaman diğer katyonik polipeptitlerle benzer miktarda etkileri olduğu sonucuna varılmıştır (Mataraci and Dosler 2012).

Yazıcı (2018)'nin yaptığı çalışmada *A. tubingensis* olarak tanılanan türün ürettiği AMP, *S. aureus* ve MRSA'ya karşı sırasıyla 32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve 128 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ MIC değerlerini vermiŐ olmakla birlikte LC3 izolatından saflaştırılan AMP'nin bu AMP'ye göre çok daha güçlü antimikrobiyal etkinliği olduğu saptanmıştır.

4.7. Sinerjik Etkileşimin Değerlendirilmesi

LC3 izolatının proteinleri saflaŐtırılarak ampisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri ile etkileŐimleri *S. aureus* (ATCC 25922)'a karşı disk difüzyon testi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda sinerjik bir etkileşimin varlığından söz edilebilir. Çizelge 4.1'de sinerjik etkileşime ait zon çapları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sinerjik Etkileşim Zonlarının Belirlenmesi (mm: milimetre)

	LC3 Peptidi	Amfisilin	Kloramfenikol	Sinerjik Zon
Zon	11	35	32	Ampisilin+polipeptit: 40
Çapları (mm)				Kloramfenikol+polipeptit: 30

Çizelge 4.1'deki sonuçlara göre saflaştırdığımız AMP'nin ampisilin ile sinerjik bir etkiye sahip olduğu, kloramfenikol antibiyotiği ile de antagonistik çalıştığı saptanmıştır.

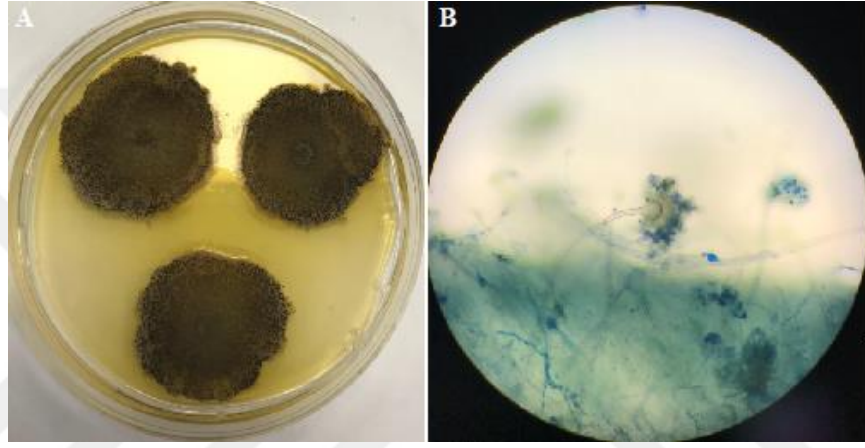
Antimikrobiyal ajanlar, her iki ilacın da enfekte olmuş bölgede yeterli konsantrasyonlarda ve yeterli bir süre boyunca mevcut olması halinde sinerjistik olarak etkileşime girebilir. Genel olarak, kombinasyondaki ajanlar farklı doku dağılımları ve farmakokinetiği gösterir. Sonuç olarak antibiyotiklerle etkisi artırılmış AMP'ler ilaçların lipozomlar gibi bir ilaç taşıyıcısında birlikte kapsüllenmesiyle, her iki ilacın da paralel doku dağılımları sağlanabilir ve böylece ideal ilaç konsantrasyonları sağlanabilir (Schiffelers *et al.* 2002).

Yazıcı (2018)'in yaptığı çalışmada saflaştırılan AMP molekülünün ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerle olan sinerjik etkileri değerlendirilmiş olup, ampisiline kıyasla kloramfenikol ile daha az inhibisyon zonu oluşturmuştur (Yazıcı 2018). Bu verilerle karşılaştırıldığında kloramfenikol antibiyotiğinin saflaştırdığımız polipeptitle sinerjik etki göstermemesi ilaç kombinasyonları oluşturmak için bu antibiyotiğin uygun olmadığını göstermektedir.

4.8. LC3 Kodlu Filamentöz Fungusun Tanısı

4.8.1. Klasik Tanı

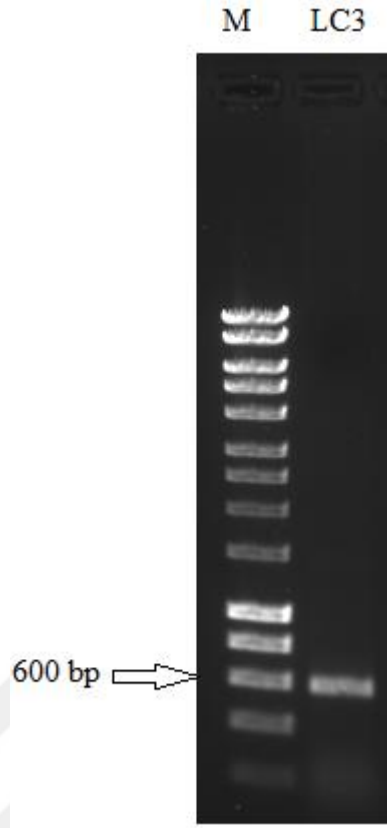
LC3 izolatının tanısı için hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Fungusun morfolojik yapısına göre, bu izolatın *Aspergillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Samson 2010). Şekil 4.11 B' de 400 kat büyütmeli mikroskop görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.11. LC3 Kodlu İzolatın A. Koloni Görüntüsü B. Konidyafor ve Konidiler

4.8.2. Moleküler Tanı

Moleküler tür tayini için LC3 izolatından DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'daki ITS bölgesinin PZR'ı yapılmıştır. Çoğalan PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Şekil 4.12'de agaroz jel elektroforezinin görüntüsü verilmiştir. ITS ürünleri yaklaşık 600 baz çifti uzunluğundadır.



Şekil 4.12. LC3 İzolatının ITS PZR'ının Agaroz Jel Görüntüsü

Elde edilen PZR pürifikasyon ürünlerine çift yönlü okuma ile dizi analizi yaptırılmıştır. Hizmet alımı ile gerçekleştirilen bu aşama sonucunda elde edilen veriler, Bioedit Programında analiz edilmiş ve blast algoritması (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak GenBank'ta kayıtlı diğer türlerle karşılaştırılması yapılmıştır. ITS bölgesinin karşılaştırılması sonucu LC3 izolatının *A. niger* olduğu belirlenmiştir. ITS bölgesine ait dizi, MK332597 NCBI kayıt numarası ile veritabanına kaydedilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Antimikrobiyal Polipeptit Veritabanı'nda (ADP3) bugüne kadar toplam 3051 adet antimikrobiyal protein tanımlanmıştır. 2000'nin üzerinde polipeptit memeliler ve bitkilere ait olup bunu bakteriler takip etmektedir. Ancak funguslara ait toplamda 18 kayıt bulunmaktadır (Wang *et al.* 2015). Bunlardan yalnızca iki tanesinin *Aspergillus* cinsine ait olması, bu filamentöz fungusun antibakteriyel polipeptit üreticisi türleri kapsadığını; ancak çalışmaların yetersizliğinden dolayı henüz tamamının ortaya çıkarılmadığını göstermektedir. Bu amaçla tez çalışması kapsamında *Aspergillus* cinsine ait LC3 izolatı kaynak olarak seçilmiştir. Bu izolat, *S. aureus*'a ve MRSA'ya karşı önemli antimikrobiyal aktivite göstermiş ve bu antimikrobiyal aktivitenin de 11 kDa'luk banttan kaynaklandığı jel kapatma testiyle ortaya çıkarılmıştır. Ardından bu 11kDa'luk protein, 3 kDa ve 30 kDa'luk filtreler kullanılarak saflaştırılmış ve saf proteine ait MIC değerleri belirlenerek jel kapatma testi sonuçları doğrulanmıştır.

Bu tez çalışması ile *Aspergillus niger* türünden yeni bir antibakteriyel polipeptit literatüre kazandırılmıştır. Sonuç olarak *A. niger*'den izole edilen antibakteriyel etkili polipeptitler, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde özellikle de *S. aureus* patojenine karşı mücadelede kullanım potansiyeli taşımaktadır. Ayrıca çalışma sonunda antibakteriyel etkinliği ortaya konulan doğal polipeptitler, sentetik peptitlerin üretiminde de kalıp olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Tüm bu bulgular sonucunda;

- Antibakteriyel etkiye sahip olan polipeptidin karakterizasyonu yapılmalıdır.
- Aktivitesi ortaya konulan antimikrobiyal peptidin daha fazla etki göstermesi ve kombine yaklaşımla çalışması için diğer antimikrobiyal ajanlarla veya antibiyotiklerle birlikte ilaç taşıma sistemi çalışmalarında kullanılmalıdır.
- *A.niger* LC3 izolatında, antibakteriyel polipeptidin daha verimli üretimi için uygun ekspresyon sistemleri bulunmalıdır.
- AMP molekülünün ilaç endüstrisinde kullanımı için, pH değişimlerindeki davranışı ve çeşitli kimyasallardaki aktivite değişimleri değerlendirilmelidir.
- Tez çalışmamızda saflaştırdığımız polipeptidin etkinliği in vivo deneyler ile desteklenmeli ve toksite testleri yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Apan, TZ. 2004. Effects Of Magainin and Pexiganan As New Peptide Antibiotics, Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology, 61(1), 37-40.
- Ataman, M. 2016. Antimikrobiyal peptidlerin çeşitli enfeksiyon etkenlerine karşı in vitro antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji, İstanbul
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. 1995. Phenol extraction and ethanol precipitation of DNA. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Ed.; John Wiley and Sons, Inc.: Canada, 2-3.
- Balke, B., Hogardt, M., Schmoldt, S., Hoy, L., Weissbrodt, H., and Häussler, S. 2006. Evaluation of the E test for the assessment of synergy of antibiotic combinations against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25(1), 25-30.
- Bechinger, B. 2005. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: a 31 P solid-state NMR spectroscopy study. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1712(1), 101-108.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? American journal of botany, 98(3), 426-438.
- Blumenthal, CZ. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 39(2), 214-228.
- Blumenthal, T. 2004. Operons in eukaryotes. Briefings in Functional Genomics, 3(3), 199-211.
- Bondaryk, M., Staniszevska, M., Zielińska, P., and Urbańczyk-Lipkowska, Z. 2017. Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. Journal of Fungi, 3(3), 46.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.
- Brogden, KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature reviews microbiology, 3(3), 238.
- Brogden, KA. Ackermann, M. McCray Jr, PB. and Tack, BF. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. International journal of antimicrobial agents, 22(5), 465-478.
- Brogden, KA., Ackermann, M., McCray Jr, PB. and Tack, BF., 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. International journal of antimicrobial agents, 22(5), 465-478.
- D Fjell, C. EW., Hancock, R. and Jenssen, H. 2010. Computer-aided design of antimicrobial peptides. Current Pharmaceutical Analysis, 6(2), 66-75.

- De Oliveira, J.M.P.F., de Graaff L.H. 2011. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* 89, 225-237.
- del Castillo, FJ., del Castillo, I. and Moreno, F. 2001. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. *Journal of bacteriology*, 183(6), 2137-2140.
- Di Luca, M., Maccari G., Maisetta G. and Batoni G., 2015. Baamps: the database of biofilmactive antimicrobial peptides. *Biofouling* 31, 193-199.
- Dusane, DH., Damare, SR., Nancharaiah, YV., Ramaiah, N., Venugopalan, VP., Kumar, AR. and Zinjarde, SS. 2013. Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. *PloS one*, 8(5), e64501.
- Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Overgaard, MT., Nielsen, CG., Aarestrup, FM. and Hansen, EB. 2015. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of different antimicrobial peptides against a range of pathogenic bacteria. *PLoS One*, 10(12), e0144611.
- Forde, É., Schütte, A., Reeves, E., Greene, C., Humphreys, H., Mall, M., Fitzgerald Hughes, D. and Devocelle, M. 2016. Differential in vitro and in vivo toxicities of antimicrobial peptide prodrugs for potential use in cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC. 00157-00116.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, SO., and Terán, LM. 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical immunology*, 135(1), 1-11.
- Hajji, M., Jellouli, K., Hmidet, N., Balti, R., Sellami-Kamoun, A. and Nasri, M. 2010. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(8), 805-813.
- Hancock, RE. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, 5(1), 37-42.
- Hancock, RE. and Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8(9), 402-410.
- Hancock, RE. and Lehrer, R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology*, 16(2), 82-88.
- Harwig, SS., Waring, A., Yang, HJ., Cho, Y., Tan, L. and Lehrer, RI. 1996. Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *European journal of biochemistry*, 240(2), 352-357.
- Hobbs, RJ. and Humphries, SE. 1995. An integrated approach to the ecology and management of plant invasions. *Conservation biology*, 9(4), 761-770.
- Hoffmann, D., Hultmark, D. and Boman, HG. 1981. Insect immunity: *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have cecropia-P9-like factors active against gram negative bacteria. *Insect Biochemistry*, 11(5), 537-548.
- Irazazabal, LN., Porto, WF., Fensterseifer, IC., Alves, ES., Matos, CO., Menezes, AC., Felício, MR., Gonçalves, S., Santos, NC. and Ribeiro, SM. 2018. Fast and potent

- bactericidal membrane lytic activity of PaDBS1R1, a novel cationic antimicrobial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*,
- J Afacan, N., T.Y Yeung, A., M. Pena, O. and EW Hancock, R. 2012. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Current pharmaceutical design*, 18(6), 807-819.
- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, RE. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.
- Jiang, L., He, L. and Fountoulakis, M. 2004. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1023(2), 317-320.
- Kalyani.P1. and Hemalatha.K.P.J. 2017. In Vitro Antimicrobial Potential of *Aspergillus niger* (MTCC-961), *International Journal of ChemTech Research*, 10(4), 430-435.
- Kruger, N.J. 2002. The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols hand book*, Springer: 15-21.
- Lakshman, DK., Natarajan, SS., Lakshman, S., Garrett, WM. and Dhar, AK. 2008. Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia*, 100(6), 867-875.
- Lee, H-Y., and alibi, A., Webster, P., Moon, S-K., Teufert, K., Kang, S-H., Li, J-D., Nagura, M., Ganz, T. and Lim, DJ. 2004. Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC infectious diseases*, 4(1), 1-12.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J-M. and Hoffmann, JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973-983.
- Lertcanawanichakul, M. and Sawangnop, S. 2011. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 5(2), 161-171.
- Li, S., Dong, S., Xu, W., Tu, S., Yan, L., Zhao, C., Ding, J. and Chen, X. 2018. Antibacterial Hydrogels. *Advanced Science*, 5(5), 1700527.
- Liu, S., Wilkinson, BJ., Bischoff, KM., Hughes, SR., Rich, JO. and Cotta, MA. 2012. Novel antibacterial polypeptide laparaxin produced by *Lactobacillus paracasei* strain NRRL B-50314 via fermentation. *J Petro Environ Biotechnol*, 3(3), 1-5.
- Macfarlane, EL., Kwasnicka, A. and Hancock, RE. 2000. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology*, 146(10), 2543-2554.
- Mataraci, E. and Dosler, S. 2012. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC. 01180-01112.
- Mecke, A., Lee, D-K., Ramamoorthy, A., Orr, BG. and Holl, MMB. 2005. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. *Biophysical journal*, 89(6), 4043-4050.
- Medina, M. L. and Francisco, W. A. 2008. Isolation and enrichment of secreted proteins from filamentous fungi. *Methods Mol. Biol.* 425, 275–285.

- Medina, ML., Haynes, PA., Breci, L. and Francisco, WA. 2005. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics*, 5(12), 3153-3161.
- Melo, MN., Ferre, R. and Castanho, MA. 2009. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature reviews microbiology*, 7(3), 245.
- Mishra, J., Rajput, R., Singh, K., Puri, S., Goyal, M., Bansal, A. and Misra, K. 2018. Antibacterial natural peptide fractions from Indian *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(4), 543-554.
- Mizuno, T. 1995. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International*, 11(1), 5-21.
- Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T. and Kawagishi, H. 1995. Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Reviews International*, 11(1), 23-61.
- Mygind, PH., Fischer, RL., Schnorr, KM., Hansen, MT., Sönksen, CP., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B. and De Maria, L. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), 975.
- Nester, EW., Roberts, CE., Pearsall, N. and McCarthy, B. 1978. *Microbiology*. Holt, Rinehart and Winston., London.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, RA., Pestonjamas, V., Piraino, J., Huttner, K. and Gallo, RL. 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*, 414(6862), 454-457.
- Olsen, I. and Potempa, J. 2014. Strategies for the inhibition of gingipains for the potential treatment of periodontitis and associated systemic diseases. *Journal of oral microbiology*, 6(1), 24800.
- Otvos Jr, L. 2005. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 11(11), 697-706.
- Park, CB., Kim, HS. and Kim, SC. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 244(1), 253-257.
- Powers, J-PS. and Hancock, RE. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681-1691.
- Regmi, S., Choi, YH., Choi, YS., Kim, MR. and Yoo, JC. 2017. Antimicrobial peptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* K14 revitalizes its use in combinatorial drug therapy. *Folia microbiologica*, 62(2), 127-138.
- Roschetto, E., Contursi, P., Vollaro, A., Fusco, S., Notomista, E. and Catania, MR. 2018. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. *Scientific reports*, 8(1), 17570.
- Samson, RA. 2010. *Food and indoor fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Netherland.

- Samson, RA., Houbraeken, J., Summerbell, RC., Flannigan, B. and Miller, JD. 2002. Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. *Microorganisms in home and indoor work environments: diversity, health impacts, investigation and control*, 285-473.
- Schiffelers, RM., Storm, G., ten Kate, MT., Stearne-Cullen, LE., den Hollander, JG. Verbrugh, HA. and Bakker-Woudenberg, IA. 2002. Liposome-enabled synergistic interaction of antimicrobial agents. *Journal of liposome research*, 12(1-2), 121-127.
- Schultes, RE., Hofmann, A. and Rättsch, C. 2001. *Plants of the gods: their sacred, healing, and hallucinogenic powers*. Healing Arts Press Rochester, VT,
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. and Van Dijck, P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), 426-435.
- Scocchi, M., Romeo, D. and Cinco, M. 1993. Antimicrobial activity of two bacterenecins against spirochetes. *Infection and immunity*, 61(7), 3081-3083.
- Sheikh, HMA. 2010. Antimicrobial activity of certain bacteria and fungi isolated from soil mixed with human saliva against pathogenic microbes causing dermatological diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(4), 331-339.
- Shen, W., He, P., Xiao, C. and Chen, X. 2018. From Antimicrobial Peptides to Antimicrobial Poly (α -amino acid) s. *Advanced Healthcare Materials*, e1800354.
- Sun, Y., Chang, R., Li, Q. and Li, B. 2016. Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 242(5), 685-692.
- Svanström, Å. 2013. Trehalose metabolism and stress resistance in *Aspergillus niger*. Doctoral Thesis, Swedish University, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, 56, Uppsala.
- Toke, O. 2005. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 80(6), 717-735.
- Turner, WB. 1971. *Fungal metabolites*. Academic Press, 446, London.
- Tzeng, Y.L., Ambrose, KD., Zughaier, S., Zhou, X., Miller, Y.K., Shafer, WM. and Stephens, DS. 2005. Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5387-5396.
- Verdu, P. 2016. African Pygmies. *Current Biology*, 26(1), R12-R14.
- Wang, G., Li, X. and Wang, Z. 2015. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1087-D1093.
- Wang, M., Zheng, K., Lin, J., Huang, M., Ma, Y., Li, S., Luo, X. and Wang, J. 2018. Rapid and efficient production of cecropin A antibacterial peptide in *Escherichia coli* by fusion with a self-aggregating protein. *BMC biotechnology*, 18(1), 62.
- Wasser, SP. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1323-1332.

- Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R. and Hancock, RE. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38(22), 7235-7242.
- Yazıcı, A. 2018. Filamentöz funguslardan antibiyofilm aktivitesine sahip ekstrasellüler polipeptitlerin izolasyonu. Doktora Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 105, Erzurum
- Yazıcı, A., Ortucu, S., Taskin, M. and Marinelli, L. 2018. Natural-based Antibiofilm and Antimicrobial Peptides from Microorganisms. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(24), 2102 – 2107.
- Yoneyama, H. and Katsumata, R. 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(5), 1060-1075.
- Zanetti, M., Gennaro, R. and Romeo, D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS letters*, 374(1), 1-5.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5449-5453.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389.
- Zhang, L., A. Rozek, and R. E. Hancock. 2001. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* 276:35714-35722.
- Zhang, Y-M. and Rock, CO. 2009. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *Journal of lipid research*, 50(Supplement), S115-S119.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology*, 7(1-2), 203-214.
- Zheng, Z., Tharmalingam, N., Liu, Q., Jayamani, E., Kim, W., Fuchs, B.B., Zhang, R., Vilcinskis, A. and Mylonakis, E. 2017. The synergistic efficacy of *Aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC. 00686-00617.
- Zjawiony, JK. 2004. Biologically active compounds from Aphylllophorales (Polypore) fungi. *Journal of natural products*, 67(2), 300-310.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Ayşe ÜSTÜN
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 06.09.1992-TORTUM
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +905456723842
e-mail : ayse.ustun@erzurum.edu.tr

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Erzurum Anadolu Lisesi	2011

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

ARAŞTIRMA
GÖREVLİSİ
2018

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ/FEN FAKÜLTESİ
/MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ)

Uluslararası Kongre Sunum

ÜSTÜN AYŞE, YAZICI AYŞENUR, KARALTI İSKENDER, ÖRTÜCÜ SERKAN (2018). Anticandidal Activity of Ethyl Acetate Extract from *Aspergillus sclerotiorum*. International Symposium on Innovative Approaches in Scientific Studies(ISAS 2018) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4512312)

ÜSTÜN AYŞE, TURGUT ALPGİRAY, ALBAYRAK BÜŞRA, DAŞ ABDÜLSALTUK BUĞRA, YAZICI AYŞENUR (2018). Antibiofilm Effect of Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles Against *Staphylococcus aureus*. International Symposium on Applied Sciences and Engineering (ISASE 2018) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4512296)